



Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende del av mastergrad i matvitenskap ved NMBU, og ble utført i samarbeid med Nofima, avdeling for trygg og holdbar mat.

Jeg vil rette en stor takk til seniorforsker Lars Axelsson for god veiledning gjennom hele oppgaven. Tusen takk for utfyllende og oppklarende svar på alle mine spørsmål, spesielt i skriveprosessen. Jeg har satt stor pris på tålmodigheten og den høye faglige kompetansen du har vist.

Jeg vil også takke senioringeniør Signe Drømtorp for en stor dose tålmodighet, god hjelp og støtte i det praktiske arbeidet gjennom hele oppgaven. Takk for optimismen din og fine samtaler fra første stund.

Videre takker jeg alle på laboratoriet og medstudenter for et godt arbeidsmiljø.

Takk til Tor Lea ved NMBU som har vært hovedveilederen min.

Sist men ikke minst vil jeg takke mine nærmeste som har vært en stor støtte for meg gjennom hele studietiden.

Ås, september 2015

Kristine Redal Alterås

Sammendrag

Hovedmål i dette arbeidet var å studere om den hypervariable repeterte regionen i den C-terminale delen av *CmbA* har betydning for adhesjon til intestinale epitelceller, og om forskjellige vekstfaser og mediekomponenter kan påvirke uttrykket av *cmbA*-genet vedrørende disse repetitive regionene.

I dette arbeidet ble det brukt to syntetisk produserte varianter av *cmbA*-genet, tilstede i plasmidene pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4*. Det lyktes å transformere *cmbA3*-varianten inn i *L. reuteri* 6475 *cmbA*⁻ i en konstruksjon med vektor pSIP411. Stammen ble sammen med pSIP-*cmbA1* testet for adhesjon til Caco-2. Siden det ikke lyktes å finne positive transformanter av *cmbA4* i hverken *Lc. lactis* og *E. coli* PK401 kan det tenkes at genet, som er 3.4 kb, kanskje er for stort, men også at genet har egenskaper som gjør det vanskelig å introdusere i ulike stammer. Siden antall repetitive regioner er det som skiller genene kan det hende at akkurat denne ekstra delen i *cmbA4* forårsaker vanskelighetene. DSM20016 og *L. reuteri* 6475 ble benyttet i vekstforsøk for å analysere de repetitive regionene i *cmbA*. Galle og mucin ble brukt som mediekomponenter for å se om disse påvirket resultatet. DSM20016 og 6475 tilsatt galle vokste betydelig saktere enn de andre bakteriekulturene, midlertidig økte veksten ved tilsatt av MOPS-buffer. Det kan antas at MOPS hindrer stor hemming i bakteriekulturene med galle. Fra PCR-produkt var det ingen signifikante forskjeller i de repetitive mønstrene, men i DSM20016 kan det tenkes at mucin kanskje inducerer større variasjon og eventuell forskjell til binding tatt i betraktning at mucin hadde høyere utbytte i båndene på slutten av vekstforsøket enn kontrollen. I 6475 har kontrollen antydninger til flere bånd enn 6475 med mucin og galle i tillegg til et høyere utbytte i hvert bånd. Dette kan tyde på at mucin eller galle hemmer evnen til større variasjon i repeterende regioner i 6475.

Abstract

The overall aim in this study was to see if the hypervariable repetitive region in the C-terminal part of CmbA has significance for adhesion to intestinal cells and if different growth phases and media components can affect expressions in the *cmbA*-gene regarding these repetitive regions.

Two variants of the *cmbA*-gene were constructed, present in the plasmids pUC57-*cmbA3* and pUC57-*cmbA4*. Transformation of the *cmbA*-gene in to *L. reuteri* 6475*cmbA* in a construction with the pSIP411-vector succeeded. This gene, as well as pSIP-*cmbA1*, was used in the adhesion to Caco-2. pUC57-*cmbA4* failed to transform in to both *Lc. lactis* and *E. coli* PK401. It was speculated that the size of the gene (3,4kb) might be too big for introduction in the cells. In addition, the gene has properties that make it difficult to introduce in different strains. Since the number of repetitive regions is what separates the genes it might be this particular extra part in *cmbA4* which causes difficulties.

DSM20016 and *L. reuteri* 6475 were used in the growth experiment to analyze the repetitive regions. Bile and mucin was used as media component to see if these affected the result. In this experiment the strains with bile grew significantly slower than the other bacterial cultures, though the growth increased with addition of MOPS-buffer. MOPS might prevent inhibiting in the cultures with bile. DSM20016 and 6475 with mucin grew fastest. There were no significant differences in the repetitive regions in the patterns from PCR. However, in DSM20016 it might be that mucin induces greater variation and difference in binding, considering that mucin had higher yield in the end of the growth experiment than the control (DSM20016 without mucin). 6475 had more bands than 6475 with bile and mucin, this could mean that mucin or bile inhibits the ability to greater variation in the repetitive regions.

Innholdsfortegnelse

1	Bakgrunn for oppgaven	1
1.1	Innledning.....	1
1.2	Problemstilling	1
1.2.1	Delmål:	1
2	Teori	2
2.1	Melkesyrebakterier	2
2.2	Laktobaciller.....	3
2.2.1	Mikroorganismer med probiotiske effekter	3
2.2.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	5
2.3	Fordøyelsessystemet hos mennesker	6
2.3.1	Bakterieflora i tarmsystemet hos mennesker.....	6
2.3.2	Samspill mellom bakterieflora og verten i GI-trakten.....	7
2.3.3	Utfordringer for laktobaciller gjennom fordøyelsessystemet	9
2.4	Bakteriell adhesjon til intestinale celler og mucus	10
2.4.1	Celle – og mucusbindende protein A (CmbA)	11
2.5	Induserbart ekspresjonssystem for laktobaciller: pSIP-systemet	13
3	Materialer og metoder	15
3.1	Materialer	15
3.1.1	Tillaging av medier og løsninger.....	19
3.2	Metoder	22
3.2.1	Frysestokk	22
3.2.2	Dyrking av bakteriestammer	22
3.2.3	Isolering av plasmid	22
3.2.4	Agarose gelelektroforese	22
3.2.5	Kutting med restriksjonsenzymmer	23
3.2.6	Rensing av DNA-fragment fra gel	24
3.2.7	Ligering av DNA-fragmenter	24
3.2.8	Transformerings	24
3.2.9	«Polymerase chain reaction» (PCR).....	27
3.2.10	Sekvensering	29
3.2.11	Vekstforsøk med stammene DSM20016 og <i>L. reuteri</i> 6475	31
3.2.12	Adhesjonsforsøk med DSM20016, 6475 og 6475 cmbA-(pSIP-cmbA3).....	31
4	Resultater	33
4.1	Generelt	33
4.2	Fra transformering av pUC57 til <i>E. Coli</i> , til ligering av pSIP-cmbA	33

4.2.1	Transformering av pUC57 til <i>E.coli</i>	34
4.2.2	Isolering av plasmider og rensing av DNA fra fragment	35
4.3	Konstruksjon av plasmider med <i>cmbA</i> for uttrykk i <i>L. reuteri</i> , bruk av <i>Lc. lactis</i> som mellomvert	36
4.4	Konstruksjon av <i>E. coli</i> -stammer med pSIP- <i>cmbA1</i> , pSIP- <i>cmbA3</i> og pSIP- <i>cmbA4</i>	38
4.5	Konstruksjon av <i>L. reuteri</i> -stammer med pSIP- <i>cmbA1</i> og pSIP- <i>cmbA3</i>	40
4.6	Adhesjonsforsøk del A	41
4.6.1	Adhesjonsforsøk med pSIP- <i>cmbA3</i> og pSIP- <i>cmbA1</i>	41
4.7	Vekstforsøk med DSM20016 og 6475	42
4.7.1	Analyse av repetitivt område i DSM20016 og 6475	42
4.7.2	Bestemmelse av konsentrasjon av galle	44
4.7.3	DSM20016 og 6475 i MOPS-MRS-buljong tilsatt galle og mucin: Analyse av repetitivt område	45
4.8	Adhesjonsforsøk del B	47
4.8.1	Adhesjonsforsøk med DSM20016 og 6475.....	48
4.8.2	Adhesjonsforsøk med 6475 og DSM20016 tilsatt galle og mucin	48
5	Diskusjon	51
5.1	Generelt	51
5.2	Konstruksjon av plasmider med ulike <i>cmbA</i> -varianter for introduksjon i <i>L. reuteri</i> -stammer 51	
5.2.1	Fra transformering av pUC57 til <i>E. coli</i> , til ligering av pSIP- <i>cmbA</i>	51
5.2.2	Konstruksjon av <i>cmbA</i> for uttrykk i <i>L. reuteri</i> , bruk av <i>Lactococcus lactis</i> som mellomvert.....	52
5.2.3	Konstruksjon av <i>E. coli</i> -stammer med pSIP- <i>cmbA1</i> , pSIP- <i>cmbA3</i> og pSIP- <i>cmbA4</i>	52
5.2.4	Konstruksjon av <i>L. reuteri</i> -stammer med pSIP- <i>cmbA1</i> og pSIP- <i>cmbA3</i>	53
5.3	Adhesjonsforsøk med pSIP- <i>cmbA1</i> og pSIP- <i>cmbA3</i>	54
5.4	Vekstforsøk med <i>L. reuteri</i> DSM20016 og <i>L. reuteri</i> 6475 med og uten galle eller mucin .	54
5.4.1	Bestemmelse av konsentrasjon av galle	54
5.4.2	Analyse av repetitivt område i DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin.....	55
5.5	Adhesjonsforsøk med DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin	57
6	Konklusjon og forslag til videre arbeid	58
7	Litteraturliste	59
8	Vedlegg	62
8.1	Vedlegg 1: Figur av pUC57 med innsatt <i>cmbA</i> -gen	62
8.2	Vedlegg 2: Plasmidkart og sekvens av vektoren pSIP411	64
8.3	Vedlegg 3: Sekvensering av <i>cmbA3</i> i <i>L. reuteri</i>	66
8.4	Vedlegg 4: Verdier fra transformasjoner.....	67
8.5	Vedlegg 5: Primere brukt ved PCR og sekvensering	69

8.6	Vedlegg 6: OD-verdier på vekstforsøk for analyse av repetitivt område i cmbA under vekstfase	70
8.7	Vedlegg 7: Detaljer fra adhesjonsforsøk A og B.....	73

Forkortelser

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO	Verdens helseorganisasjon
GRAS	Generally Recognized As Safe
QPS	Qualified presumption of safety
CmbA	celle – og mucusbindende protein A
IEC	intestinal epitelcelle
IE	intestinal epitel
MSB	melkesyrebakterie
SDP	sortase-avhengig protein
GI-trakt	gastrointestinaltrakt
PP	peyers plakk
IgA	Immunoglobulin A
SrtA	sortase A
GALT	gut-associated lymphoid tissue
Mub	mucus-bindende protein
µl	mikroliter
µg	mikrogram
ng	nanogram
dH ₂ O	destillert vann
cfu	colony forming units
bp	basepar

1 Bakgrunn for oppgaven

1.1 Innledning

Bruken av melkesyrebakterier er svært vanlig i produksjon av fermentert mat. Laktobaciller er melkesyrebakterier som raskt omdanner karbohydrater til melkesyre, de var derfor en av de mikroorganismene som først ble isolert fra fermentert mat, og deretter brukt som isolerte kulturer (såkalte startkulturer) for fermentering. Laktobacillenes naturlige habitat varierer fra mat, planter og kloakk, til munnen, genitaliene og fordøyelsessystemet til mennesker og dyr. Noen av stammene som naturlig er å finne i GI-trakten har dokumenterte helseeffekter. Slike stammer har derfor fått status som såkalt probiotika. Forskningen på probiotika har økt kraftig de siste årene, og det har blitt rapportert flere helseeffekter fra mat som inneholder levende probiotiske mikroorganismer. Enkelte stammer av *Lactobacillus reuteri* er stemplet som probiotiske, og flere kliniske studier indikerer positive effekter.

1.2 Problemstilling

Denne oppgaven er basert på arbeid av Jensen et al. (2014) hvor det ble identifisert et protein som binder til intestinale epitelceller og mucus, kalt CmbA (Celle- og mucusbindende protein A), hos *Lactobacillus reuteri* 6475.

Målsetningen var å studere om den hypervariable repeterte regionen i den C-terminale delen av CmbA har betydning for adhesjon til intestinale epitelceller, og om forskjellige vekstfaser og mediekomponenter kan påvirke uttrykket av *cmbA*-genet vedrørende disse repetitive regionene.

1.2.1 Delmål:

1. Lage plasmidkonstruksjoner med forskjellige *cmbA*-varianter for introduksjon i forskjellige *Lactobacillus reuteri*-stammer.
2. Undersøke om de forskjellige CmbA-variantene ga utslag i forskjellig adhesjonskapasitet i *L. reuteri*-stammene
3. Analysere repetitivt område i *cmbA*-genet i forskjellige vekstfaser og under stress i to forskjellige stammer av *L. reuteri*.
4. Undersøke om *L. reuteri* i forskjellige vekstfaser og under stress viser forskjellig adhesjonskapasitet, eventuelt korrelert til endringer i uttrykk av repetitivt område.

2 Teori

2.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (MSB) er gram-positive bakterier som omfatter blant annet slektene *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* og *Lactobacillus* (Makarova et al., 2006). De er ikke-sporulerende kokker eller staver, vanligvis aerotolerante og har et lavt innhold av G+C (guanin og cytosin). MSB metaboliserer karbohydrater og konverterer det hovedsakelig til melkesyre i tillegg til små mengder av andre organiske syrer, som for eksempel eddiksyre, og eventuelt etanol og CO₂. I tarmsystemet kan dette bidra til lavere pH (Axelsson, 2004). MSB har en relativt enkel energi- og karbonmetabolisme og dessuten en liten genomstørrelse på ~2-3 megabasepar (Mb). Dette gjør det relativt enkelt å modifisere egenskapene til mikroorganismene. For eksempel kan pyruvatmetabolismen endres for å produsere endeprodukter som gir søtning og aromakomponenter som endrer smak. MSB er svært utbredt som startkultur i fermenteringen av mat, og bruken kan dateres tusenvis av år tilbake i tid, selv om man i eldre tider ikke kjente til at det var bakterier som sto for syring. Da ble fermentering (og derved melkesyrebakterier) brukt for å øke holdbarhet i mat, men også som forbedring av kvalitet i blant annet rå planter og kjøtt. I det mennesker utviklet jordbruket er det sannsynlig at fermentert mat utviklet seg betraktelig. (Steele, Broadbent & Kok, 2013; Yvon & Rijnen, 2001). Bruken av MSB er svært vanlig i produksjon av særlig fermenterte melkeprodukter, men også grønnsaker og kjøtt. MSB bidrar til kvalitet og holdbarhet i mat blant annet på grunn av evnen til å inhibere patogene mikroorganismer. Først og fremst ved å produsere melkesyre, men også andre forbindelser kan bidra til antimikrobiell effekt, for eksempel bakteriociner. Bakteriociner er små peptider med anti-bakteriell effekt, og produseres av de fleste bakterier og arker (Cotter, Hill & Ross, 2005). Det er strenge krav til bruk av bakteriestammer (i mat og helseprodukter) som skal spises og disse må bli godkjent og ha såkalt GRAS (Generally Recognized As Safe; USA) eller QPS (Qualified Presumption of Safety; EU)-status. (FDA, 1997; EFSA, 2008). Flere stammer av MSB har naturlig tilholdssted i fordøyelsessystemet (GI-trakten) til mennesker, og beskytter mot uønskede bakterier. MSB som brukes i helseprodukter (dvs. som probiotika) stammer som regel fra GI-trakten hos mennesker. De må være nøyaktig identifisert, ha en trygg historikk og det skal ikke være rapportert om potensiell patogenitet eller antibiotikaresistens. Noen MSB har evnen til å adherere til celleveggen og/eller mucus i GI-trakten (Libudzisz, 2004; Piątek et al., 2012). Dette anses som en potensiell viktig probiotisk egenskap.

2.2 Laktobaciller

Lactobacillus er den største slekten i MSB-gruppen. Formelt hører laktobacillene til *Firmicutes*, og klassen *Bacilli*. De er i familien *Lactobacillaceae*, direkte under *Lactobacillales*-ordren (Hammes & Hertel, 2003). Laktobaciller er enten aerotolerante eller anaerobe MSB, og krever mange ernæringskomponenter for vekst; de trenger blant annet karbohydrater, aminosyrer, salter, vitaminer og peptider. Karbohydratrik lagret mat er et ideelt sted for laktobaciller, og bakterien var derfor en av de første mikroorganismene som ble brukt til fermentering av mat (Bernardeau, Guguen & Vernoux, 2006). Laktobacillene kan metabolsk deles inn i tre grupper; de er enten obligat homofermentative (produserer nesten kun melkesyre fra glukose), obligat heterofermentative (produserer, i tillegg til melkesyre, CO₂ og eddiksyre/etanol fra glukose) eller fakultativt heterofermentative (produserer kun melkesyre fra glukose, men i tillegg andre produkter, særlig eddiksyre, fra en del andre karbohydrater) (Klaenhammer et.al, 2008; Von Wright & Axelsson, 2011). Deres naturlige habitat varierer fra mat, planter og kloakk, til munnen, genitaliene og GI-trakten til mennesker og dyr (Hammes & Vogel, 1995). Stammer av *Lactobacillus* utgjør en liten del av en balansert bakterieflora i tykktarmen, men en betydelig større komponent i tynntarmen. De vanligste stammene som finnes i tynntarmen er *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* og *Lactobacillus plantarum* (Ahrné et al., 1998). Noen av stammene som har blitt isolert fra GI-trakten har dokumenterte helseeffekter etter inntak og derfor fått status som probiotika (Sanders, 2003). Disse har derfor stort potensiale i mat- og helseindustrien.

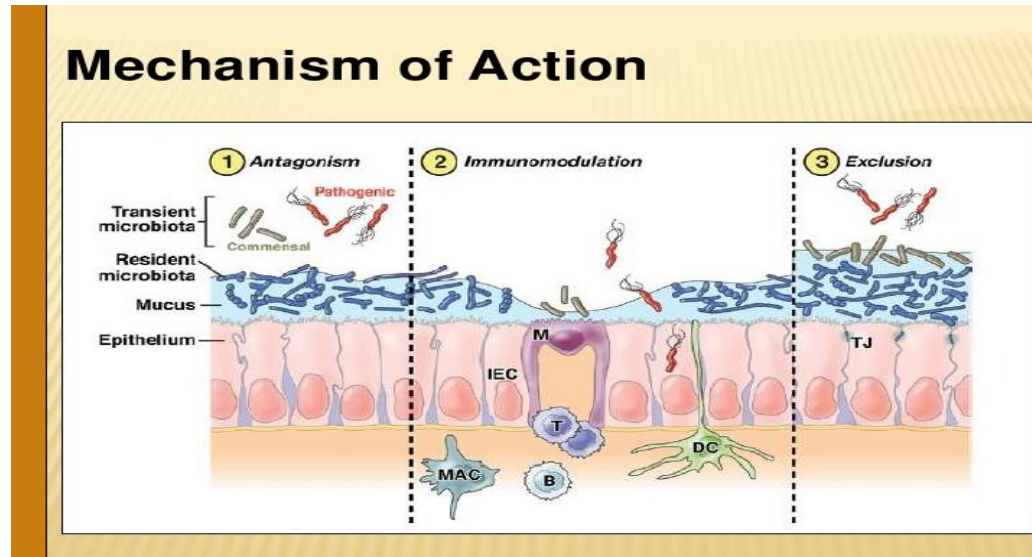
2.2.1 Mikroorganismer med probiotiske effekter

Verdens helseorganisasjon og FAO («Food and Agriculture Organization of the United Nations») definerer probiotika som «levende mikroorganismer som hvis gitt i tilstrekkelige mengder har en gunstig helseeffekt på verten» (WHO & FAO, 2001).

Forskningen på probiotika har økt kraftig de siste årene, og det har blitt rapportert flere helseeffekter fra mat som inneholder levende mikroorganismer. Det er vanskelig å påvise probiotisk effekt i friske individer, derfor er forskning ofte utført på ulike pasientgrupper. (Goldenberg et al., 2013) Studier antyder at probiotika spiller en viktig rolle for blant annet immunologiske funksjoner og funksjoner i fordøyelsessystemet, og kan gi en helseeffekt, spesielt hos barn og høy-risikogrupper. Laktobaciller og bifidobakterier er de vanligste mikroorganismene som benyttes i probiotiske matvarer. Det finnes også andre mikroorganismer som anvendes, og markedet for probiotika øker kraftig (FAO, 2006).

Probiotika kan blant annet brukes som adjuvant i vaksiner, i tillegg til klinisk forebygging og behandling av for eksempel infeksjoner i GI-trakten, inflammatorisk tarmsyndrom og allergier (Borchers et al., 2009).

Figur 2.1: Mekaniser hos probiotiske bakterier som gir positive helseeffekter i verten. Probiotiske bakterier har flere egenskaper som gir økt helseeffekt i verten. De har evnen til å (1) forbedre intestinal epitelbarriere, (2) modulere immunrespons og (3) ekskludere eller inhibere patogener.



Probiotiske bakterier gir sannsynligvis positive helseeffekter hos verten av flere årsaker; visse probiotiske bakterier kan ekskludere eller inhibere patogener (Lebeer, Vanderleyden & De Keersmaecker, 2008; Servin, 2004). De kan også forbedre intestinal epitelbarriere ved å modulere ulike signalveier. Eksempelvis kan de forhindre apoptose (Yan et al., 2007), øke uttrykk av såkalte tight-junction proteiner (Seth, Yan, Pol & Rao, 2008) og påvirke induksjon av mucusproduksjon (Mach, Hyde & Hollingsworth, 2003). I tillegg har de evnen til å modulere immunrespons hos verten som kan gi lokal og systemisk effekt (Smits et al., 2005). Det er også vist at probiotiske bakterier kan kommunisere både med tarmfloraen gjennom kjemiske signaler, og med menneskeverter via hormoner og hormon-lignende kjemikalier. (Lebeer, Vanderleyden & De Keersmaecker, 2010; Hughes & Sperandio, 2008). Kommunikasjonsformene krever mer forskning, men er sannsynligvis viktige for probiotiske egenskaper.

Studier på dyr og *in vitro* på probiotiske bakterier viser lovende resultater. Imidlertid er sammenlignbare kliniske studier mindre overbevisende. Ulike studiedesign og variasjon av bruk av bakteriestammer gjør det svært vanskelig å trekke konklusjoner (Goldin & Gorbach, 2008).

2.2.2 *Lactobacillus reuteri*

L. reuteri er en obligat heterofermentativ art, som bruker den såkalte fosfo-ketolaseveien ved fermentering av sukkeret (Årsköld, 2008). *L. reuteri* er en kommensal art av laktobaciller og finnes hos ulike pattedyr, bl.a mennesker, gris, mus, rotter, hunder og sau, men også hos fjærkre. Arten har svært høy forekomst i griser, gnagere og kyllinger, i motsetning til hos mennesker hvor tilstedeværelsen ofte er relativt liten (Walter, Britton & Roos, 2010). Det er antageligvis GI-trakten som er primær habitat (Casas & Dobrogosz, 2000), men stammer av *L. reuteri* har også blitt isolert fra morsmelk og vagina hos dyr og mennesker (Oh et.al., 2010; Walter et.al.,2011). Type stammen *L. reuteri* DSM20016 har blitt isolert fra mennesker over flere måneder, og stammen blir ansett som vertsspesifikk til det menneskelige fordøyelsessystemet (Reuter, 2001). *L. reuteri*, som andre laktobaciller, krever flere ernæringskomponenter og belager seg på tilgjengelighet av fermenterbare karbohydrater, aminosyrer, vitaminer og nukleotider. Stammene vil vokse raskt hvis disse premissene er tilstedeværende. Bakterien kan få energi og øke sin egen vekstrate ved å bruke ytre elektronakseptorer som for eksempel fruktose og glyserol (Reid, 1999). Enkelte stammer av *L. reuteri* markedsføres kommersielt som probiotiske, og flere kliniske studier indikerer positive effekter (Weizmann et al.,2005; Augustina et al.,2012; Hunter et al., 2012). *L. reuteri* ATCC PTA 6475 isolert fra morsmelk hos mennesker, har anti-inflammatoriske egenskaper (Lin et al.,2008; Jones et al.,2011; Thomas et al.,2012) og er en probiotisk kandidat med lovende resultater i dyreforsøk (Eaton et al.,2011; Preidis et al., 2012; McCabe et al., 2013). Stammen er nylig lansert kommersielt i kombinasjon med *L. reuteri* DSM17938 (<http://www.biogaia.com/product/biogaia-gastrus>).

2.3 Fordøyelsessystemet hos mennesker

Fordøyelsessystemet (GI-trakten) hos mennesker går via munnen til endetarmsåpningen. Hver del i systemet har spesifikke oppgaver i fordøyelsen av mat. Samspillet mellom

mikroorganismer og verten, spesielt i magesekk og tarmsystem, er svært viktig for å

oppretholde en sunn og balansert bakterieflora. GI-

traktens deler spesielt relevant for bakterieflora

inkluderer munnhulen, svelget, spiserøret, magesekken,

tynntarmen (duodenum, jejunum og ileum), og

tykktarmen (tverrgående tykktarm, oppadgående

tykktarm, nedadgående tykktarm, S-formede tykktarm

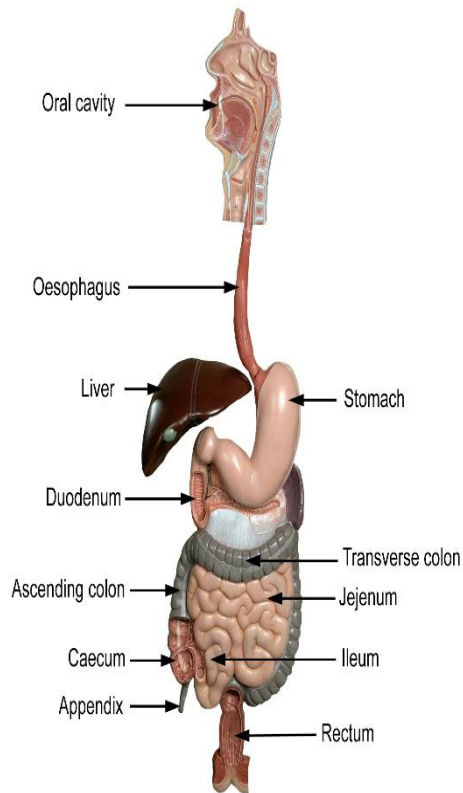
og endetarmen). GI-trakten er en dynamisk barriere og

kroppens største grenseflate til miljøet rundt seg

(Hirano et al., 2003). Den har evnen til å forsvare seg

mot bakterier, virus, sopp og parasitter som er patogene

(Gallo & Hooper, 2012).



Figur 2.2 Fordøyelsessystemet hos mennesker. Består av munnhulen, svelget, spiserøret, magesekken, lever, galleblære, milt, bukspyttkjertel, tynntarmen (duodenum, jejunum og ileum), tykktarmen (tverrgående tykktarm, oppadgående tykktarm, nedadgående tykktarm, S-formede tykktarm og endetarmen) og blindtarm.

2.3.1 Bakterief flora i tarmsystemet hos mennesker

Menneskekroppen er kolonisert av et komplekst fellesskap av ulike bakterier. Bakterief floraen

er essensielt viktig for god helse hos mennesker da den blant annet bidrar til fordøyelse av

mat og et funksjonelt immunsystem. Majoriteten av bakterief floraen hos mennesker består av

obligate anaerobe bakterier, der Bacteroidetes og Firmicutes dominerer. Det er estimert at

bakterief floraen i mennesker består av 10^{14} celler, det vil si rundt 10 ganger flere bakterieceller

enn menneskeceller (Eckburg et al., 2005; Sekirov et al., 2010), og tykktarmen alene

inneholder 70% av alle mikroorganismene i menneskekroppen. GI-trakten er rik på molekyler

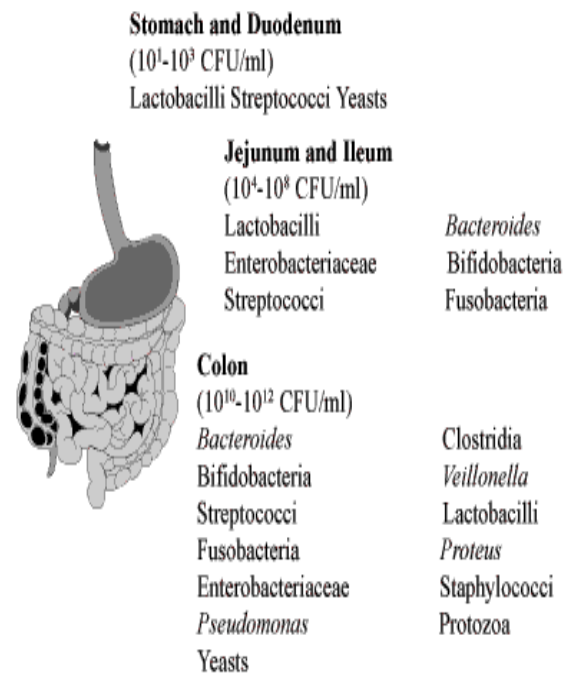
som kan bli brukt som næring til bakterier og er derfor et foretrukket sted for kolonisering

(Ley, Peterson & Gordon, 2006). Mer enn 50 bakterier er identifisert hvorav 10 av disse

koloniserer tykktarmen (Dethlefsen, McFall-Ngai & Relman, 2007; Zoetendal, Rajilic-

Stojnovic & de Vos, 2008).

Komposisjonen til bakteriefloraen avhenger av habitat, det er for eksempel stor forskjell mellom bakteriefloraen i tarmkanalen og bakterier som er festet til mucus-laget i GI-trakten (Frank et al., 2007; Swidsinski et al., 2005). Laktobaciller er tilstedeværende i hele GI-trakten i varierende omfang. De dominerer i den proksimale tynntarmen som er et næringsrikt miljø, sammen med blant annet andre MSB, i motsetning til i fekal mikroflora hvor laktobaciller har en tilstedeværelse på 0,01 - 0,6 % (Bongaerts & Severijne, 2001; Neville et al., 2012; Maukonen et al., 2008).

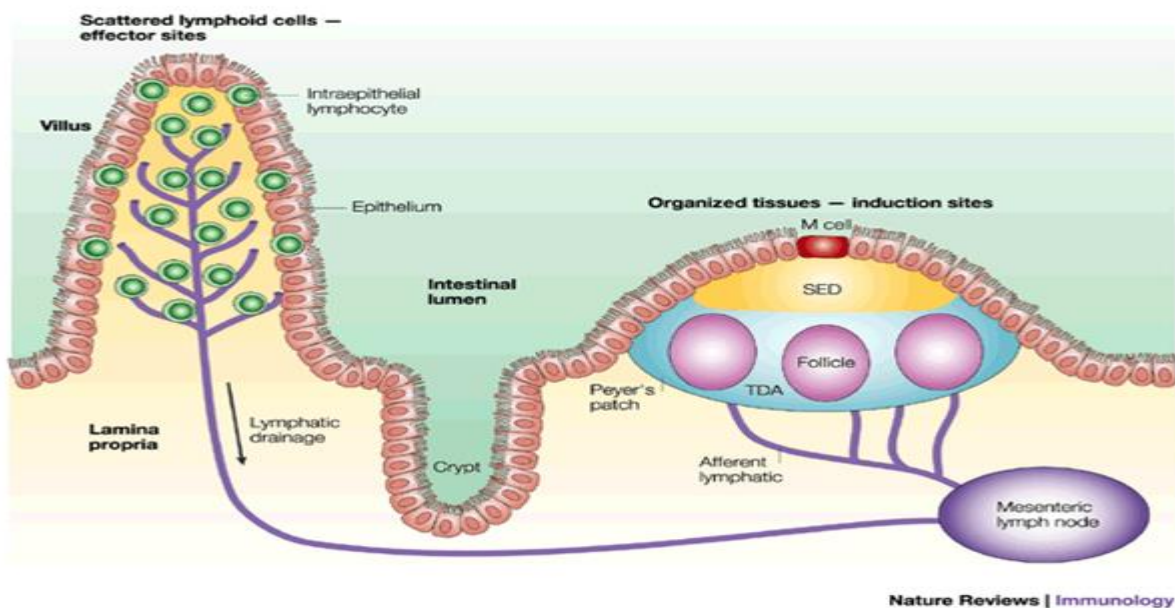


Figur 2.3 Oversikt over bakterieslekter, habitat og omfang i mage og tarm. Laktobaciller befinner seg i både magesekk, hele tynntarmen og tykktarm.

2.3.2 Samspill mellom bakterieflora og verten i GI-trakten

Det intestinale epitelet (IE), som består av et enkelt lag av intestinale epitelceller (IEC), utgjør den primære fysiske barrieren mellom tarmhulrommet og lamina propina, og separerer kommensaler bosatt i tarmen, fra underliggende sterile vev. Epitellaget er dekket av et beskyttende og tykt lag med mucus (slim). Tynntarmen er organisert i krypter og tarmtotter (villi) for å øke overflaten for absorpsjon. I kryptene finnes det pluripotente stamceller som produserer enten enterocytter, enteroendokrine celler eller goblet-celler. Enterocytter absorberer næringsstoffer i tynntarmen, og vann i tykktarmen. Enteroendokrine celler skiller ut enteriske hormoner, mens goblet-celler produserer mucin (Wells et al., 2011; Swidsinski et al., 2005). I tillegg til barrieren har epitelceller en immunregulatorisk rolle, som for eksempel sekresjon av antimikrobielle peptider, cytokiner og kjemokiner (Khoury, Floch & Hersh, 1969; Reikvam, 2011). IEC kan også respondere på mikrobiell stimuli, og gjenopprette barrierefunksjon dersom det er nødvendig. Samspillet mellom medfødte, adaptive immunceller og milliarder av mikroorganismer krever homeostase i GI-trakten for å fungere optimalt. Homeostase er tendensen en organisme eller celle har til å regulere sitt indre miljø, for å oppnå en balansert funksjon (Peterson & Artis, 2014). Såkalte tight junctions er dynamiske proteinstrukturer som binder IEC sammen og hjelper til med å opprettholde en

beskyttende barriere (Ulluwishewa et al., 2011). Mucus i tarmen består hovedsakelig av MUC2-mucin, og er O-glykosylert (Ouwerkerk et al., 2013). Det antas at mucin med O-glykan kan påvirke seleksjon av mikrobielt miljø i tarmen fordi bakterier uttrykker celleoverflate-adhesiner som er kompatible med disse glykaner i verten (Hansson, 2012; Juge, 2012). Mucin (slim) produseres av goblet-celler og former et fysiokjemisk beskyttende mucus-lag for de underliggende IEC (Swidsinski et al., 2005). I tykktarmen hos mennesker består dette laget av to lag hvor det ytre laget er løsere holdt sammen, mens det innerste laget er tett knyttet sammen og sterilt. Det er ikke kjent om det er to lag i tynntarmen og om dette laget eventuelt dekker de store overflatene av villi. Siden det er store forskjeller mellom tetthet og komposisjon av bakterier i tarmsystemet, er det grunn til å tro at det vil være ulikheter i lokasjonene når det kommer til interaksjoner mellom bakterier og epitelet (Remus, Kleerebezem & Bron, 2011). Mucin hjelper til i motvirkning av mekanisk, enzymatisk, kjemisk og mikrobiell ødeleggelse av den intestinale barrieren (Mack et al., 2003).



Figur 2.4 Kryptene og villi i tynntarmen. Epitelet danner en beskyttende barriere og separerer tarmhulrommet og lamina propina. Epitelet består av mucus som produseres av goblet-celler. Mucosa består av tarm-assosiert lymfoid vev som er hovedsete for forsvar mot fremmede smittestoffer og antistoffer. I kryptene befinner det seg pluripotente stamceller som produserer enterocytter, goblet-celler og enteroendokrine celler.

Forsøk *in vitro* med utvalgte *Laktobacillus*-stammer har vist at adhesjon av enteropatogene *E. coli* til humane IEC blir inhibert ved hjelp av induksjon av genuttrykk i intestinalt mucin (Mack et al., 1999). Intestinal mucosa (slimhinne) består av tarm-assosiert lymfoid vev (engelsk: gut-associated lymphoid tissue; GALT). GALT er hovedsetet for forsvar mot

fremmede smittestoffer og antistoffer. Peyers plakker (PP) er små lymfocytter i ileum og er dekket av et epitel som inneholder spesialiserte M-celler (leverer fremmedstoffer fra tarmen til makrofager som igjen fører til immunitet og utskillelse av immunoglobulin A (IgA). IgA er et antistoff som spiller en viktig rolle i immuniteten i slimhinnen (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008). Immuncellene kommuniserer med resten av immunsystemet via lokale mesenteriske lymfeknuter. Immunsystemet i tarmen må både være tolerant over bakteriefloraen for å ikke unødvendig aktivere immunrespons, samtidig som det må kontrollere og forhindre overvekst av bakterier for å opprettholde homeostase. Epitelet er dermed viktig for homeostase i GI-trakten ved å tillate kommensale mikroorganismer, men samtidig forhindre invasjon av patogener (Sekirov, 2009). Enkelte laktobaciller samarbeider med epitelet gjennom flere mekanismer. De kan bidra til å modulere immunrespons hos verten, bevarer barrieren og opprettholder mikrobiell balanse ved å produsere bakteriociner eller andre antimikrobielle forbindelser som ekskluderer patogener (Gallo & Hooper, 2012). Forbedring av epitelbarrieren forårsaket av laktobaciller er vist både *in vitro* og *in vivo*. (Garcia-Lafuente, 2001).

2.3.3 utfordringer for laktobaciller gjennom fordøyelsessystemet

Laktobaciller møter flere stressfaktorer i løpet av deres vei gjennom GI-trakten, som for eksempel lav pH, gallesalter og oksidativt eller osmotisk stress. Noen laktobaciller har utviklet sofistikerte responser eller tilpasninger for å overleve disse faktorene. pH i magesekken varierer fra 1,5 til mellom 3 og 5 avhengig av fasting eller matinntak, det er derfor essensielt for bakterier å ha egenskaper for å overleve lav pH i menneskelige verter. Gallesalt i tynntarmen er en annen utfordring for bakterier. Galle bistår både i nedbrytning av fett og beskyttelse mot overvekst av bakterier i tynntarmen (Cotter & Hill, 2003).

Laktobaciller har spesifikke responser avhengig av stamme og type stress. Ved påvirkning av lav pH eller galle er det påvist endringer i overflatestrukturer hos laktobaciller som en del av resistensmekanismene. Makromolekylene i celleveggen og cellemembranen i bakterier hjelper til med å opprettholde cellens funksjoner under disse stressfaktorene. Gallesalt og kolesterol har for eksempel blitt påvist i å indusere endringer i lipide cellemembran hos *L. reuteri* og lav pH har påvist å påvirke fettsyresammensetningen til en oral stamme av *L. casei* (Begley, Gahan & Hill, 2005; Taranto et al., 2003; Fozo, Kajfasz & Quivey Jr., 2004).

2.4 Bakteriell adhesjon til intestinale celler og mucus

Adhesjon av bakterier til GI-traktens slimhinne er en viktig faktor for kolonisering.

Adhesjonsmekanismer hos humane patogene bakterier har blitt nøye studert via modellsystemer *in vivo*. Caco 2, som er en human kolorektal adenokarsinom-cellelinje (form for kreft i epitelvev), immobilisering av intestinal mucus, kvantitative målinger og immunologisk deteksjon har blitt brukt som verktøy i å analysere adhesive egenskaper hos bakterier (Garmasheva & Kovalenko, 2005; Gueimonde et al., 2006). Det er likevel fremdeles begrenset kunnskap om overflatemolekyler i bakterieceller og dets evne til adhesjon til GI-traktens slimhinne (Buck et al., 2005). Evnen noen laktobaciller har til å adherere til IE er en viktig egenskap da det øker både kolonisering og oppholdstiden i GI-trakten. Bakterielle celle-overflatekomponenter (adhesiner, polysakkarider og proteiner) spiller en stor rolle i adhesjon, og kan bidra til eksklusjon av patogener og immunmodulering av vertsceller (Kravtsov et al., 2008; Vélez, De Keersmaecker & Vanderleyden, 2007). Egenskapene til bakteriene er knyttet til mekanismer i overflaten som er påvirket av strukturen og komposisjonen til celleveggen (Buck, Altermann, Svingerud & Klaenhammer, 2005; Granato et al., 1999). Bakterier har stor fleksibilitet i arkitekturen i celleoverflaten og er kjent for å modifisere egne egenskaper som en respons til miljøendringer. Forskjellige makromolekyler i celleveggen bidrar til å opprettholde celleveggen ved påvirkning av ulike stressfaktorer (Taranato et al., 2003; Fozo, Kajfasz & Quivey Jr., 2004). Celleoverflateproteiner hos laktobaciller er enten festet til celleveggen via ulike mekanismer, eller skilt ut til omgivelsene fra bakteriecellen, for så å bli gjenforent med celleveggen via elektrostatiske interaksjoner. Celleoverflateproteiner inkluderer såkalte S-layerproteiner, de utgjør de store cellulære proteinene som omgir cellen (Båth et al., 2005; Lorca et al., 2002). S-layerproteiner former den ytterste overflaten i ulike stammer av laktobaciller, og har evnen til å oppføre seg som adhesiner til epitelceller og mucus (Chen et al., 2007). Kovalente festede proteiner består videre av N – eller C – terminalt ankrede, lipoproteiner og proteiner med såkalt cellevegganker og LPxTG-motiv. N-terminalt ankrede proteiner er den største gruppen av celleoverflate-bundet proteiner i laktobaciller og er blant annet involvert i metabolisme i cellemembran og celleveggen, extracellulær transport og signaltransduksjon (Kleerebezem et al., 2010; Chen et al., 2007). N-terminalt ankrede proteiner har ofte et YSIRK-G/S-motiv i signalsekvensen som fremmer sekresjon (Bae & Schneewind, 2003) og fører proteinet til en spesifikk lokalisasjon i overflaten (DeDent et al., 2008). C-terminalbundet protein er linket til cellemembranen ved hjelp av C-terminale transmembrandomener. Lipoproteiner er blant annet involvert i adhesjon, transport, antibiotikaresistens og homeostase i cellemembranet og celleveggen (Kleerebezem et al.,

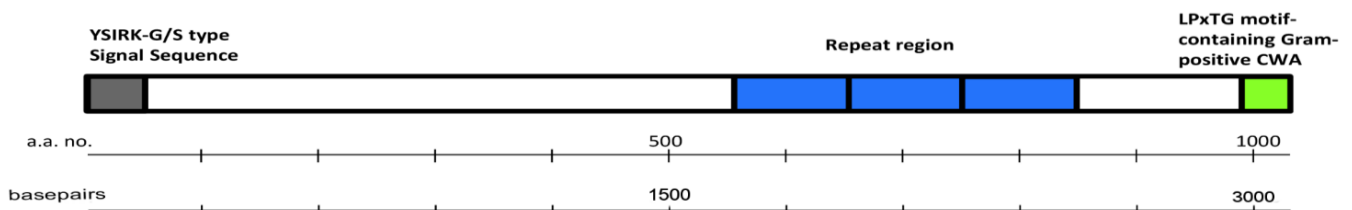
2010). LPxTG-festede eller sortaseavhengige proteiner (SDPer) er kovalent bundet til peptidodoglykanet (PG) i celleveggen hos bakterier. De inneholder vanligvis et kuttese, et LPxTG-motiv, en region av hydrofobiske komponenter og en positivt ladet hale (Marraffini, Dedent & Schneewind, 2006). Sortase A (SrtA) gjenkjenner LPxTG-motivet, kutter det mellom rester av T og G, og fester deretter treonin-delen til PG i celleveggen (Navarre and O. Schneewind, 1994). Adhesjonsmekanismer til mucus hos laktobaciller involverer mucus-bindende proteiner (Mub). Mub har den typiske strukturen til celleoverflateproteiner (N-terminale signalpeptider og C-terminal LPxTG-motiv), i tillegg deler de et mucus-bindende domene. Mub er kodet av spesifikke klynger av ortologe proteinkodende gen (LaCOG), og inneholder én eller flere repetisjoner. Slike repetisjoner er vanlige i Mub-gener hos laktobaciller som befinner seg i GI-trakten, noe som kan tyde på at repetisjoner av Mub er en evolusjonell overlevelsesmekanisme. Mub-domenet består av en rekke aminosyrerester (aminosyrer som sitter i peptider eller proteiner) som varierer i størrelse fra 100 til 200 rester per domene (MacKenzie et al., 2010) Studier har vist at Mub og Mub-liknende proteiner bidrar til mucus-binding, og mye tyder på at ulikheter i bakteriestammer resulterer i stamme-spesifikk diversitet ved adhesjon til mucus (Boekhorst et al., 2006).

2.4.1 Celle – og mucusbindende protein A (CmbA)

Det finnes flere adhesiner i *L. reuteri*, og flere overflateproteiner er beskrevet i studier (Roos et al., 1996; Rojas et al., 2002). I 2002 ble det oppdaget et Mub i *L. reuteri* 1063 (Roos & Jonsson, 2002). Andre overflateproteiner i *L. reuteri* bidrar også til adhesjon og inkluderer blant annet et såkalt high-molecular-mass overflateprotein (Lsp) og metionin-sulfoksyd-reduktase B (MsrB). Begge bidrar til overlevelse og økologisk ytelse i tarmen til mus (Walter et al., 2005). *Lactobacillus reuteri* ATCC 6475 har blant annet høy adhesjonsevne til mucus (MacKenzie et al., 2010). Jensen et al (2014) viste at et SDP i *L. reuteri* 6475, som kodes av genet *hmpref0563_10633*, spiller en viktig rolle i evnen til å adherere til mucus og IEC. Stammen har fem antatte SDP-gener og ett gen for et antatt C-terminalt celleoverflate-protein, lignende et SDP, men uten LPxTG-motiv. Såkalte «knock-out» (KO)-mutanter, dvs inaktivering, av alle disse genene ble konstruert i dette studiet. Kun varianten der genet *hmpref0563_10633* var mutert viste redusert adhesjon til både IEC og mucus. Proteinene som genet koder for ble derfor navngitt som celle- og mucusbindende protein A (CmbA). En KO-mutasjon av genet som koder for SrtA viste en signifikant redusert adhesjon til Caco-2 og mucus, et resultat som styrker teorien om at SDPer er involvert i adhesjon. Ifølge

annoteringen av genomet til *L. reuteri* 6475 er CmbA et protein med 1030 aminosyrer og inneholder en N-terminal YSIRK-G/S-signalpeptid og et C-terminalt LPxTG-motiv etterfulgt av en hydrofobisk transmembran-heliks og en positivt ladet hale (Jensen et al., 2014).

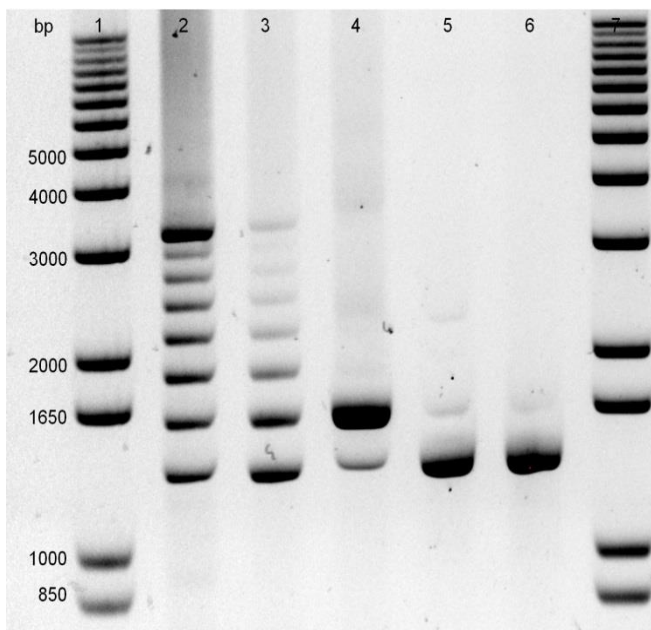
Proteinet har videre en repetert region på 95 aminosyrerester (tilsvarende 285 basepar) i den andre halvdel (se Figur 2.5).



Figur 2.5 Skjematisk illustrasjon av CmbA-proteinet. Grå region: N-terminal signalsekvens med YSIRK-G/S motiv. Blå region: Repetitivt område, her vist med tre regioner (CmbA3). Grønn region: C-terminal såkalt cellevegg anker-region (Cell Wall Anchor, CWA) med LPxTG-motiv; a.a. no., aminosyreposisjoner; basepairs, baseparposisjoner i tilsvarende gen, *cmbA*.

Jensen et al (2014) gjorde videre en overraskende observasjon i dette *cmbA*-genet da det ble oppdaget at kloning av genet resulterte i en kortere baseparlengde enn forventet. Sekvensering viste at *cmbA* kun hadde en tandem-repetert region. Annoteringen av den nærbeslektede stammen *L. reuteri* JCM1112 (=DSM20016) viste imidlertid 5 repeterte regioner, så det antas at gen-variasjon forekommer (Jensen et al., 2014). Variasjonen så imidlertid ut til å finne sted ikke bare mellom stammer, men også innen samme stamme. I en uavhengig studie gjort på samme tid av Etzold et al. (2014) ble CmbA-proteinet undersøkt biokjemisk (i denne studien ble proteinet kalt LAR_0958, etter genlocus i stamme JCM1112/DSM20016). Denne studien viste blant annet at adhesjon til mucus ble redusert ved tilstedeværelse av et antistoff rettet mot et peptid tilsvarende den repeterte regionen. Denne regionen har en divergerende Ig-liknende såkalt β -sandwich-fold, og har en liknende strukturell homologi som det Ig-liknende interrepeterte domenet har i internalin (internalin finnes i *Listeria monocytogenes*). Også Etzold et al. (2014) observerte at det så ut til å være såkalt «intra-strain» variasjon i den repeterte regionen, dvs. en variasjon innen hver stamme. De fant en genetisk variasjon ved *cmbA*-lokus med 1-5 repeterende regioner i *L. reuteri* ATCC PTA 5289, 1-9 repeterende regioner i 6475, 1-10 repeterende regioner i DSM20016 og 1-14 repeterende regioner i LMS11-3. Antall repeterte regioner ble antatt å korrelere med bindingen til mucus, men dette ble aldri vist. I studien av Jensen et al. (2014) ble det vist at kun én av de repeterte regionene i det klonede genet var nok til å gjenopprette adhesjon til IEC i KO-mutanten. Jensen, Rud &

Axelsson (upublisert) antok videre at vekstbetingelser kunne ha betydning for variasjonen. For å illustrere dette fenomenet ble kultur fra både buljong og agar benyttet og cellene analysert for repetert region i *cmbA* ved PCR. Den dominante typen av *cmbA* i *L. reuteri* 6475 fra buljong ga et fragment på 1300-1350 basepar og indikerte en tilstedeværelse av hovedsakelig én repetert region. I agar ble det derimot observert opptil 8 slike regioner, der også antall regioner så ut til å være tilfeldig og varierende, se Figur 2.6 (Jensen, Rud & Axelsson, upublisert).

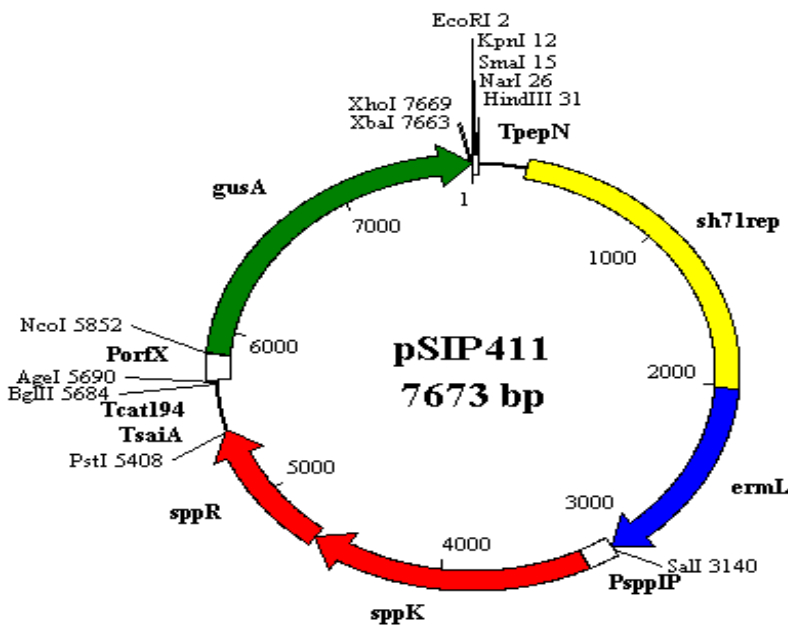


Figur 2.6 Tandem-repeterende region i *cmbA*. PCR-analyse av tandem-repetert region i *cmbA* fra *L. reuteri* ATCC PTA 6475, dyrket opp MRS-buljong og agar. Den 3'-enden i *cmbA* ble amplifisert og forventet størrelse av PCR-produktene (primere: *cmbA*-f2 og *cmbA*-r2) indikerte 1 til 8 tandem-repeterte regioner på hhv 1325, 1613, 1901, 2189, 2477, 2765, 3053 og 3341 basepar. Brønn 1 og 7: 1 kb DNA-ladder. Brønn 2-4: Tre separate kolonier av 6475 isolert fra agar. Brønn 5-6: To separate kulturer av 6475 fra buljong (bilde fra Hanne Jensen, upublisert).

2.5 Induserbart ekspresjonssystem for laktobaciller: pSIP-systemet

Vektorer har blitt utviklet for induserbart genuttrykk i laktobaciller hvor dette er drevet av sterke, regulerte promotorer fra bakteriocin-operoner. Vektorene har et modulært design som muliggjør enkel utveksling av alle vesentlige komponenter; det relevante genet, induserbar promoter, det regulatoriske systemet, antibiotikaresistens-markører og replikonet (Sørvig et al., 2005). Dette såkalte pSIP-systemet ble utviklet ved Nofima på Ås og studier viser gode resultater (Axelsson et al., 2003; Sørvig et al., 2003; Sørvig et al., 2005). pSIP-systemet benytter regulatoriske gener som er involvert i produksjonen av klasse IIA bakteriocinene sakacin A og P, og det induserende peptid-feromonet uten antimikrobiell aktivitet. Dette systemet bruker et to-komponent-system med histidin kinase og responsregulator. Vektorene som anvender dette to-komponent-systemet har induserbare bakteriocin-promoterer som kan kobles til det genet

som skal uttrykkes (Sørvig et al., 2003). Promotorene induseres ved tilsats av et spesifikt peptidferomon der signalet overføres via histidin-kinasen og responsregulatoren. Ved bruk av β -glucuronidase (*GusA*) og aminopeptidase (*PepN*) som reporterer ble det vist at de beste vektorene gir induserbar feromon-avhengig genuttrykk på høyt nivå (Sørvig et al., 2005). Jensen et al. (2014) benyttet vektoren pSIP411 (se Figur 2.7) da *cmbA* fra *L. reuteri* 6475 ble klonet og uttrykt i KO-mutanten *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻.



Figur 2.7 Plasmidkart over vektoren pSIP411. En vektorvariant i pSIP-systemet. I dette tilfellet utgjør *sppKR* de regulatoriske genene og *PoriX* (=P*sppQ*) den induserbare promotoren. Genet *gusA* er reporter-gen, *sh71* er replikeringsdel og *ermL* er erytromycinresistensgen (seleksjonsmarkør). *gusA* erstattes med relevant gen når vektoren skal benyttes for kloning og ekspresjon.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Det ble benyttet standard laboratorieutstyr som: Falconrør, eppendorfrør, reagensrør, mikropipetter, pipettespisser, glassutstyr, podeøser og petriskåler i forsøkene. Se 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 og 3.5 for detaljert oversikt over kits, stammer, plasmider, programvare, materialer og løsninger.

Tabell 3.1 Oversikt over kits

Kit	Detaljer	Leverandør
QIA prep Spin Mini Kit	Se prosedyre 3.2.3	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Se prosedyre 3.2.6	Qiagen
TOPO TA kloningskit	Se prosedyre 3.2.8	Invitrogen, Life Technologies

Tabell 3.2 Stammer og plasmider

Stammer og plasmider	Relevant informasjon og egenskaper	Referanse
Stammer		
<i>Lactobacillus reuteri</i>		
6475	ATCC PTA 6475 (tidligere betegnelse: MM4-1A). Villtype, isolert fra human morsmelk.	Oh et al., 2010
6475 <i>cmbA</i> ⁻	Variant av 6475. Nonsens mutasjon i <i>cmbA</i> (<i>hmpref0536_10633</i>), som koder for et hypotetisk overflateprotein med et såkalt LPxTG motiv.	van Pijkeren & Britton 2012; Jensen et al., 2014
6475 <i>cmbA</i> ⁻ (pSIP- <i>cmbA</i>)	Variant av 6475 <i>cmbA</i> ⁻ . Inneholder plasmidet pSIP- <i>cmbA</i> .	Jensen et al., 2014
DSM20016	Typestamme for <i>L. reuteri</i> . Isolert fra human tarm.	Kandler et al. 1980
DSM17938	Kommersiell probiotisk stamme (BioGaia, Sverige). Kurert variant av ATCC55730, human morsmelk.	Rosander et al., 2008
<i>Lactococcus lactis</i>		
MG1363	Kloningsvert, plasmidfri.	Gasson, 1983
MG1363(pSIP411)	Kilde for plasmid pSIP411	Sørvig et al., 2005
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Kloningsvert (TOPO TA kloningskit).	Life Technologies
TG1(pSIP411)	Kilde for plasmid pSIP411	Lars Axelsson
PK401	Kloningsvert. <i>dam</i> metylase negativ (egner seg som mellomvert for plasmider med pSH71 replikon, f eks pVS2 og pSIP411).	Stefan Roos, Uppsala, Sverige
PK401(pVS2)	Kilde for plasmid pVS2	Stefan Roos, Uppsala, Sverige

Plasmider		
pUC57-cmbA3	Vektor pUC57 med syntetisk framstilt gen <i>cmbA3</i> . Gir ampicillin-resistens. Levert av GenScript Inc., USA.	Dette arbeidet
pUC57-cmbA4	Vektor pUC57 med syntetisk framstilt gen <i>cmbA4</i> . Gir ampicillin-resistens. Levert av GenScript Inc., USA.	Dette arbeidet
pSIP411	Expresjonsvektor for laktobaciller. Gir erytromycinresistens.	Sørvig et al., 2005
pSIP- <i>cmbA</i>	pSIP411 derivat med <i>cmbA1</i> under kontroll av promoter P _{sppQ}	Jensen et al., 2014
pVS2	Kontrollplasmid for transformasjon. Gir kloramfenikolresistens.	von Wright et al., 1987

Tabell 3.3 Oversikt over programvare

Programvare	Detaljer	Leverandør
Nanodrop-1000 software	UV-absorbans ble målt i alle plasmider fra prosedyre 3.2.3	Thermo scientific
BioEdit 7.1.3	Sequence Alignment Editor Se prosedyre 3.2.10	Ibis Biosciences

Tabell 3.4 Oversikt over utstyr

Utstyr	Detaljer	Leverandør
Elektroporeringskyvetter	0,2cm. Brukt i prosedyre 3.2.8	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Certoklav-Trich-Autoclav	Certoklav sterilizer. Gambatt (CV-EL 12L/18L). A-4050 Brukt i prosedyre 3.1.1	Østerrike
Cryorør	2ml. Brukt i prosedyre 3.2.1	VWR, Tyskland
Elektroforese-kar Elektroforese-strøm	POWERPAC TM BASIC. Brukt i prosedyre 3.2.4	Bio-Rad, Italia
Filter	Millex-HV filter, 0,22 µm. Gamma sterilized. Se 3.1.1	Millipore
Fryser	Forma -80 ULT fryser. Brukt for lagring av frysestock og prøver	Thermo Scientific, USA
Inkubatorskap	30 og 37 °C. Brukt i prosedyre 3.2.2	Termaks
NanoDrop	ND-1000 spektrofotometer	Saveen Werner
PCR-brett	MicroAmp Optical 96 well reactionplate Brukt i prosedyre 3.2.9	Applied biosystems, Kina
Sekvenserings-brett	MicroAmp Optical 96 well reactionplate Brukt i prosedyre 3.2.10	Applied biosystems, Kina
PCR-maskin	Veriti 96 well Thermal cyclers Brukt i prosedyre 3.2.9	Applied biosystems, Singapore
Sekvenserings-maskin	ABI PRISM 3130XL Genetic	Applied biosystems,

	Analyzer Brukt i prosedyre 3.2.10	HITACHI
Sentrifuge til PCR-brett	Brukt i prosedyre 3.2.9	HEREAUS
Sentrifuge til sentrifugerør	Brukt i prosedyre 2.2.8	HEREAUS
Sentrifugerotor	Brukt i prosedyre 2.2.8	HEREAUS
Spektrofotometer	Brukt i prosedyre 3.2.2, 3.2.11.1, 3.2.11.2 og 3.2.12.2	VWR, Kina
Gel Doc™ EZ Imager	Fotoutstyr til avlesning av agarosegeler Brukt i prosedyre 3.2.4	Bio-Rad, Italia
Vannbad	GFL	-
WASP WASP digitalrister WASP tellemaskin WASP vakuumpumpe	Whitley Automated Spiral Plater M23 digitalrister Protocol 2, sybnosis Whitley Vacuum Source 602. Brukt i prosedyre 3.2.12.2	DW Scientific

Tabell 3.5 Oversikt over løsninger

Løsninger	Detaljer	Leverandør
Enzymer og restriksjonsenzymer		
Lysozym	Brukt i prosedyre 3.2.3. 40 mg/ml. Lagret ved -20°C.	Sigma Aldrich, Tyskland
Mutanolysin	Brukt i prosedyre 3.2.3. Løst i dH ₂ O til sluttkonsentrasjonen 5000 U/ml. Lagret ved -20°C	Sigma Aldrich, Tyskland
T4 DNA ligase	Brukt i prosedyre 3.2.7 Lagret ved -20°C	Promega Biotech AB, Nacha, Sverige
Trypsin	Brukt i prosedyre 3.2.12.1 Lagret ved -20°C	ThermoFischer Scientific
NcoI	Brukt i prosedyre 3.2.5 Lagret ved -20°C	New England BioLabs Inc
XhoI	Brukt i prosedyre 3.2.5 Lagret ved -20°C	New England BioLabs Inc
AatII	Brukt i prosedyre 3.2.5 Lagret ved -20°C	New England BioLabs Inc
Antibiotika		
Erytromycin	Se 3.1.1 Lagret ved -20°C	Sigma Aldrich, Tyskland
Ampicillin	Se 3.1.1 Lagret ved -20°C	Sigma Aldrich, Tyskland
Kloramfenikol	Se 3.1.1 Lagret ved -20°C	Sigma Aldrich, Tyskland
Pen/Strep	Brukt i prosedyre 3.2.12.1 Lagret ved -20°C	ThermoFisher Scientific
Medier		

de Man Rogosa and Sharpe (MRS)	Se 3.1.1. Buljong og agar	Oxoid, Hampshire, UK
BHI	Se 3.1.1. Buljong og agar	Oxoid, Hampshire, UK
M17	Se 3.1.1. Buljong og agar	Oxoid, Hampshire, UK
Luria-Bertani (LB)	Se 3.1.1. Buljong og agar	Oxoid, Hampshire, UK
DMEM med 4,5 g/L glukose	Brukt i prosedyre 3.2.12.1 og 3.2.12.2. Lagret ved +4°C	ThermoFisher Scientific
Buffere		
Tris-HCl	Se 3.1.1	Sigma Aldrich
TAE-buffer	Brukt i prosedyre 3.2.4 50x. Lagret ved romtemperatur.	-
TBE-buffer	Brukt i prosedyre 3.2.4 5x. Lagret ved romtemperatur.	-
TE-buffer	Brukt i prosedyre 3.2.3 og 3.2.9	-
T4 DNA-ligasebuffer	Brukt i prosedyre 3.2.7 Lagret ved -20°C	Promega Biotech AB, Nacha, Sverige
DNA Loading Dye	Brukt i prosedyre 3.2.4 6X loading buffer. Lagret ved -20°C.	Thermo Scientific, Litauen
Buffer 4	Brukt i prosedyre 3.2.5 Lagret ved -20°C	New England BioLabs Inc
Kjemikalier og diverse løsninger		
>99% Glyserol	Brukt i prosedyre 3.2.1	Merck, Tyskland
MOPS	Brukt i prosedyre 3.2.11. 2 og 3.2.12.2	Sigma Aldrich, Tyskland
NaCl	Brukt i prosedyre 3.2.4	Merck, Tyskland
KCl	Se 3.1.1	Merck, Tyskland
MgCl ₂	Se 3.1.1	Merck, Tyskland
CaCl ₂	Se 3.1.1	Merck, Tyskland
Glukose	Se 3.1.1	Merck, Tyskland
Sukrose	Se 3.1.1	Merck, Tyskland
Glycin	Se 3.1.1	Sigma, Tyskland
EtOH	Brukt i prosedyre 3.2.7 og ellers for renhold	Arcus produkter AS, Oslo, Norge
BSA	Brukt i prosedyre 3.2.5 Lagret ved -20°C	Life Technologies™
Natriumacetat (NaAc)	Brukt i prosedyre 3.2.7	Merck, Tyskland
Steril 1X Dullbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS)	Brukt i prosedyre 3.2.12.1 og 3.2.12.2	ThermoFisher Scientific
Mucin	Brukt i prosedyre 3.2.11.1, 3.2.11.2 og 3.2.12.2 Fra grisemage.	Sigma Aldrich, Tyskland
Gallesyre	Brukt i 3.2.11.1, 3.2.11.2 og 3.2.12.2. Bile Acid Porcine.	Sigma Aldrich, Tyskland
Bacto-trypton	Se 3.1.1	Oxoid, Hampshire, UK
Bacto gjærekstrakt	Se 3.1.1	Difco Lab, USA
Agarose no.1	Brukt i prosedyre 3.2.4	Bio-Rad Laboratories,

		Hercules, California, USA
Gelred TM Nucleic Acid Stain	Brukt i prosedyre 3.2.4 Lagret ved romtemperatur	Biotium
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Brukt i prosedyre 3.2.4 Molekylvektstandard. 10 000x i vann. Lagret ved -20°C	Thermo Scientific, Litauen
EDTA	Brukt i prosedyre	Merck, Tyskland
FCS	Brukt i prosedyre 3.2.12.1 og 3.2.12.2 Tilsetning i DMEM med 4,5 g/L glukose.	ThermoFisher Scientific
NEAA	Brukt i prosedyre 3.2.12.1 og 3.2.12.2 Tilsetning i DMEM med 4,5 g/L glukose.	ThermoFisher Scientific
SppIP Induksjonspeptid for pSIP ekspresjonssystem	Brukt i prosedyre 3.2.12.2 Lagret ved -20°C.	Sørvig et al., 2003
dH ₂ O	Brukt i prosedyre 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.7, 3.2.8, 3.2.9 og 3.2.10	Millipore

3.1.1 Tillaging av medier og løsninger

Oppskrifter på medier, buffere, kjemikalie og diverse løsninger

Alle medier ble sterilisert i autoklav på enten 121°C eller 115°C i 15 minutter. Alle mediene ble avkjølt til +45°C før de eventuelt ble tilsatt adekvat antibiotika. Agar ble helt ut i petriskåler og oppbevart ved +4°C, buljong ble oppbevart i romtemperatur.

de Man Rogosa and Sharpe (MRS)-agar

24,8 g agar ble løst i 400 ml dH₂O og autoklavert i +115°C i 15 minutter.

MRS-buljong

20,8 g buljong ble løst i 400 ml dH₂O og autoklavert i +115°C i 15 minutter.

Ev. erytromycin tilsatt agar eller buljong til en konsentrasjon på 10 µg/ml ved ~ +5°C. Ev. kloramfenikol tilsatt til en konsentrasjon på 10 µg/ml ved ~ +45°C.

MRS-MOPS-buljong

23, 23 g ble løst i 100 ml MRS-buljong og sterilfiltrert (0,22 µm).

MRS-MOPS-buljong med mucin eller bile

0,25% mucin eller bile ble løst i MRS-MOPS-buljong og sterilfiltrert (0,22 µm).

Brain Heart Infusion (BHI)-agar

18,8 g agar ble løst i 400 ml dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter. Ev. erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 10 µg/ml ved ca ~ +45°C. Ev. ampicillin tilsatt til en konsentrasjon på 50 µg/ml ved ~ +45°.

BHI-buljong

14,8 g buljong ble løst i 400 ml dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter.

Ev. erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 10 µg/ml ved ~ +45°C. Ev. ampicillin tilsatt til en konsentrasjon på 50 µg/ml ved ~ +45°C

Luria-Bertani (LB)-agar

10 g Bacto-trypton, 5 g Bacto gjærekstrakt, 10 g NaCl ble løst i 1 liter dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter. Ev. kloramfenikol tilsatt til en konsentrasjon på 20 µg/ml ved ~ +50°C

LB-buljong

10 g Bacto-trypton, 5 g Bacto gjærekstrakt, 10 g NaCl ble løst i 1 liter dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter. Ev. kloramfenikol tilsatt til en konsentrasjon på 20 µg/ml ved ~ +50°C

GM17-agar

9,65 g M17-agar og 1 g glukose ble løst i 200 ml dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter. Ev. erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 10 µg/ml ved ~ +50°C. Ev. ampicillin tilsatt til en konsentrasjon på 150 µg/ml ved ~ +50°

GM17-buljong

7,45 g M17 buljong og 1 g glukose ble løst i 200 ml dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter. Ev. erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 10 µg/ml ved ~ +50°C. Ev. ampicillin tilsatt til en konsentrasjon på 150 µg/ml ved ~ +50°.

GM17S-buljong

7,45 g M17 buljong og 34,23 g sukrose ble løst opp i 200 ml dH₂O og sterilfiltrert (0,22 µm).

GM17S-buljong med 2% glycin

7,45 g M17 buljong og 34,23 g sukrose ble tilsatt 4 g glycin og løst opp i 200 ml dH₂O. Sterilfiltrert (0,22 µm).

SOC-medium

20 g Bacto-trypton, 5 g Bacto gjærekstrakt, 0,5 g 1M NaCl og 0,02 g 1M KCl ble løst i 1 liter dH₂O og sterilfiltrert (0,22 µm).

Rekonstitusjonsmedium med 20mM MgCl₂ og 2mM CaCl₂

100 ml GM17S-buljong ble tilsatt 100 µl 2M MgCl₂ og 200 µl 0,1M CaCl₂ og sterilfiltrert (0,22 µm).

0,5M sukrose-10% glyserol

34,23 g sukrose og 20 ml glyserol ble løst i 200 ml dH₂O og sterilfiltrert (0,22 µm).

5xTBE-buffer

500 ml TBE-buffer ble løst i 4,5 liter dH₂O, lagret ved romtemperatur.

50xTAE-buffer

20 ml TAE-buffer ble løst i 1 liter dH₂O, lagret ved romtemperatur.

0,7% Agarosegel

1,4 g agarose ble løst i 200 ml TBE-buffer eller TAE-buffer. Kokt i mikrobølgeovn og lagret ved +50°C inntil støping av agarosegel.

TE-buffer

1 ml 10 mM Tris-HCl pH 8.0 og 2 ml 0,1 mM EDTA ble løst i 1 liter dH₂O. Lagret ved romtemperatur.

1/10 TE-buffer

Fortynnet 10x i dH₂O og lagret ved romtemperatur.

70% EtOH

70 ml 96% rektifisert Etanol ble løst i 30 ml dH₂O. Lagret ved romtemperatur.

10% glyserol

100 ml >99% glyserol ble løst i 900 ml dH₂O og autoklavert ved +121°C i 15 minutter. Lagret ved +4°C

Sterilt dH₂O

1 liter MilliQ-vann autoklaveres ved +121°C i 15 minutter. Lagret ved +4°C

20 % DMEM-cellemedium

100 ml varmeinaktivert FCS, 5ml NEAA og 5ml Pen/Strep* ble løst i 500ml DMEM med 4,5 g/L glukose.

*20% DMEM-medium ble brukt uten antibiotika i adhesjonsforsøket.

3.2 Metoder

3.2.1 Frysestokk

200 µl glyserol ble tilsatt 800 µl bakteriesuspensjon og deretter lagret ved -80°C.

3.2.2 Dyrking av bakteriestammer

Bakteriestammer ble dyrket fram fra frysestokk (se prosedyre 3.2.1) ved utstrykning på adekvat agarskål og inkubert anaerobt i 1 døgn ved +37°C*. Etter inkubering ble en koloni podet over i 5 ml adekvat buljong og inkubert aerobt, uten risting**, i 1 døgn ved +37°C. I noen prosedyrer ble 50 µl bakteriekultur inokulert i friskt adekvat medium og inkubert videre i 1 døgn ved +37°C.

*M17-medium, d.v.s. kulturer/skåler med *Lc. lactis*-bakterier, ble inkubert i 1 døgn ved +30°C.

**BHI-buljong, d.v.s. kulturer med *E. coli*-bakterier, ble inkubert på risting.

3.2.3 Isolering av plasmid

Plasmid fra *E. coli* TGI (pSIP411) og *E. coli* PK401(pVS2) ble isolert med QIA prep Spin Mini Kit (Qiagen) hvor produsentens prosedyrer ble fulgt. Stammene ble dyrket opp over natt i +37 °C, ved risting, i 5 ml BHI-medium med 200 µg/ml erytromycin. 1,5 ml kultur ble brukt for plasmidisolering der plasmidet til slutt ble eluert med 50 µl 1/10 TE-buffer. Rørene ble merket og lagret ved +4°C for senere bruk. Plasmid fra *Lactobacillus* og *Lactococcus* ble isolert med QIA prep Spin Mini Kit (Qiagen) hvor produsentens prosedyrer ble fulgt med et trinn for lysering lagt inn som modifisering som beskrevet nedenfor.

Lc. Lactis MG1363(pSIP411) ble dyrket opp i GM17-medium tilsatt 10 µg/ml erytromycin.

L. reuteri 6475 *cmbA*⁻ og DSM17398 ble dyrket opp i MRS-medium med 10 µg/ml erytromycin. 1,5 ml kultur ble sentrifugert. Bakteriene ble resuspendert i 250 µl P1-buffer, 240 µl lysozym (40mg/ml i P1 buffer) og 10 µl mutanolysin (5000 U/ml), og inkubert ved +37 °C i 60 minutter. Videre ble produsentens prosedyre igjen fulgt. DNA-plasmidene ble eluert med 50 µl 1/10 TE-buffer. Rørene ble merket og lagret ved +4°C for senere bruk. Alle plasmider ble analysert ved hjelp av gelelektroforese (se prosedyre 3.2.4) for å sjekke DNA-utbytte, UV-absorbans ble også målt i alle plasmider ved hjelp av NanoDrop1000 (Thermo scientific).

3.2.4 Agarose gelelektroforese

For beskrivelse av gelelektroforese henvises det til Sambrook et al. (1989). Agarosegelen ble kjørt på elektroforese-kar fra Bio-Rad på 85V i 1 time. Agarosegelen ble først kjørt med

1XTBE-buffer (på forhånd tilsatt 6µl Gelred™ til 60 ml agarosegel). Det ble etter hvert besluttet å bytte til 1xTAE-buffer (farget med 30 µl Gelred™, 2 ml NaCl og 100 ml dH₂O i etterkant). Ved alle analyseringer ble det laget en analytisk agarosegel med 6 µl løsning med DNA (fragment, plasmid og PCR-produkt) blandet med 4 µl DNA Loading Dye, og 10 µl molekylvektstandard. For prosedyre 3.2.6 ble det laget en preparativ agarosegel med 50 µl isolert løsning med DNA, blandet med 10 µl DNA Loading Dye, og 10 µl molekylvektstandard. Agarosegelene ble analysert ved hjelp av Gel Doc™ EZ Imager fra Bio-Rad.

3.2.5 Kutting med restriksjonszymer

Restriksjonszymer bindes spesifikt og kutter dobbeltrådet DNA i spesifikke seter kalt restriksjonsseter. For beskrivelse av restriksjonszymer og restriksjonskutting henvises det til Sambrook et al (1989). Plasmidene ble kuttet med restriksjonszymer for å analysere størrelsen på DNA-fragmentene. Se tabell 3.6 for restriksjonsblanding. Løsningen ble inkubert ved +37°C over natt og siden kjørt på gelektroforese (se prosedyre 3.2.4) for analysering.

Tabell 3.6. Restriksjonsblanding

Analytisk agarosegel	Preparativ agarosegel
5 µl plasmidprep 2,5 µl Buffer 3 1 µl NcoI 1 µl XhoI 15,5 µl dH ₂ O 0,25 µl 100 µg/µl BSA Totalt 25 µl	25 µl pUC57- <i>cmbA3</i> eller pUC57- <i>cmbA4</i> 5 µl Buffer 4 2 µl NcoI 2 µl XhoI 2 µl AatII* 16 µl dH ₂ O 0,25 µl 100 µg/µl BSA Totalt 50 µl
1 µl pUC57- <i>cmbA3</i> eller pUC57- <i>cmbA4</i> 1 µl Buffer 3 1 µl NcoI 1 µl XhoI 5,75 µl dH ₂ O 0,25 µl 100 µg/µl BSA Totalt 10 µl	41 µl Psip411 5 µl Buffer 4 2 µl NcoI 2 µl XhoI 0,5 µl 100 µg/µl BSA Totalt 50 µl

*AatII kutter i vektordel og brukt for å minimere risiko for kontaminerende vektorfragment i rensed fragment.

3.2.6 Rensing av DNA-fragment fra gel

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ble brukt for å rense DNA-fragmenter fra agarosegeler. Det ble laget til en preparativ agarosegel (se prosedyre 3.2.4) som ble kjørt i elektroforese-kar (Bio-Rad) ved 86 V i 1,5 time. Relevant DNA-fragment fra preparativ gel ble identifisert ved å bruke UV-lys som lyste opp båndene. Fragmentet ble skjært ut fra gelen og overført til et eppendorfrør. Produsentens prosedyrer ble fulgt. Renset DNA-fragment ble eluert i 50 µl TE (pH 8). 5 µl eluat ble kjørt på agarosegel (se prosedyre 3.2.4) for analysering av DNA-utbytte.

3.2.7 Ligering av DNA-fragmenter

Ligering ble benyttet for å binde kuttete fragmenter og vektorer sammen. For beskrivelse av ligering av DNA henvises det til Sambrook et al. (1998). Det molare mengdeforholdet mellom vektor og cmbA-fragment skulle være (vektor:fragment) 1:2.

Mengde DNA i fragmenter og vektorer ble kalkulert ved hjelp av gelelektroforese (se prosedyre 3.2.4). DNA ble oppkonsentrert i en felling av 96% EtOH (2x totalvolum av DNA-løsning) og 3M NaAc (1/10 av totalvolum av DNA-løsning) før selve ligeringen.

Løsningen ble inkubert i -80°C for felling. Løsningen ble så sentrifugert ved 13000 rpm i 30 minutter. Supernatanten ble fjernet og løsningen ble vasket med 350 µl 70 % EtOH.

Løsningen ble sentrifugert på nytt ved 13000 rpm, i 5 minutter. Pelleten ble så tørket i 20 minutter i romtemperatur og løst i dH₂O.

Løsningen ble deretter tilsatt ligeringsbuffer og T4 DNA-ligase, dette ble inkubert i romtemperatur i 1 time. Etter inkuberingen ble ligasen inaktivert ved +65°C i 10 minutter. Til slutt ble felle-trinnet utført likt som sist, bortsett fra at pelleten ble løst i 1/10 TE-buffer.

3.2.8 Transformering

Ved transformasjon overføres gener fra en bakterie til en annen. Dette kan føre til nye egenskaper i den nye bakterien, arvet fra den gamle. For å øke opptaket av DNA ved bakteriell transformasjon, er det vanlig å benytte elektroporering eller ved å tilsette Ca⁺⁺.

Ved elektroporering blir cellene utsatt for et elektrisk felt som produserer hull i cellemembranet hvor DNA-plasmidet kan passere gjennom. En annen metode for å øke permeabiliteten i cellen er å inkubere den i løsning av divalente kationer (som oftest kalsiumklorid) for så å utsette den for varmesjokk.

Transformering av *E. coli* TOP10 med plasmider med syntetiske *cmbA*-gener

For å transformere plasmidene pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4* med de syntetiske genene *cmbA3* og *cmbA4* (levert av GenScript Inc.) inn i *E. coli* ble kjemisk kompetente *E. coli*

TOP10-celler fra TOPO TA kloningskit (Invitrogen, Life Technologies) benyttet.

Produsentens prosedyrer for transformering av denne stammen ble fulgt. Plasmidene ble hver for seg løst opp i 20 µl sterilt vann. 1 µl plasmid ble tilsatt i eppendorfrør med 40 µl *E. coli* TOP10-celler. Rørene med celler og DNA ble så inkubert på is i 30 minutter før de ble plassert i et vannbad ved +42°C i 45 sekunder. Rørene ble deretter satt på is i 2 minutter, og videre tilsatt 250 µl romtemperert SOC-medium, før de ble inkubert i 1 time ved +37°C på risting. Henholdsvis 10, 50 og 100 µl av bakteriesuspensjonen ble platet ut på BHI-agar med 50 µg/ml ampicillin. Skålene ble merket og inkubert aerobt ved +37°C over natt.

Dagen etter ble det plukket 5 kolonier fra skålene og podet i rør med 5ml BHI-medium med 50 µg/ml ampicillin. Rørene ble inkubert aerobt ved +37 °C over natt. Plasmider fra kulturene ble isolert (se prosedyre 3.2.3). Kloner med korrekt plasmid ble identifisert og disse ble frosset inn ved -80 °C.

Transformering av *Lactococcus lactis*

Metoden for transformering av *Lc. lactis* er med utgangspunkt i metoden beskrevet av Holo & Nes (1989). *Lc. lactis* MG1363 ble dyrket opp aerobt i GM17-medium i +30°C, over natt.

Dagen etter ble 0,1 ml bakteriekultur inokulert i 9,9 ml friskt GM17-medium og dyrket opp i 5 timer til OD₆₀₀=0,45. 0,4 ml subkultur ble så inokulert i 40 ml GM17S-glycin-medium og dyrket aerobt over natt i +30°C. Neste dag ble cellene kjølt ned på is, og videre sentrifugert i 10 minutter ved 4800rpm. Sentrifugen ble innstilt på +4°C og alle prøvene ble holdt kald gjennom hele prosedyren. Supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i 10 ml (25 % av totalvolum) iskald 0,5M sukrose - 10 % glyserol-løsning. Cellene ble sentrifugert som beskrevet ovenfor og resuspendert i samme volum av sukrose-glyserol-løsningen. Cellene ble sentrifugert på nytt og resuspendert i 400 µl (1% av totalvolum) sukrose-glyserol-løsning. De elektrokompetente cellene ble enten brukt direkte til elektroporering (se nedenfor) eller alikvotert til eppendorfrør og fryst i flytende nitrogen. De frosne elektrokompetente cellene ble lagret ved -80°C til senere bruk. Ved elektroporering ble GenePulser™ og Pulse-kontroller fra Bio-Rad benyttet. Elektrokompetente celler, plasmid og elektroporerings-kyvetter (Bio-Rad) ble satt på is. Relevant DNA ble tilsatt kompetente celler og overført til kyvetter. De ble elektroporert ved 2 kV, 200 Ω og 25µFD. Umiddelbart etterpå ble 960 µl rekonstitusjonsmedium tilsatt kyvettene. Cellene ble så overført til eppendorfrør ved hjelp av

pasteurpipetter og inkubert i 2 timer ved +30°C. Henholdsvis 200, 100, 50 og 10 µl av bakteriesuspensjonen ble platet ut på M17GS-skåler med 10 µg/ml erytromycin. Positive kontroller ble platet ut på GM17S-skåler med 150 µg/ml ampicillin. Skålene ble inkubert anaerobt ved +30°C i 2 døgn. Transformanter ble så podet over i GM17S-medium med 10 µg/ml erytromycin og dyrket opp over natt ved +30°C. Plasmidene ble isolert (se prosedyre 3.2.3) og deretter analysert på agarosegel (se prosedyre 2.2.4) for å se etter positive transformanter. Positive kandidater ble videre analysert med restriksjonskutting, PCR og sekvensering (hhv prosedyre 3.2.5, tabell 3.7 og prosedyre 3.2.10).

Transformering av *E.coli* PK401

Metoden for transformering av *E. coli* ved elektroporering er med utgangspunkt i metoden beskrevet av Hanahan et al. (1991). En enkelt *E. coli* PK401-koloni fra LB-agarskål ble dyrket opp i 10 ml LB-medium og inkubert på risting ved +37°C over natt. Neste dag ble 1/100 volum av overnatt-kulturen inokulert i 500 ml LB-medium, og inkubert på risting ved +37°C til OD₆₀₀=0,6-0,7 ble oppnådd. Deretter ble cellene avkjølt på is i 15 minutter før de ble sentrifugert ved 4200 rpm i 20 minutter. Sentrifugen og prøvene ble holdt avkjølt gjennom hele prosedyren. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 400 ml iskald glyserol-løsning (10 %). Cellene ble sentrifugert som beskrevet ovenfor. Resuspensering i 400 ml iskald glyserol-løsning og sentrifugering som beskrevet ovenfor ble gjentatt 2 ganger. Cellene ble så resuspendert i 40 ml iskald glyserol-løsning og sentrifugert. De elektrokompetente cellene ble alikvotert (50 µl) i eppendorfrør. Cellene ble lagret ved -80°C til senere bruk. Ved elektroporering ble GenePulser™ og Pulsekontroller fra Bio-Rad benyttet (Bio-Rad Laboratories). Elektrokompetente celler, plasmid og elektroporeringskyvetter (Bio-Rad) ble satt på is. Relevant DNA ble tilsatt kompetente celler og overført til kyvetter. De ble elektroporert ved 2,5 kV, 25 µF og 200 Ω. Umiddelbart etterpå ble 1 ml romtemperert SOC-medium tilsatt. Cellene ble overført til eppendorfrør og inkubert på risting ved +37°C. Henholdsvis 200, 100, 50 og 10 µl av bakteriesuspensjon ble platet ut på BHI-skåler med 150 µg/ml erytromycin. Positive kontroller ble platet ut på BHI-skåler med 10 µg/ml kloramfenikol. Skålene ble inkubert anaerobt ved +37°C i 2 døgn. Transformanter ble så podet over i BHI-medium med 150 µg/ml erytromycin eller 20 µg/ml kloramfenikol og dyrket opp på risting over natt ved +37°C. Plasmidene ble isolert (se prosedyre 3.2.3) og deretter analysert på agarosegel (se prosedyre 3.2.4) for å se etter positive transformanter. Positive kandidater ble videre analysert med restriksjonskutting og PCR (hhv prosedyre 3.2.5 og tabell 3.7).

Transformering av *Lactobacillus reuteri*

Metoden for transformering av *L. reuteri* er med utgangspunkt i metoden beskrevet av Ahrné et al. (1992), modifisert av J.P. van Pijkeren (pers. komm. av L. Axelsson). *L. reuteri*

DSM17398 og 6475 *cmbA* ble dyrket opp over natt i 5 ml MRS-medium ved +37°C.

Neste dag ble bakteriekulturen inokulert til 40 ml friskt MRS-medium til OD₆₀₀=0,1.

Løsningen ble dyrket opp til OD₆₀₀=0,55-0,65 og deretter avkjølt på is.

Cellene ble så sentrifugert ved 5000 rpm i 5 minutter. Sentrifugen og prøvene ble holdt avkjølt gjennom hele prosedyren. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 40 ml iskald sterilt dH₂O, dette ble så sentrifugert som beskrevet ovenfor. Vask av pellet ble repetert og sentrifugert som sist. Supernatanten ble fjernet og resuspendert i 20 ml iskald 0,5M sukrose – 10 % glyserol-løsning og sentrifugert som tidligere.

Supernatant ble fjernet og 400 µl iskald 0,5M sukrose – 10 % glyserol-løsning ble tilsatt. De elektrokompetente cellene ble enten brukt direkte til elektroporering (se nedenfor) eller alikvotert til eppendorfrør og fryst i flytende nitrogen. De frosne elektrokompetente cellene ble lagret ved -80°C til senere bruk.

Ved elektroporering ble GenePulser™ og Pulsekontroller fra Bio-Rad benyttet.

Elektrokompetente celler, plasmid og elektroporeringskyvetter (Bio-Rad) ble satt på is.

Relevant DNA ble tilsatt kompetente celler og overført til kyvetter.

Cellene ble elektroporert ved 2,5 kV, 25 µF og 400 Ω. Umiddelbart etterpå ble 960 µl romtemperert MRS tilsatt, og cellene ble inkubert i 3 timer ved +37°C. Henholdsvis 200, 100, 50 og 10 µl av bakteriesuspensjonen ble platet ut på MRS-agarskåler med 10 µg/ml erytromycin. Positive kontroller ble platet ut på MRS-skåler med 10 µg/ml kloramfenikol. Skålene ble inkubert anaerobt i 2 døgn ved +37°C. Transformanter ble podet over i MRS-medium med 10 µg/ml erytromycin eller kloramfenikol og dyrket opp over natt ved +37°C. Plasmidene ble isolert (se prosedyre 3.2.3) og deretter analysert på agarosegel (se prosedyre 3.2.4) for å se etter positive transformanter. Positive kandidater ble videre analysert med restriksjonskutting, PCR og sekvensering (hhv prosedyre 3.2.5, tabell 3.7 og prosedyre 3.2.10).

3.2.9 «Polymerase chain reaction» (PCR)

"Polymerase chain reaction" (PCR) brukes til å amplifisere et DNA-segment som ligger mellom to områder med kjent sekvens. Templat-DNA denatureres ved oppvarming, reaksjonsblandingen avkjøles så til en temperatur som tillater primerne å feste seg til komplementære sekvenser. Primerne forlenges ved hjelp av DNA-polymerasen ved å heve

temperaturen igjen. Trinnene denaturering, "annealing" og "polymerisering" repeteres mange ganger (se tabell 3.8).

PCR direkte på hele bakterieceller med mikrobølgemetoden

Metoden er basert på en metode utviklet for gjær

([http://openwetware.org/wiki/McClean:_Colony_PCR_\(Yeast\)](http://openwetware.org/wiki/McClean:_Colony_PCR_(Yeast))), modifisert av J.P. van

Pijkeren (pers. komm. av L. Axelsson). Det ble plukket ferske kolonier med pipettespiss. En liten mengde cellemateriale ble tilsatt i brønnbunnen i PCR- plater med 96 brønner. Platen ble så tørket ved +99°C i 30 minutter. For flytende kulturer ble disse først overført til eppendorfrør og sentrifugert. Cellemateriale ble deretter plukket med pipettespiss og behandlet som ovenfor. Platene ble siden plassert i mikrobølgeovnen på maks styrke i 1 minutt. 24 µl mastermix (se tabell 3.7) ble tilsatt i brønnene. Platene ble kjørt i PCR-maskin (Applied biosystems) ved betingelsene i tabell 3.8.

Tabell 3.7 Mastermix for PCR

Løsning	Volum
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12 µl
10 pmol/µl Primer	0,5 µl
10 pmol/µl Primer	0,5 µl
RNase-free water	11 µl
Totalvolum	24 µl

Tabell 3.8 PCR direkte på hele bakterieceller

PCR	Temperatur	Tid, minutt:sekund
Initiering til denaturering	+95°C	15:00
Denaturering*	+94°C	00:30
Annealing*	+59°C	1:30
Polymerisering*	+72°C	1:30
Avslutning	+72°C	10:00
Lagring	+4°C	∞
*3-steps syklus 30x:		

Alle PCR-produkt ble kjørt på agarosegel for analysering (se prosedyre 3.2.4).

3.2.10 Sekvensering

Ved sekvensering bestemmes sekvensen av nukleotider i DNA, eller aminosyrer i proteiner.

Exo Sap IT pre-sekvensering

Exo sap IT fjerner rester fra ikke-korporerte nukleotider og primere slik at de ikke forstyrrer videre reaksjoner.

PCR-produkt ble fortynnet dersom de var sterke.

4 µl exo sap IT (fortynnet 1/10) ble blandet med 10 µl PCR-produkt og kjørt i PCR-maskin (Applied biosystems) ved betingelsene i tabell 3.9.

Tabell 3.9 EXO Sap IT pre-sekvensering

Temperatur	Tid, minutt: sekunder
37°C	30:00
80°C	15:00
4°C	∞

Sekvensering av PCR-produkt

Sekvenserings-PCR ble kjørt med flere primere (se vedlegg 5) for å analysere *cmbA* best mulig. Mastermix (se tabell 3.11) ble tilsatt hver prøve.

Tabell 3.10 Sekvensering av PCR-produkt

PCR	Temperatur	Tid, minutt:sekunder
	96°C	00:15*
	60°C	04:00*
	4°C	∞
*Syklus på x25		

Tabell 3.11 Mastermix til sekvensering av PCR-produkt

Løsning	Volum
Big Dye Buffer 5x	1,5 µl
Big Dye v.1.1	1,0 µl
Primer 32 µm	1,0 µl
dH ₂ O	5,5 µl
Pre-sekvenseringsprodukt	1,0 µl

Brett fra Life Technologies ble benyttet og PCR ble kjørt med betingelsene i tabell 3.10.

Felling av sekvenserings-PCR-produkt

55 µl mastermix (se tabell 3.11) ble tilsatt hver prøve med sekvenserings-PCR-produkt.

Brettet ble ristet i 30 minutter ved 1500 rpm og deretter sentrifugert i 2 minutter ved 2500 rpm. Brettet ble så plassert i maskin for sekvensering (Applied biosystems).

Tabell 3.12 Mastermix til felling

Løsning	Volum
X Terminator Solution	10µl
SAM Solution	45µl

Sekvensanalyse

Sekvensene fra ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer ble sammenlignet med sekvensene til *cmbA3* ved bruk av analyseprogrammet BioEdit versjon 7.1.3.0 (Hall, 1999). Dette ble utført av L. Axelsson, Nofima.

3.2.11 Vekstforsøk med stammene DSM20016 og *L. reuteri* 6475

Bestemmelse av konsentrasjon av galleekstrakt til vekstforsøk

L. reuteri 6475 og DSM20016 ble dyrket opp aerobt over natt i MRS-buljong. Dagen etter ble 2g Porcine bile extract (galle) løst i 100ml MRS (2%) og sterilfiltrert. 2%-løsningen ble fortynnet ytterligere til 0,1%, 0,25%, 0,5% og 1%. Deretter ble *L. reuteri* 6475 og DSM20016 inokulert i hver konsentrasjon og dyrket i 5 timer. Bestemmelse av konsentrasjon for videre bruk ble bestemt ved hjelp av OD₆₀₀ og øyemål.

Analyse av repetitivt område i *cmbA* under vekstfase

L. reuteri 6475 og DSM20016 ble dyrket opp aerobt over natt i MRS-buljong med 0,25 % galle og MRS-buljong med 0,25 % mucin ved 37°C. MRS-MOPS-buljong ble brukt som medium ved neste forsøk. Neste dag ble hver stamme inokulert i 55ml forvarmet MRS-medium (alternativt MRS-MOPS) til OD₆₀₀=0,05-0,1. Bakteriekulturen ble fordelt i 10 rør per stamme. Rørene ble plassert i et varmebad ved +37°C. Et rør per stamme ble tatt ut hvert 45. minutt og tilsatt kloramfenikol til 20 µg/ml for å umiddelbart stanse vekst. Rørene ble deretter satt på is. 1,5 ml bakteriekultur ble overført til eppendorfrør og sentrifugert ved 13000 rpm i 5 minutter. Supernatant ble fjernet. Det ble kjørt PCR direkte på cellematerialet (se prosedyre 3.2.12, tabell 3.7 og vedlegg 6 for beskrivelse) på alle prøvene for å analysere repetitivt område av *cmbA*. PCR-produktene ble kjørt på gelelektroforese (se prosedyre 3.2.4) for å analysere DNA-båndene.

3.2.12 Adhesjonsforsøk med DSM20016, 6475 og 6475 *cmbA*-(pSIP-*cmbA3*)

Splitting av celler

Cellene ble splittet når de var 70 – 90 % konfluente. Trypsin og medium ble forvarmet til +37°C. Cellelaget ble vasket 2 ganger med steril romtemperert DPBS. Trypsin-EDTA (1X)-løsning ble tilsatt, og celleflasken ble så inkubert i 25 minutter ved +37°C. Da cellene løsnet ble friskt cellekulturmedium tilsatt. Cellene ble resuspendert for å få cellene encellede. Cellene ble avslutningsvis talt, og kalkulert volum ble overført til friskt medium. Cellene ble plassert i inkubatorskapet ved +37°C fram til neste splitting. I adhesjonsforsøket (se nedenfor, prosedyre 3.2.12) ble 12-brønnersplater benyttet. 1 ml Caco-2 celler ble tilsatt i hver brønn like etter at cellene ble splittet. Platene ble inkubert ved +37°C til cellene var 95 % konfluente (2 døgn).

Adhesjon til Caco-2

L. reuteri DSM20016, 6475, 6475 *cmbA*⁻(pSIP-*cmbA*) og 6475 *cmbA*⁻(pSIP-*cmbA3*) ble dyrket opp over natt i MOPS-MRS-buljong ved +37°C. *L. reuteri* DSM20016 og 6475 ble også dyrket opp i MOPS-MRS-buljong med hhv 0,25 % galle og mucin.

Neste dag ble stammene inokulert til OD₆₀₀= 0,05-0,1 og dyrket opp til ønsket OD₆₀₀.

Ved OD₆₀₀=0,3 ble 6475 *cmbA*⁻(pSIP-*cmbA*) og 6475 *cmbA*⁻(pSIP-*cmbA3*) tilsatt 50 ng/ml induksjonspeptid (SppIP) og deretter dyrket videre til OD₆₀₀=1,0. *L. reuteri* DSM20016 og ATCC 6475 ble dyrket opp til henholdsvis OD₆₀₀=0,3 og OD₆₀₀=1,5. Da ønsket OD₆₀₀ var oppnådd ble bakteriecellene sentrifugert ved 3000 rpm i 10 min ved +20°C. En liten mengde cellemateriale ble tatt ut for PCR (se prosedyre 3.2.12, tabell 3.7 og vedlegg 6 for beskrivelse) for å analysere repetitivt område for *cmbA* ved hjelp av gelelektroforese (se prosedyre 3.2.4). Pelletene ble tilsatt DPBS til ønsket OD₆₀₀ ble oppnådd. Dette OD₆₀₀ ble kalkulert for å gi et bakterietall på omtrent 10⁶ cfu/ml ved tilsatt til brønnene (se nedenfor). Det ble da tatt utgangspunkt i at OD₆₀₀=1,0 gir et celletall på 10⁸ cfu/ml (H Jensen og S Drømtorp, Nofima; pers. komm.). For å fjerne antibiotika ble 12-brønnersplatene vasket 2 ganger med DPBS før selve forsøket. 990 µl friskt cellekulturmedium uten antibiotika ble tilsatt brønnene.

Bakteriene (10 µl) ble tilsatt til hver brønn til sluttkonsentrasjonen ble 10⁶ cfu/ml.

Bakteriesuspensjonene ble platet ut på MRS-skåler i 1/1000-fortynning, og deretter inkubert i 1 time ved +37°C i inkubatorskap med 5 % CO₂. Skålene med 1/1000-fortynning ble inkubert anaerobt i 48 timer ved +37°C. Videre ble ikke-adhererte bakterier fjernet ved å vaske brønnene 3 ganger med DPBS. Caco-2 cellene ble så lysert ved å tilsette 1 ml 0,1 % Triton x100 i DPBS per brønn. Platene ble inkubert i 20 minutter i romtemperatur.

Lyseringsløsningene ble fortynnet 1/10 og platet ut på MRS-skåler for å telle gjenværende bakterier, d.v.s. de bakterier som hadde adherert til Caco-2 cellene. Skålene ble inkubert anaerobt i 48 timer ved +37°C. Prosent adhesjon ble kalkulert ved å dividere dette bakterietallet med bakterietallet som ble tilsatt brønnene (se vedlegg 7 for detaljer).

4 Resultater

4.1 Generelt

Resultatdelen presenteres i to deler, I-II:

I) Konstruksjon av plasmider med ulike *cmbA*-varianter for introduksjon i *L. reuteri*-stammer og adhesjonskapasitet for de nye stammene.

Hovedmålet i del I var å konstruere plasmider med *cmbA* og siden introdusere disse i to *L. reuteri*-stammer: DSM17938 (kurert variant av ATCC 55730) og 6475. Første steg var å transformere syntetiske gener til *E. coli* med formål å kunne oppkonstruere mer plasmid etter behov og for lagring. Neste målsetning var å konstruere plasmid med *cmbA3* og *cmbA4* og transformere inn i mellomverten *Lactococcus lactis*. Siste steg var å transformere *cmbA3* og *cmbA4* inn i *Lactobacillus reuteri*, uttrykke genene og se om de ulike *CmbA*-variantene ga utslag i forskjellig adhesjonskapasitet.

II) Analysering av repetitivt område i *cmbA*-genet i ulike vekstfaser og ved påvirkning av stress, og korrelasjon til adhesjonskapasitet.

Målsetningen i del II var å analysere hvordan de repetitive regionene i *cmbA* uttrykkes i ulike vekstfaser, både med og uten stressfaktorer, og om forskjellige uttrykk gir forskjeller i adhesjonskapasitet.

Del I) Konstruksjon av plasmider med ulike *cmbA*-varianter for introduksjon i *L. Reuteri*-stammer og adhesjonskapasitet i *cmbA*

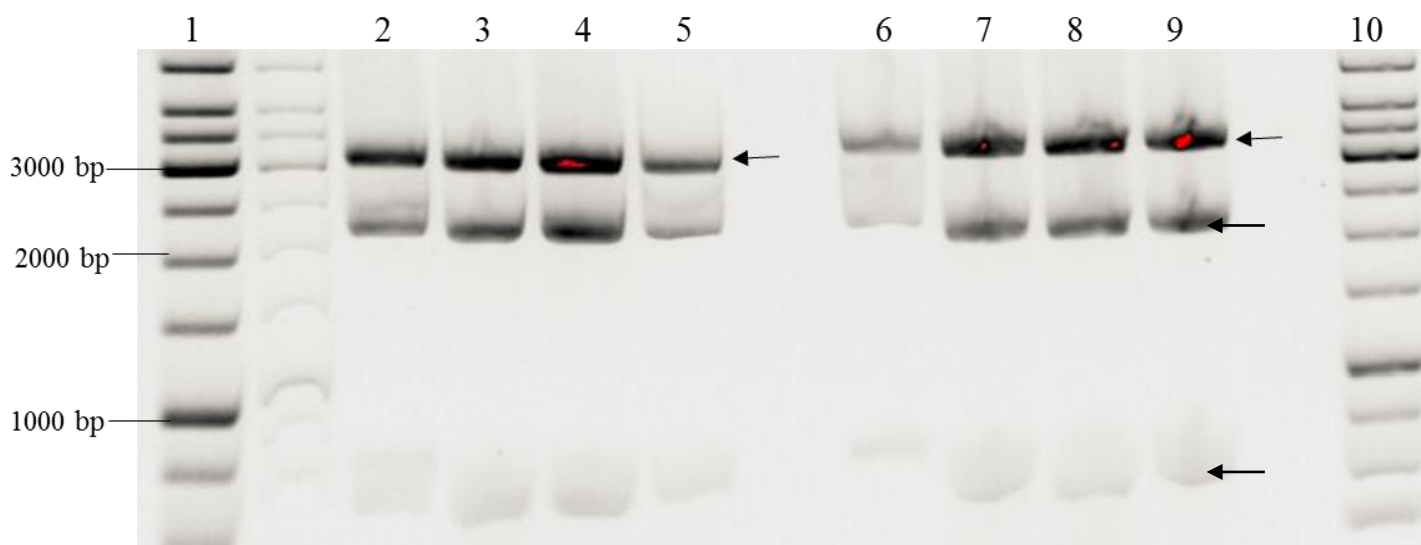
I del I) henvises det til 3.2.1 – 3.2.10 og 3.2.12 for detaljer i prosedyrer.

4.2 Fra transformering av pUC57 til *E. Coli*, til ligering av pSIP-*cmbA*

pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4* (levert fra Genscript) ble transformert inn i *E. coli*

kompetente celler. Dette ble utført for å ha tilstrekkelig plasmid for behov og ved lagring til senere bruk. Da transformeringen var vellykket ble plasmidene isolert. Av disse isolerte plasmider ble det laget en preparativ gel hvor *cmbA*-fragment ble skjært ut og siden rensset. Til slutt ble *cmbA* ligert sammen med pSIP411 og klargjort for transformering inn i mellomverten *Lc. lactis*. I kapittel 4.2 henvises det til 3.2.1 – 3.2.8 for detaljer i prosedyrer.

4.2.1 Transformering av pUC57 til *E.coli*



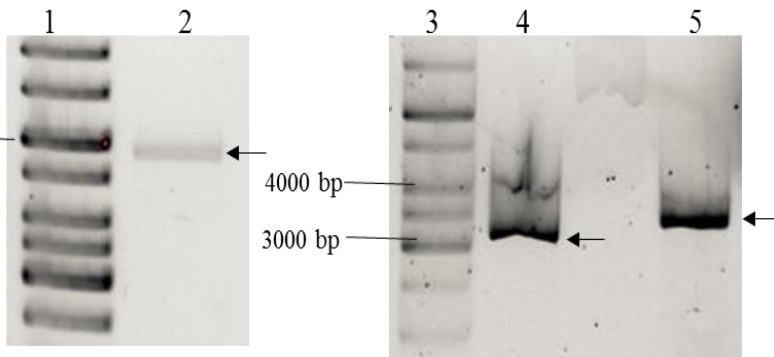
Figur 4.1 Transformering av pUC57 med *cmbA* til *E. coli*

Figur 4.1 ovenfor består av standardkontroll (brønn 1 og 10), pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4* (brønn 2 og 6) og tre paralleller med pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4* transformert inn i *E. coli* TOP10 (se hhv brønn 3-5 og 7-9). Disse parallellene har utgangspunkt i kolonier som siden har blitt dyrket opp for å isolere plasmid som kuttes med NcoI, XhoI og AatII. Prøvene i brønn 2 og 6 er i dette tilfelle benyttet som kontroller for å analysere disse parallellene (dvs plasmidene levert fra Genscript). Se tekst for videre forklaring.

Figur 4.1 viser isolert plasmid, kuttet med restriksjonsenzymene NcoI, XhoI og AatII før gelelektroforesen. Pilene på bildet illustrerer effekten av kuttingen i vektordelen. AatII deler opp fragmentene på ~ 0,5 (nederste pil) og 2,2 kb (mellomste pil) mens *cmbA*-fragmentene forblir intakte (øverste pil). Forventet størrelse på *cmbA3* og *cmbA4* er 3,1 og 3,4 kb. De to øverste pilene på figur 4.1 viser at parallellene har denne størrelsen, parallellene er også identiske med kontrollen (brønn 2 og 6). Det antas derfor at positive transformanter er identifisert. Det blir besluttet å gå videre til neste steg med *E. coli*-kulturene tilsvarende prøvene i brønn 3 og 7.

4.2.2 Isolering av plasmider og rensing av DNA fra fragment

Plasmid av positive transformanter (se brønn 3 og 7 i figur 4.1) og pSIP411 fra *Lc. lactis* ble isolert og kjørt på agarosegel for analysering (se figur 4.2) av fragmentstørrelse og DNA-utbytte.

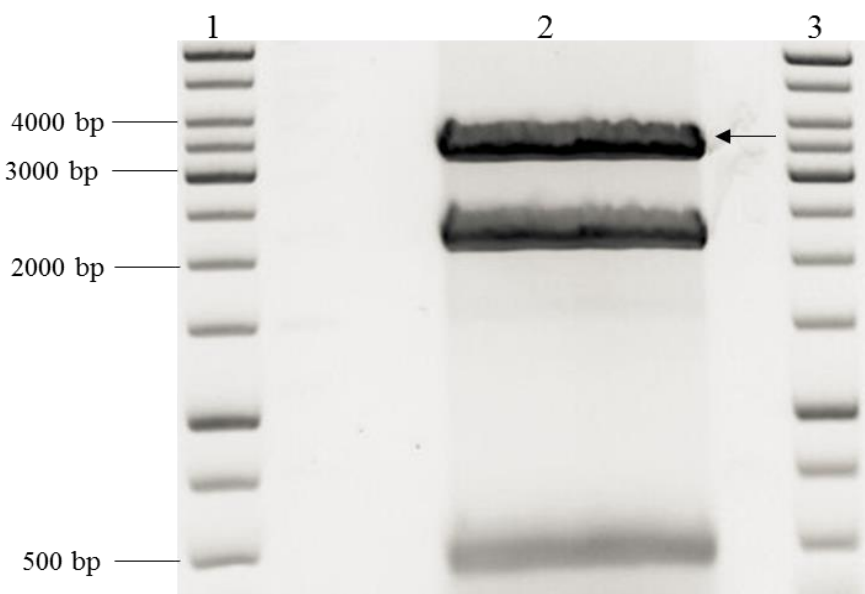


Figur 4.2 Isolert plasmid av *cmbA3*, *cmbA4* og pSIP411

Figur 4.2 viser analytisk agarosegel av isolert plasmid med pSIP411 (brønn 2), pUC57-*cmbA3* (brønn 4) og pUC-*cmbA4* (brønn 5). Forventet størrelse på pUC-*cmbA3*, pUC57-*cmbA4* og pSIP411 er hhv 5.8, 6.1 og 7.7 kb. (Standard er

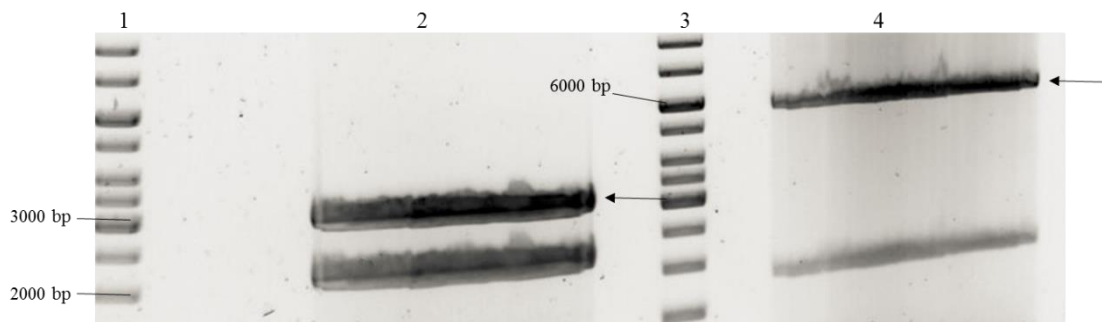
linjære DNA fragmenter og samsvarer ikke med størrelsen på sirkulære plasmider. *CmbA*-plasmidene (båndene i brønn 4 og 5) viser høyt DNA-utbytte, pSIP411 (brønn 2) viser et mye lavere utbytte.

Videre ble *cmbA* kuttet med restriksjonsenzymene NcoI, XhoI og AatII, mens pSIP411 ble kuttet med NcoI og XhoI. AatII kutter i vektordelen på de syntetiske plasmidene og deler opp vektordelen i to, mens *cmbA*-fragment forblir intakt. Dette gjør det lettere å skjære ut fragmenter fra preparativ gel. I pSIP411 ble fragmentet på 5,8 kb skjært ut. GusA fjernes i vektordelen og erstattes med *cmbA*. Det henvises til vedlegg 2 for plasmidkart over vektor. Figur 4.3 er et eksempel på preparativ gel der *cmbA4*-fragmentet på 3.4 kb ble skjært ut og rensset.



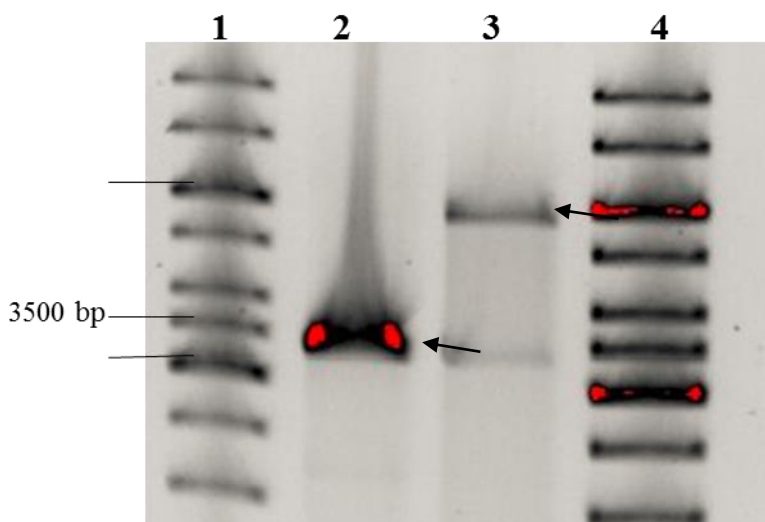
Figur 4.3 Preparativ gel *cmbA4*

Figur 4.3 illustrerer en preparativ gel med *cmbA4* (brønn 2) hvor isolert plasmid er kuttet med NcoI, XhoI og AatII (se figur 4.1 for beskrivelse av effekten til restriksjonsenzymene). Det øverste fragmentet (i dette tilfellet *cmbA4* på 3.4 kb) i båndet i brønn 2 skjæres ut ved hjelp av UV-lys. Båndene i brønn 1 og 3 viser standardkontroll.



Figur 4.4 Preparativ gel av *cmbA3* og pSIP411. Båndene i brønn 1 og 3 viser standardkontroll. Brønn 2 illustrerer *cmbA3* mens brønn 4 illustrerer pSIP411. Forventet fragmentstørrelse i *cmbA3* og pSIP411 på hhv 3,1 og 5,8 kb er innfridd (se pilene og standardkontroll). Disse fragmentstørrelsene skjæres ut og renses fra gelen.

I figur 4.4 ble fragmentene hvor pilene peker skjært ut og renses. Renset DNA fra *cmbA* og pSIP411 ble så analysert ved hjelp av analytisk agarosegel (se eksempel i figur 4.5)



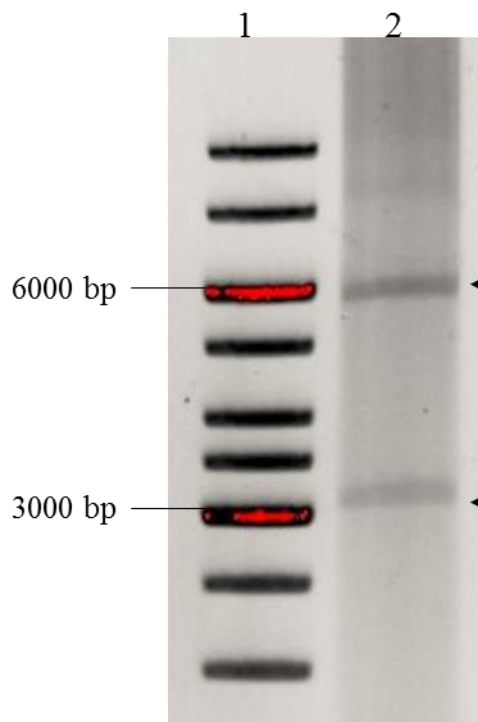
Figur 4.5 Analytisk agarosegel av rensed DNA-fragment
 Figur 4.5 illustrerer *cmbA4* og pSIP411 (hhv båndene i brønn 2 og 3). Bånd i brønn 1 og 4 viser standardkontroll. Forventet størrelse av *cmbA4* og pSIP411 er hhv 3.4 og 5.8 kb og pilene illustrerer at størrelsene er som forventet. DNA-utbyttet i *cmbA4* er i dette tilfellet høyt, mens det er lavt i pSIP411. DNA-utbyttet analyseres før ligering for å beregne mengdeforholdet fragment:vektor (2:1).

Avslutningsvis ble *cmbA* og pSIP411 ligert sammen.

4.3 Konstruksjon av plasmider med *cmbA* for uttrykk i *L. reuteri*, bruk av *Lc. lactis* som mellomvert

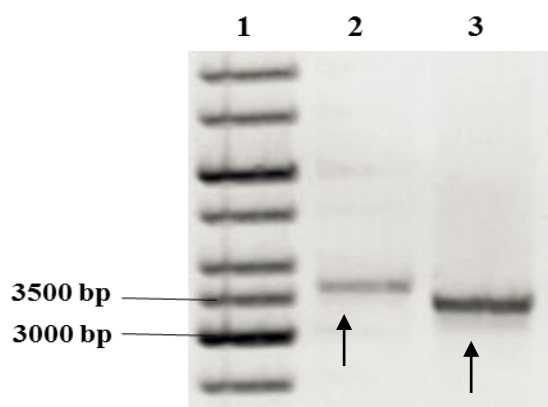
Etter ligering av *cmbA3* med pSIP411, og *cmbA4* med pSIP411 ble disse elektroporert inn i *Lc. lactis*. Kolonier vokste opp på agarskålene med *cmbA3* allerede på første forsøk, restriksjonskutting (se figur 4.6), PCR (se figur 4.7) og sekvensering (ikke vist, henvises til L. Axelsson) viste at konstruksjonen av pSIP-*cmbA3* i *Lc. lactis* ble vellykket.

Transformasjonseffektiviteten var relativt lav (se vedlegg 4).



Figur 4.6 Isolert plasmid av *cmbA3* transformert inn i *Lc. lactis*.

Figur 4.6 illustrerer pSIP-*cmbA3* i *Lc. lactis*, kuttet med restriksjonsenzymmer. Båndene i brønn 2 har bakgrunn i kolonier som videre er dyrket opp i buljong, og plasmid ble isolert. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. I brønn 2 vises det to fragmenter hvor restriksjonsenzymene har separert *cmbA3* og pSIP411 fra hverandre. Øverste pil viser pSIP411 som kuttet med NcoI og XhoI har en størrelse på 5,8 kb. Nederste pil illustrerer *cmbA3* med forventet fragmentstørrelse 3,1 kb. Båndene i brønn 2 viser svært lavt utbytte av DNA, det blir derfor isolert store mengder av plasmid for å ha tilstrekkelig med DNA til transformering inn i *L. reuteri*-stammene.



Figur 4.7 PCR-produkt av *cmbA3* transformert inn i *Lc. lactis*.

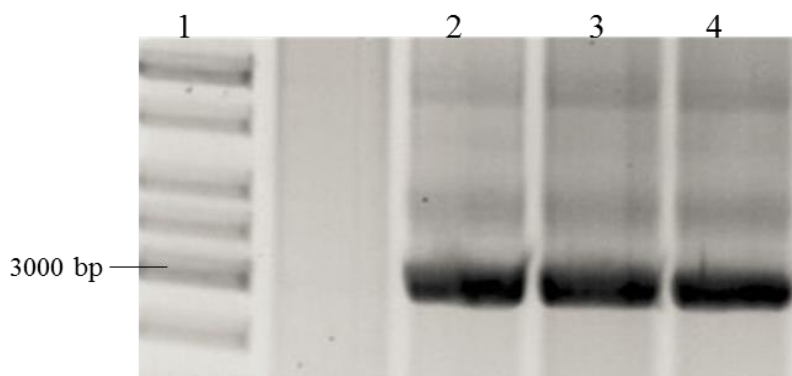
Analytisk agarosegel av *cmbA3* etter PCR. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. I denne PCR-kjøringen ble primerne Sip3 forward (fw) + Sip16 (rev) (brønn 2) og Sip3 fw + cmbA rev (brønn 3) benyttet. Forventet størrelse i bånd i brønn 2 er 3.7 kb, og i brønn 33.5 kb. Pilene indikerer at forventet størrelse er innfridd.

Det vokste ikke opp noen kolonier på agarskåler med liggering pSIP411 og *cmbA4*. Det ble naturlig nok derfor ikke kjørt PCR eller sekvensering på *cmbA4* i denne sammenheng. Det var heller derfor ingen transformasjonseffektivitet å beregne. Etter gjentatte mislykkede forsøk i å transformere *cmbA4* inn i *Lc. lactis* ble det besluttet å bytte ut *Lc. lactis* som mellomvert, med *E. coli* PK401 (se kapittel 4.4). Det henvises til vedlegg 4 for transformasjonseffektiviteten i *Lc. lactis*. Kolonier fra agarskåler med *cmbA3* ble dyrket opp, og plasmid ble isolert.

Analytisk agarosegel (ikke vist i denne oppgaven) viste fragmentstørrelse på 3,1 + 5,8 kb som forventet, men lavt DNA-utbytte. Isolert plasmid av *cmbA3* i *Lc. lactis* ble også kjørt på PCR for analysering. Utvalgte positive transformanter ble valgt ut, og figur 4.7 viser til kandidaten det ble valgt å gå videre med i senere steg. Etter sekvensering blir plasmid av den riktige kandidaten isolert for å beregne DNA-utbytte og til videre bruk.

4.4 Konstruksjon av *E. coli*-stammer med pSIP-*cmbA1*, pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA4*

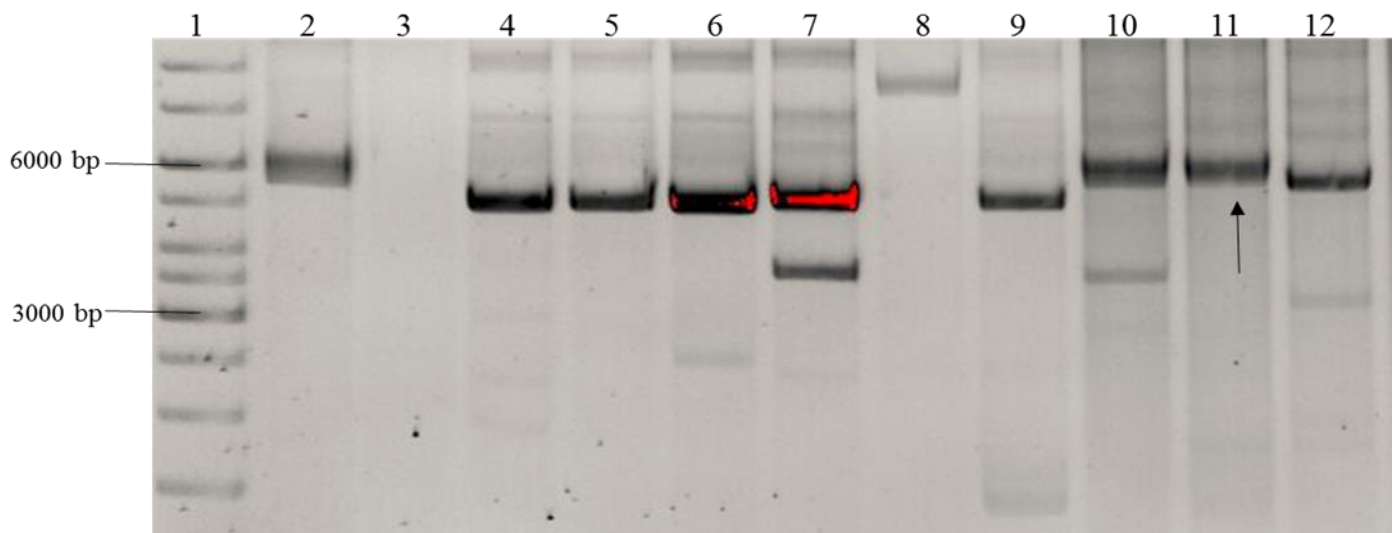
På grunn av dårlig transformasjonseffektivitet og utbytte av transformering i *Lc. lactis* ble det bestemt at mellomverten skulle byttes til *E. coli* PK401. Denne stammen ble anbefalt av S. Roos, Uppsala, som et egnet alternativ til dette arbeidet. Til tross for at pSIP-*cmbA3* ble riktig transformert inn i *Lc. lactis* ble det bestemt at også denne skal transformeres inn i *E. coli* PK401 for å (sannsynligvis) oppnå høyere utbytte og dermed øke sjansen for å lykkes i transformering i *L. reuteri*. Plasmid pSIP-*cmbA3* isolert fra *Lc. lactis* ble derfor transformert til *E. coli* PK401. For konstruksjon av pSIP-*cmbA4* må hele prosessen i kapittel 4.2 gjøres om på nytt for å bruke den nye (*E. coli* PK401) mellomverten. Det blir også bestemt at plasmid pSIP-*cmbA*, som finnes i stammen 6475 *cmbA* (pSIP-*cmbA*) fra Jensen et al (2014), skal tas med i arbeidet (fra nå kalt pSIP-*cmbA1*) ved dette tidspunktet for å til slutt transformeres inn i DSM17398 (finnes altså allerede i *L. reuteri* 6475*cmbA*). pSIP-*cmbA1* transformeres inn i *E. coli* PK401 av samme grunn som pSIP-*cmbA3*; for å oppnå høyere utbytte.



Figur 4.8 Isolert plasmid av PK401(pVS2). Analytisk agarosegel av PK401(pVS2) for å analysere DNA-utbyttet. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Båndene i brønn 2-5 viser tre ulike kolonier av PK401(pVS2) som videre er dyrket opp og plasmid isolert. Bildet illustrerer et

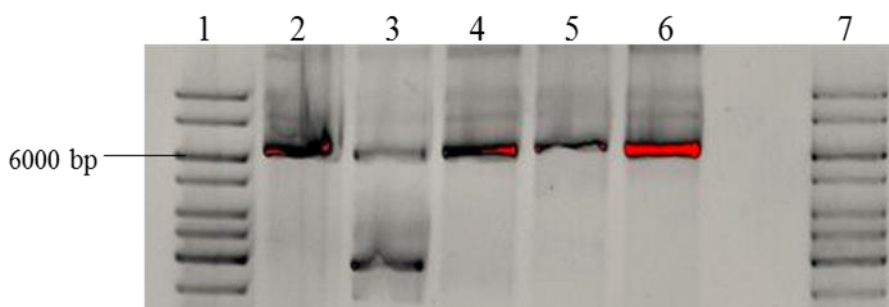
høyt DNA-utbytte (båndene i brønn 2-5). Sammenligner man med pSIP411 (se figur 4.2) ser man en stor forskjell i DNA-utbytte.

Plasmid pVS2 ble isolert fra *E. coli* PK401(pVS2) og heretter brukt som kontrollplasmid ved alle transformasjoner. Figur 4.8 viser også at utbytte av plasmid med *E. coli* som vert er mye større enn ved å bruke *Lc. lactis*. DNA-utbytte i isolert plasmid ble beregnet, og tilstrekkelig mengde liggering eller plasmid (pSIP-*cmbA3* fra *Lc. lactis*) ble elektroporert inn i *E. coli* PK401. Det vokste opp kolonier på opp agarskålene fra alle transformeringene. Det ble plukket ut 5 kolonier om gangen og dyrket opp i buljong.

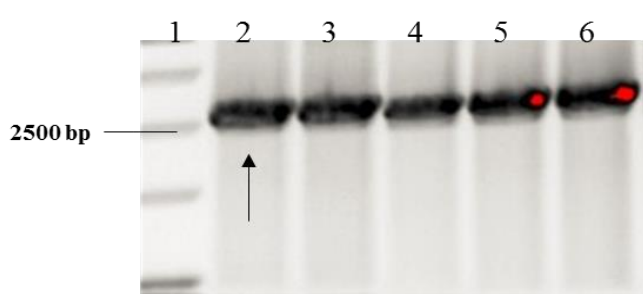


Figur 4.9 Analyse av kolonier fra transformasjonen med pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA4* i *E. coli* PK401. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2 viser pSIP-*cmbA3* i *Lc. lactis*, i dette tilfellet benyttet som positiv kontroll. Brønn 3 og 8 viser dårlig eller ingen resultat og tas ikke med i beregningen.

Båndene i brønn 4-7 (Figur 4.9) viser kandidater til pSIP-*cmbA4*, båndene i brønn 9-12 viser pSIP-*cmbA3*. Brønn 3-7 og 8-12 er hhv liggeringer og plasmider som ble elektroporert inn i *E. coli* PK401. Forventet størrelse på båndene skal være lik (pSIP-*cmbA3*) eller noe større (pSIP-*cmbA4*) enn positiv kontroll (bånd i brønn 2), man kan derfor slå fast at pSIP-*cmbA4* ikke er riktig konstruert i *E. coli* PK401. Bånd i brønn 9 er ikke lik størrelse som positiv kontroll, og kan derfor antas er feil. Bånd i brønn 10 og 12 har flere bånd eller forstyrrelser og tas derfor ikke med i beregningen. Bånd i brønn 11 har lik størrelse som positiv kontroll og ser riktig ut. Det blir bestemt at pSIP-*cmbA3*-kandidaten i brønn 11 skal tas med videre i arbeidet.



Figur 4.10 Analyse av kolonier fra transformasjon med pSIP-*cmbA1* i *E. coli* PK401. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-6 viser utgangspunkt i fem utvalgte kolonier som er isolert.

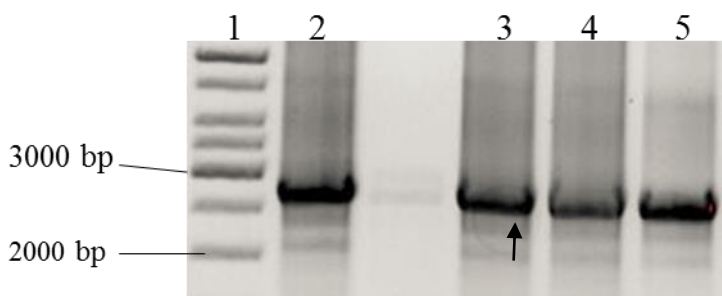


Figur 4.11 Analyse av PCR-produkt med pSIP-*cmbA1*. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-6 viser pSIP-*cmbA1* i *E. coli* PK401. Denne PCR er kjørt med primerne Sip16 rev og F2 fw. Forventet størrelse er ~2.6 kb, Størrelsen er innfridd og det antas derfor at viser pSIP-*cmbA1* er riktig transformert inn i *E. coli* PK401. Det blir besluttet å gå videre med bånd i brønn 6.

Forsøk på å transformere *cmbA4* inn i *E. coli* PK401 blir gjentatt flere ganger, men det lykkes ikke å få riktige kandidater. På grunn av tidsmangel blir det derfor besluttet å ikke gå videre med *cmbA4* i arbeidet. pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* isolert fra *E. coli* ble ikke sekvensert. Transformasjonseffektiviteten var høy i alle tilfellene ved transformering inn i *E. coli* PK401 (se vedlegg 4).

4.5 Konstruksjon av *L. reuteri*-stammer med pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3*

Før elektroporering ble DNA-utbyttet beregnet i plasmidprep ved hjelp av analytisk agarosegel, og tilstrekkelig mengde plasmid av pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* ble elektroporert inn i *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ (kun pSIP-*cmbA3* siden pSIP-*cmbA1* allerede finnes i denne stammen) og DSM17398. Det lykkes ikke å finne positive transformanter med pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* i DSM17398, selv etter flere forsøk. Imidlertid ble det funnet positive transformanter med pSIP-*cmbA3* i *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻. Transformasjonseffektiviteten var lav i 6475*cmbA*⁻ og svært lav i stamme DSM17398 både i pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3*. Det ble kjørt PCR (se figur 4.12) på pSIP-*cmbA3*, i tillegg til at den ble sekvensert. Det henvises til vedlegg 4 for transformasjonseffektiviteten og vedlegg 3 for detaljer fra sekvensering av pSIP-*cmbA3*.



Figur 4.12 Analyse av PCR-produkt med pSIP-*cmbA3* transformert inn i *L. reuteri* 6475. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-5 viser pSIP-*cmbA3* i 6475*cmbA*⁻ med bakgrunn i 4 kolonier som er isolert. I denne PCR ble primerne F2 fw + Sip16 rev benyttet, og forventet størrelse på bånd er ~ 2.6 kb.

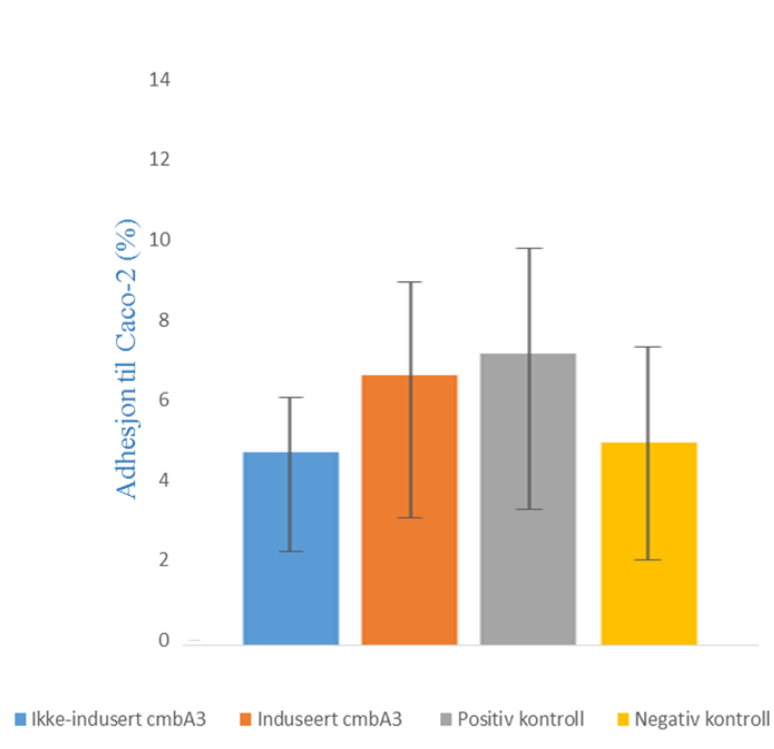
Figur 4.12 viser at PCR ga forventet størrelse for plasmid isolert fra kandidater av *L. reuteri* transformert med pSIP-*cmbA3*. Det antas derfor at positive transformanter er funnet. Plasmidet som var utgangspunkt for prøven i brønn 4 ble plukket ut for sekvensering. Sekvenseringen viste i all vesentlighet korrekt sekvens. Det mangler sekvens for ca 400 bp (se vedlegg). Transformanten, dvs *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻(pSIP-*cmbA3*), der dette plasmidet er å finne ble også tatt med videre i adhesjonsforsøk.

4.6 Adhesjonsforsøk del A

I adhesjonsforsøket ble *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ med pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA1* adherert til Caco-2 celler. Prosentvis adhererte celler ble beregnet. I arbeidet til Jensen et al (2014) viste adhesjonsforsøk at prosentvis adhererte celler til Caco-2 varierte fra ~1 og ~10%. Dette samsvarer i utgangspunktet med resultatet i denne oppgaven. Det ble kjørt PCR på alle bakteriekulturer brukt i adhesjonsforsøket med primerne *cmbA*-f2 fw og *cmbA*-r2 rev. Se vedlegg 7 for detaljer.

4.6.1 Adhesjonsforsøk med pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA1*

Konstruksjonen av pSIP-*cmbA3* i *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ som ble produsert i del I, ble benyttet i adhesjonsforsøket. pSIP-*cmbA1* i *L. reuteri* 6475 *cmbA*⁻ (Jensen et al., 2014) ble brukt som positiv og negativ kontroll (hhv induisert og ikke-indusert pSIP-*cmbA1*). Egen konstruksjon og *L. reuteri* 6475 *cmbA*⁻ (pSIP-*cmbA1*) ble delt opp i to paralleller, hvorav én av hver parallell ble tilsatt induksjonspeptid. pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA1* var altså både induisert og ikke-indusert i dette forsøket. Adhesjonsforsøket ble utført én gang.



Figur 4.13 Oversikt over prosentvis adhererte celler av *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ med pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA1*. Figur 4.13 viser gjennomsnittlig adhesjon av egen konstruksjon i induisert og ikke-indusert variant, i tillegg til positiv og negativ kontroll. I forsøket ble det benyttet tre paralleller av hver prøve. Gjennomsnitt av prosentvis adhererte celler ble beregnet ut fra disse parallellene, standardavvik ble også beregnet.

Målsetning var å se om det er forskjell på adhesjon for *L. reuteri* som uttrykker *cmbA3* eller *cmbA1*. Indusert *cmbA3* hadde i dette tilfellet høyere prosentvis adhesjon enn ikke-indusert parallell, mens negativ kontroll hadde høyere prosentvis adhesjon enn positiv kontroll. Se vedlegg 7 for detaljer.

Del II) Adhesjonskapasitet, analysering av repetitivt område i *cmbA*-genet i ulike vekstfaser og ved påvirkning av stress

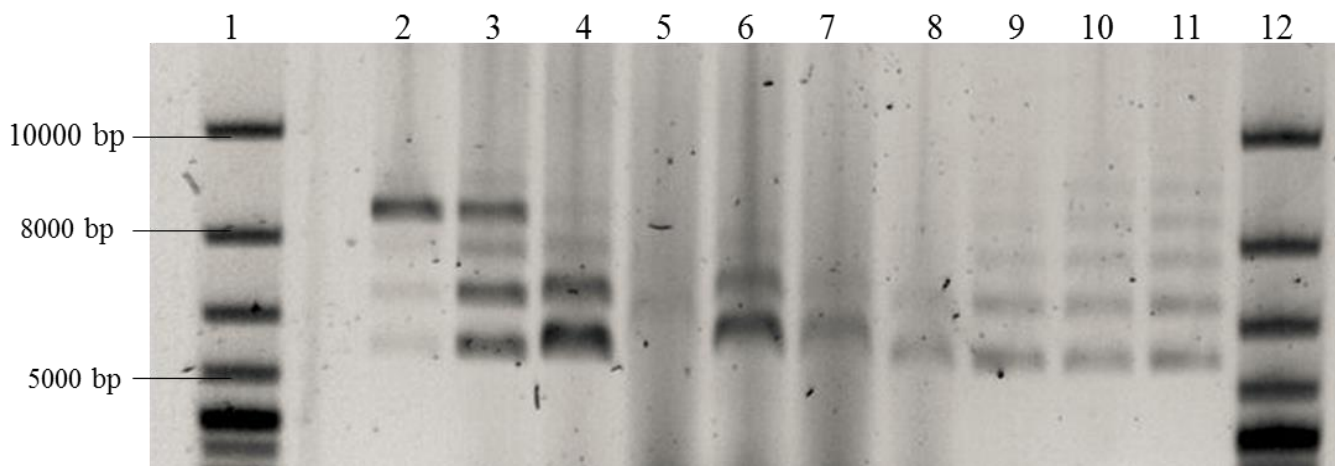
I del II) henvises det til 3.2.9 – 3.2.12 for detaljer i prosedyrer.

4.7 Vekstforsøk med DSM20016 og 6475

Vekstforsøk ble benyttet for å analysere variasjonen i de repetitive områdene av *cmbA* i stammene DSM20016 og 6475. Stammene ble dyrket opp i MRS-buljong. MRS-buljongen ble også tilsatt mucin eller galle, det ble dermed tre ulike utgangspunkt i dette forsøket. Etter hvert ble MRS-buljong tilsatt MOPS-buffer for å teste om det utgjorde en forskjell. Det ble kjørt PCR på alle prøvene med primerne *cmbA*-f2 fw og *cmbA*-r2 rev. Se vedlegg 6 for detaljer om OD₆₀₀ og tidspunkt for prøveuttakene.

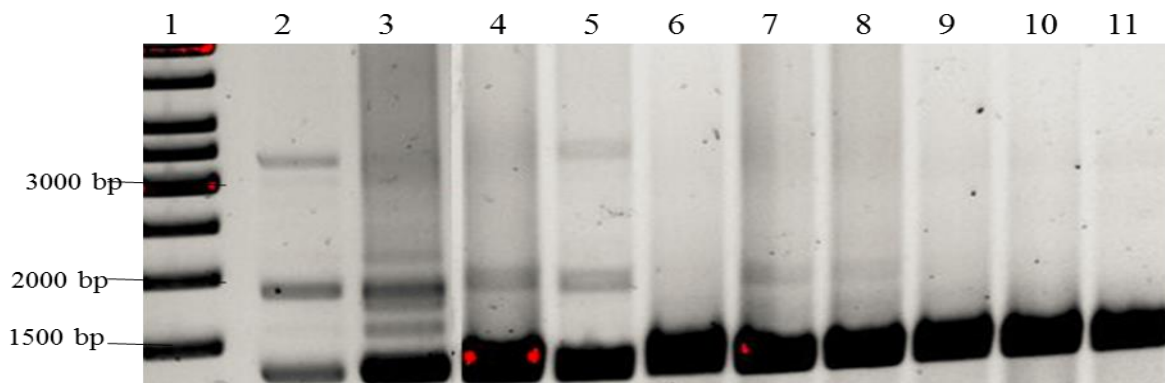
4.7.1 Analyse av repetitivt område i DSM20016 og 6475

DSM20016 og 6475 ble dyrket opp over natt i MRS-buljong (etter hvert tilsatt MOPS-buffer). Rørene ble tatt ut hvert ~45.minutt, tilsatt kloramfenikol og satt på is for å stoppe vekst. OD₆₀₀ ble målt i hvert rør (se figur 4.16 for vekstutvikling).



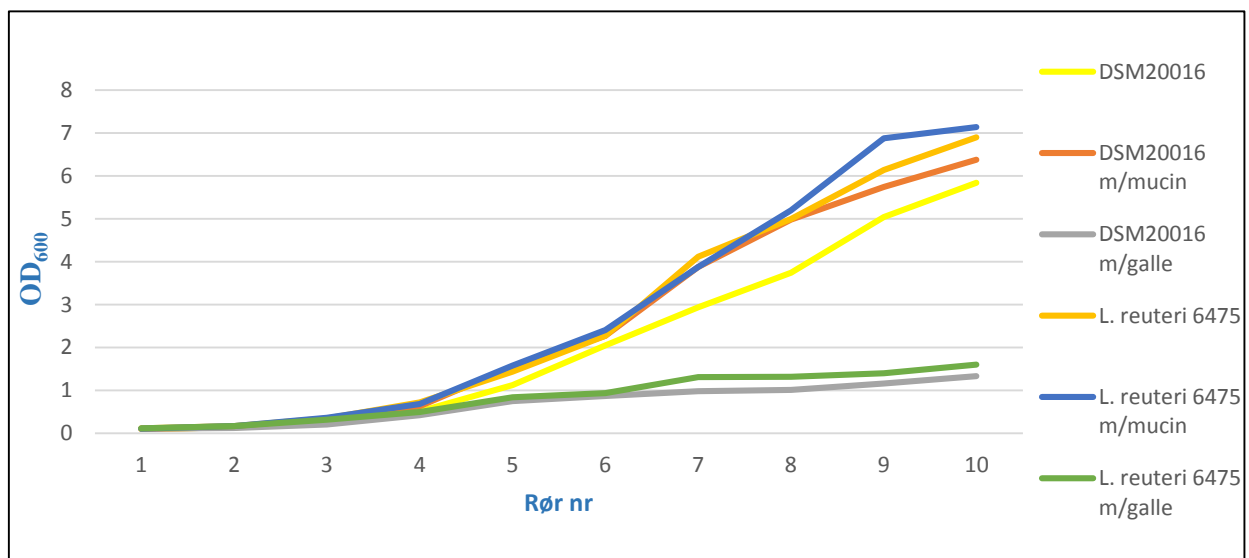
Figur 4.14 Vekstforsøk: DSM20016 dyrket opp i MRS. Figur 4.14 viser PCR-produkt fra vekstforsøk med DSM20016 dyrket opp i MRS-buljong. Bånd i brønn 1 og 12 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-11 viser 10 rør med bakteriekultur hvor brønn 2 er første uttak (start av kultur, lav OD₆₀₀) og brønn 11 er siste uttak (stasjonær fase, høy OD₆₀₀).

Figur 4.14 viser at utbyttet i PCR reaksjonen varierer noe. Brønn 2, 3, 4 og 6 har kraftigst utbytte. Bånd i brønn 5 ble utydelig og tas ikke med i analyseringen. Bånd i brønn 7-11 viser litt svakere utbytte, men viser flere bånd, noe som antyder større variasjon når det gjelder de repetitive regionene. Se tabell 4.16 for beskrivelse av vekstutvikling i DSM20016.



Figur 4.15 Vekstforsøk: *L. reuteri* 6475 dyrket opp MRS. Figur 4.15 viser PCR-produkt fra vekstforsøk med 6475 dyrket opp i MRS-buljong. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-11 viser 10 rør med bakteriekultur hvor brønn 2 er første uttak (start av kultur, lav OD₆₀₀) og brønn 11 er siste uttak (stasjonær fase, høy OD₆₀₀).

Prøvene i brønn 2-5 i Figur 4.15 viser antydninger til flere repeterende regioner, mens prøvene i brønn 6-11 har kun ett bånd. Prøvene for disse sistnevnte tilsvarer en kultur der OD₆₀₀ er relativt høyt og stammen går inn i stasjonær fase. De nederste båndene i brønnene 2-11 har kraftige bånd. Forventet størrelse på nederste båndet, dvs for et *cmbA*-gen med kun én repetitiv region, er 1325 bp (se figur 2.6 for detaljer). Analytiske agarosegeler fra DSM20016 og *L. reuteri* 6475 dyrket opp i MOPS-MRS-buljong er ikke vist i denne oppgaven, det var imidlertid liten forskjell sammenlignet med uten MOPS å antyde ut fra agarosegeler.

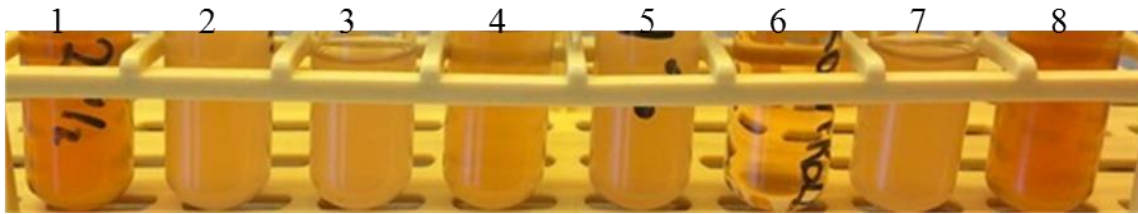


Figur 4.16 OD₆₀₀-verdier fra vekstforsøk

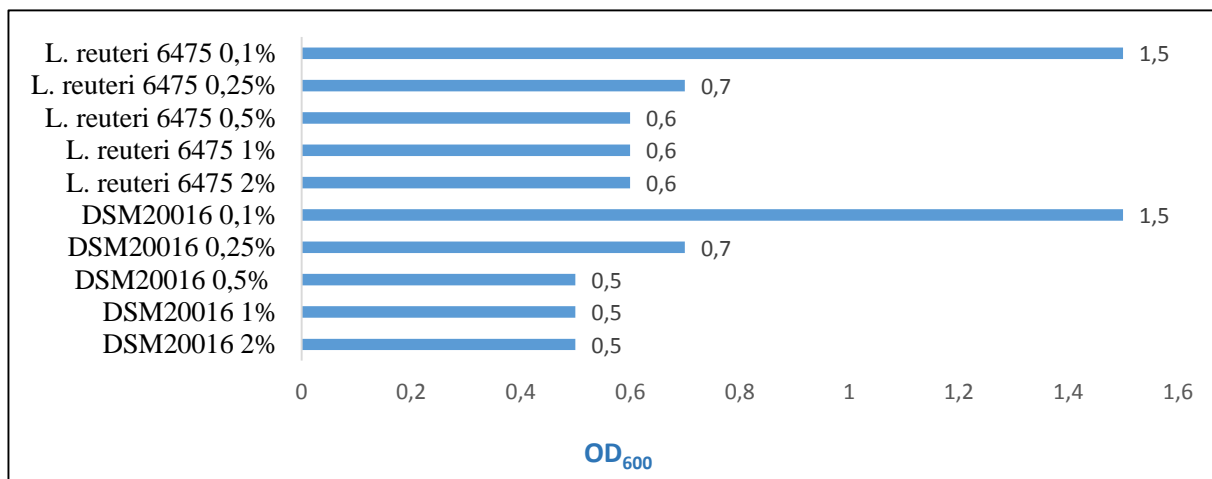
Figur 4.16 viser vekstutvikling av DSM20016 og *L. reuteri* 6475 med og uten galle og mucin. Tabellen viser stor forskjell i utvikling av vekst mellom galle og mucin. DSM20016 og *L. reuteri* 6475 tilsatt galle har veldig lik vekstutvikling, men betydelig lavere enn de andre vekstkurvene. DSM20016 og *L. reuteri* 6475 med og uten mucin viser god vekst. For å oppnå omtrent lik OD₆₀₀-verdi i alle uttakene måtte stammer tilsatt galle dyrkes opp i mye lengre tid enn stammene både med og uten mucin. Mucin vokste like raskt eller raskere enn stammene uten tilsetning. Figur 4.22 gjenspeiler dette.

4.7.2 Bestemmelse av konsentrasjon av galle

Før vekstforsøk med tilsats av galle måtte konsentrasjonen bestemmes. Målsetningen var å finne en såkalt «subinhibitory» konsentrasjon, dvs en konsentrasjon som tillater vekst, men betydelig langsommere grunnet stress. MRS med ulike konsentrasjoner av galle ble derfor dyrket opp og analysert ved hjelp av øyemål og OD₆₀₀-verdi.



Figur 4.17 Bestemmelse av konsentrasjon av galle ved hjelp av øyemål. Figur 4.17 illustrerer vekst etter 5 timer i stammene DSM20016 og 6475 med ulike konsentrasjoner av galle. Rør 6 viser kontrollrør med MRS-buljong. Rør 1 og 8 (hhv DSM20016 og 6475 med 2% galle) hadde liten vekst, ved øyemål var det også antydning til felling ved denne konsentrasjonen. Rør 4 (DSM20016 med 1% galle) hadde også tilsynelatende liten vekst. 6475 med 1% konsentrasjon av galle er ikke vist men hadde også liten vekst. Rør 2 og 7 (hhv DSM20016 og 6475 med 0,1% galle) hadde høy vekst. Rør 3 og 5 (hhv DSM20016 og 6475 med 0,25% galle) hadde tilsynelatende fin vekst uten felling eller høy tetthet av bakteriekultur.



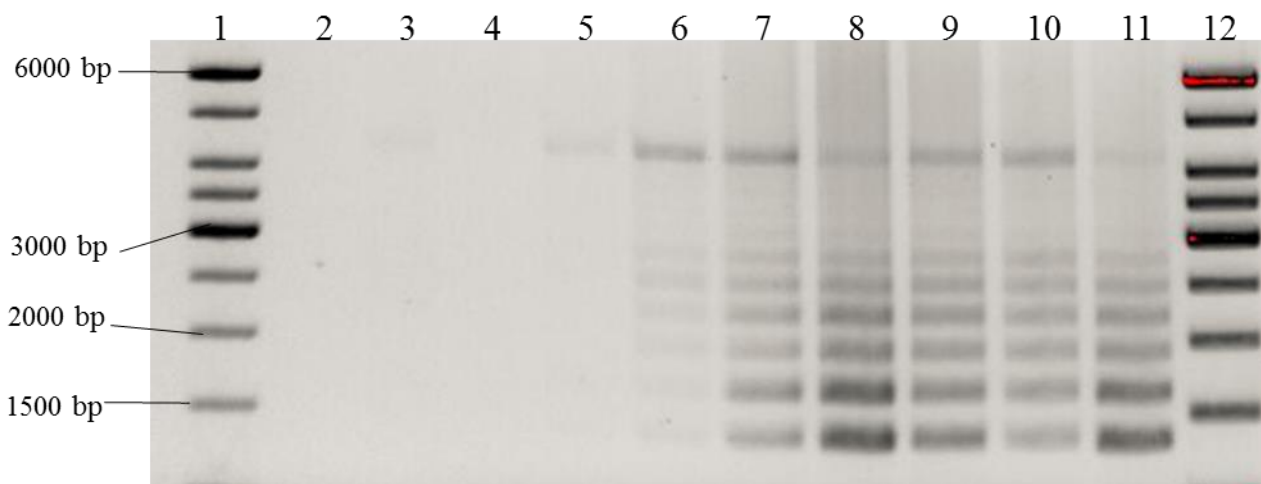
Figur 4.18 Bestemmelse av konsentrasjon av galle ved hjelp av OD₆₀₀-verdier

Figur 4.18 viser OD₆₀₀-verdiene i de DSM20016 og 6475 med ulike konsentrasjoner av galle. Bakteriekultur med 0,1% galle hadde høy vekst (OD₆₀₀=1,5) ved fem timer, ellers hadde bakteriekulturene nokså lik utvikling i OD₆₀₀.

På bakgrunn av observasjonene ved øyemål og bruk av OD₆₀₀ ble det bestemt at 0,25% konsentrasjon av galle skulle brukes i vekstforsøk og adhesjonsforsøk. På forhånd var det bestemt at det skulle benyttes 0,25% mucin i disse forsøkene.

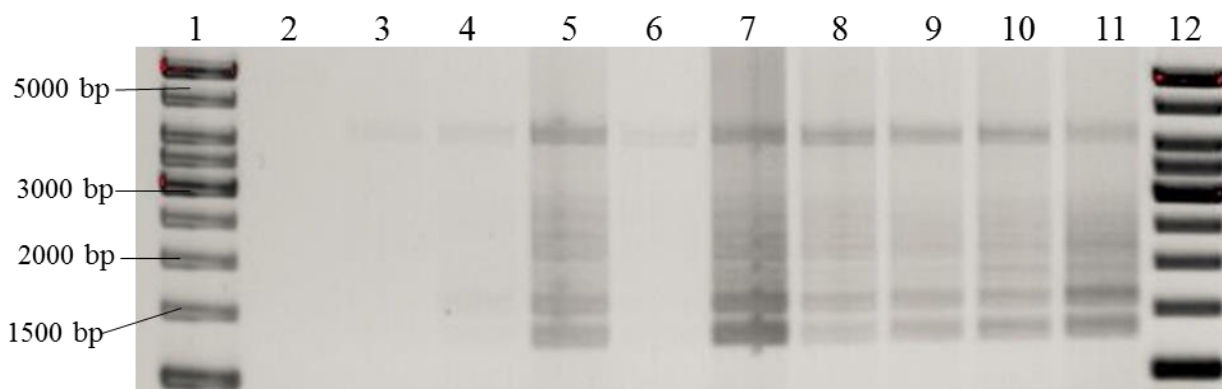
4.7.3 DSM20016 og 6475 i MOPS-MRS-buljong tilsatt galle og mucin: Analyse av repetitivt område

Overnattkultur av DSM20016 og 6475 i MOPS-MRS-buljong (eventuelt uten MOPS-buffer) ble tilsatt 0,25 % mucin eller galle. For å oppnå ~lik OD₆₀₀ ved hvert uttak ble mucin målt ~hvert 45. min, mens galle ble tatt ut hver ~1,5 time. Se vedlegg 6 for detaljer om OD₆₀₀ og tidspunkt for prøveuttakene. Mønsteret i repetitive områder var identisk med eller uten MOPS-buffer i begge stammene, agarosegeler som viser repetitive mønster med stammene tilsatt galle eller mucin *uten* tilsatt MOPS-buffer er derfor ikke vist.



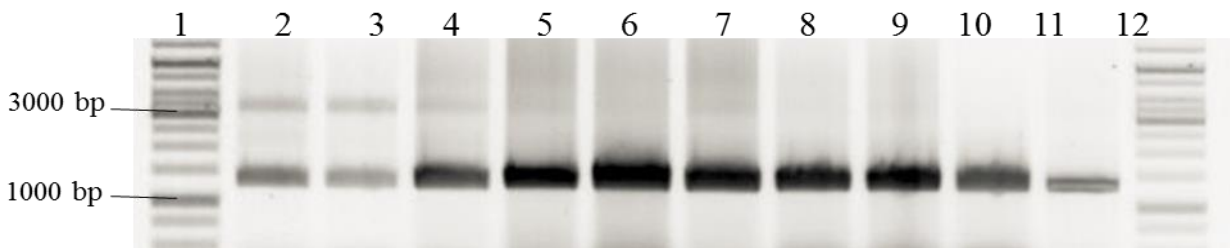
Figur 4.19 Analyse av repetitivt område: DSM20016 med mucin, tilsatt MOPS. Analyse av repetitivt område: DSM20016 med mucin, tilsatt MOPS. Figur 4.19 viser PCR-produkt fra vekstforsøk med DSM20016 dyrket opp i MOPS-MRS-buljong og tilsatt mucin. Bånd i brønn 1 og 12 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-11 viser 10 rør med bakteriekultur hvor brønn 2 er første uttak (start av kultur, lav OD₆₀₀) og brønn 11 er siste uttak (stasjonær fase, høy OD₆₀₀).

For prøvene i brønn 2 til 5 ble ikke bånd påvist, dette mønsteret gjentok seg til tross for flere forsøk på å kjøre gelelektroforese fra PCR-produktet. Prøvene i brønn 6-11 viser flere bånd og derved stor variasjon på antall repeterende regioner i kulturen, og ellers likt mønster. Se figur 4.22 for beskrivelse av vekstutvikling i DSM20016 med MOPS-buffer tilsatt mucin.



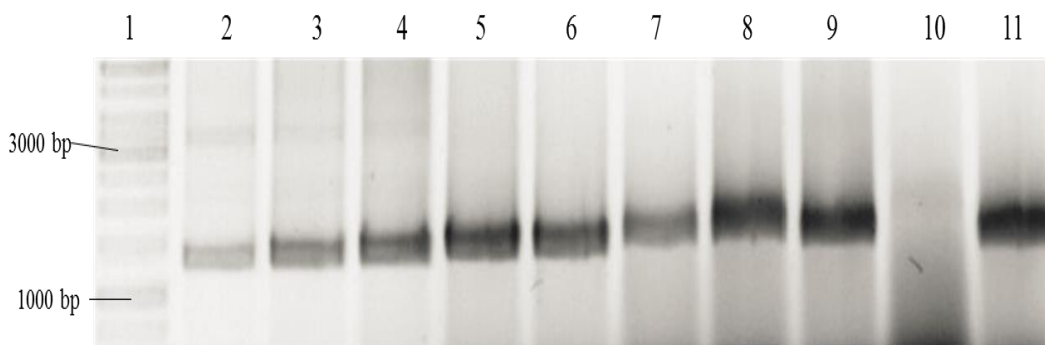
Figur 4.20 Analyse av repetitivt område: DSM20016 med galle, tilsatt MOPS-buffer. Figur 4.20 viser analytisk agarosegel av PCR-produkt med DSM20016 tilsatt galle. Bånd i brønn 1 og 12 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-11 viser 10 rør med bakteriekultur hvor brønn 2 er første uttak (start av kultur, lav OD₆₀₀) og brønn 11 er siste uttak (stasjonær fase, høy OD₆₀₀).

Brønn 2, 3, 4 og 6 viser ingen bånd, dette mønsteret gjentok seg til tross for flere forsøk på å kjøre gelelektroforese på PCR-produktet. Bånd i brønn 5 og 7-11 viser opptil flere repeterende regioner, ellers er båndene ganske like. Se figur 4.22 for beskrivelse av vekstutvikling i DSM20016 med MOPS-buffer tilsatt mucin.



Figur 4.21 Analyse av repetitivt område: 6475 med galle, tilsatt MOPS-buffer. Figur 4.21 viser analytisk agarosegel av PCR-produkt med *L. reuteri* 6475 tilsatt galle. Bånd i brønn 2-11 viser 10 rør med bakteriekultur hvor brønn 2 er første uttak (start av kultur, lav OD₆₀₀) og brønn 11 er siste uttak (stasjonær fase, høy OD₆₀₀).

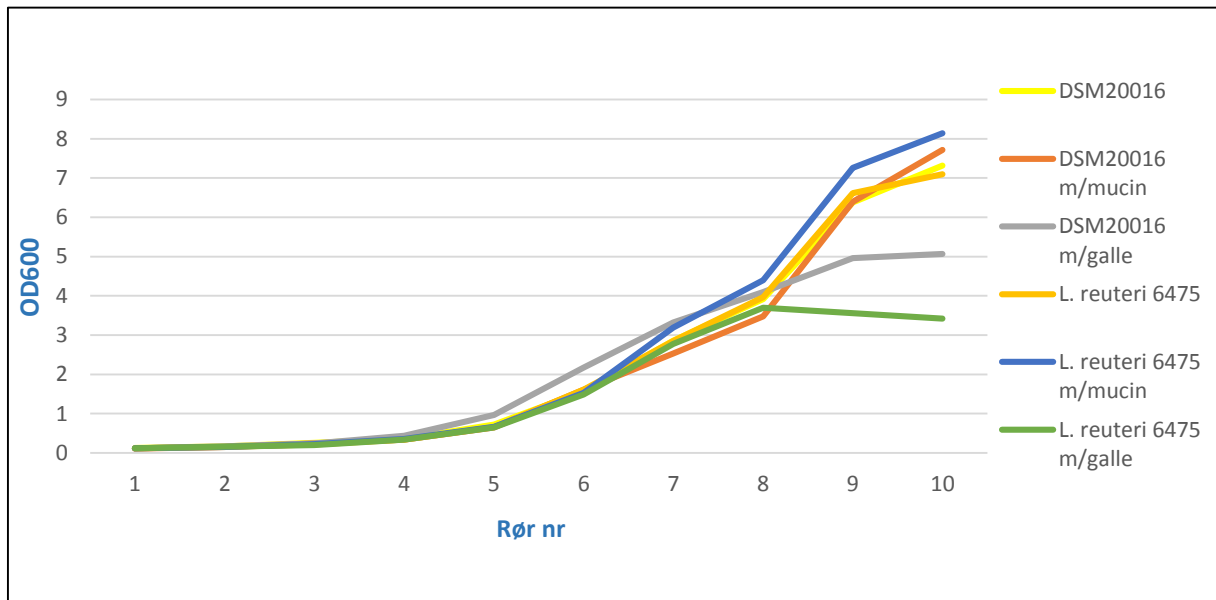
Bånd i brønn 1 og 12 viser standardkontroll. Brønn 2 har to bånd. Bånd i brønn 4-11 viser bånd med ett likt fragment, og et høyt utbytte av DNA. Forventet størrelse på nederste bånd er 1325 bp (se figur 2.6 for detaljer). Se figur 4.22 for beskrivelse av vekstutvikling i DSM20016 med MOPS-buffer tilsatt mucin.



Figur 4.22 Analyse av repetitivt område: *L. reuteri* 6475 med mucin, tilsatt MOPS-buffer.

Figur 4.22 viser analytisk agarosegel av PCR-produkt med 6475 tilsatt mucin. Bånd i brønn 1 viser standardkontroll. Bånd i brønn 2-11 viser 10 rør med bakteriekultur hvor brønn 2 er første uttak (start av kultur, lav OD₆₀₀) og brønn 11 er siste uttak (stasjonær fase, høy OD₆₀₀).

Brønn 2 og 3 i figur 4.22 viser veldig svak antydning til to bånd. Bånd i brønn 3-9 viser generelt høyt utbytte av DNA. Bånd i brønn 10 er feil. Bånd i brønn 11 har også høyt utbytte av DNA. Forventet størrelse på nederste bånd er 1325 bp (se figur 2.6 for detaljer). Se figur 4.22 for beskrivelse av vekstutvikling i DSM20016 med MOPS-buffer tilsatt mucin.



Figur 4.23 OD₆₀₀-verdier fra vekstforsøk med tilsatt MOPS-buffer. Figur 4.23 viser vekstutvikling i DSM20016 og 6475 tilsatt MOPS-buffer, med og uten galle eller mucin.

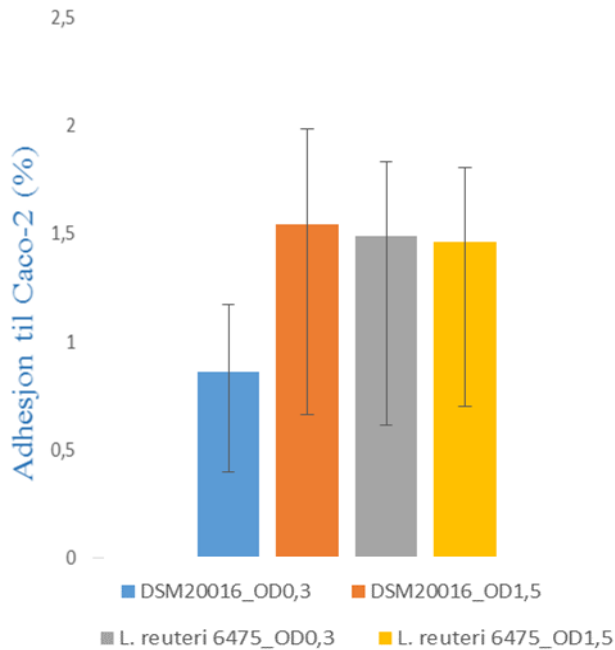
I likhet med i figur 4.1 har 6475 med mucin høyest vekstutvikling i figur 4.23. Også her vokser bakteriekultur tilsatt galle saktest, men sammenlignet med tabell 4.1 har vekstutviklingen i bakteriekultur tilført galle, økt.

4.8 Adhesjonsforsøk del B

Stammene DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin ble også testet for adhesjon til Caco-2. Målsetningen var å se om tilsatt av galle eller mucin påvirker adhesjonsevnen sammenlignet med adhesjon av stammene dyrket i kun MRS (brukt som kontroll). Forsøket ble utført én gang. Det ble kjørt PCR på alle prøvene med primerne cmbA-f2 fw og cmbA-r2 rev for å sammenligne PCR-mønsteret i adhesjon – og vekstforsøk.

4.8.1 Adhesjonsforsøk med DSM20016 og 6475

DSM2006 og 6475 ble dyrket opp i MRS-buljong tilsatt MOPS-buffer. Overnattkultur av stammene ble inokulert og videre dyrket opp til hhv $OD_{600}=0,3$ og $OD_{600}=1,5$. Disse OD_{600} -verdiene ble benyttet som utgangspunkt i adhesjonsforsøket. Tre paralleller av hver stamme ble benyttet i dette forsøket. Repetitive regioner ved $OD_{600}=0,3$ og $OD_{600}=1,5$ ble også analysert ved hjelp av PCR (se figur 4.19). Det henvises til 3.2.12 for detaljer i prosedyrer.



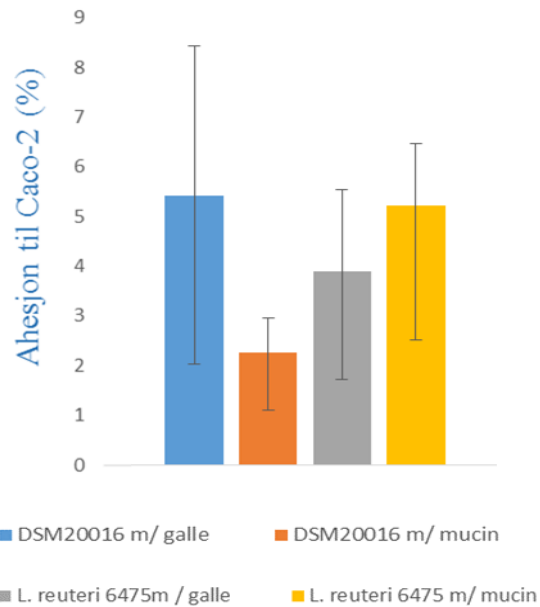
Figur 4.24 Oversikt over prosentvis adhererte celler i DSM20016 og *L. reuteri* 6475

Figur 4.24 viser adhesjon av DSM20016 og 6475 med ulike OD_{600} -verdier, til Caco-2.

I forsøket ble det benyttet tre paralleller av hver prøve. Gjennomsnitt av prosentvis adhererte celler ble beregnet ut fra disse parallellene, standardavvik ble også beregnet. Standardavvik vises som «feil felt» i hver stolpe i figur 4.24. Begge stammene har forholdsvis lav prosentvis adhesjon uavhengig av OD_{600} .

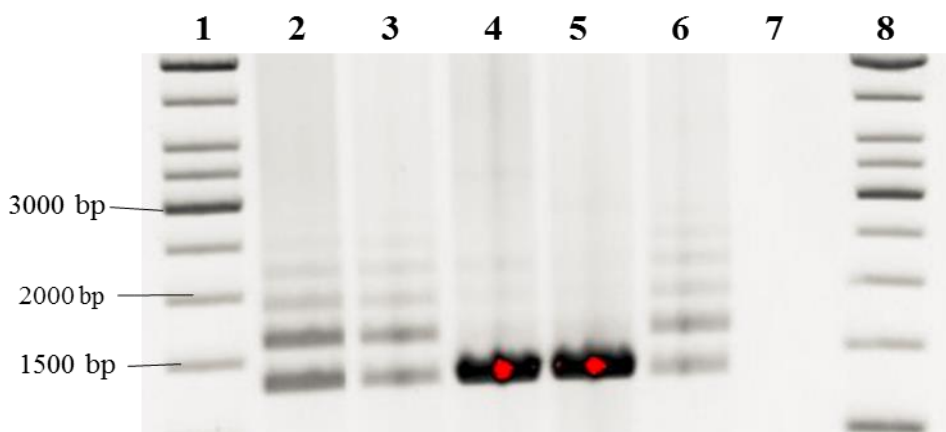
4.8.2 Adhesjonsforsøk med 6475 og DSM20016 tilsatt galle og mucin

Overnattkultur av DSM2006 og 6475 ble inokulert og tilsatt galle eller mucin, og videre dyrket opp til $OD_{600}=1,5$. Denne OD_{600} -verdien ble benyttet som utgangspunkt i adhesjonsforsøket. Tre paralleller av hver stamme med tilsats av enten galle og mucin ble benyttet i dette forsøket. Se vedlegg 7 for detaljer.



Figur 4.25 Oversikt over prosentvis adhererte celler i DSM20016 og *L. reuteri* 6475 tilsatt galle og mucin
 Figur 4.25 viser prosentvis adhesjon av DSM20016 og 6475 tilsatt galle eller mucin, til Caco-2.

I forsøket ble det benyttet tre paralleller av hver prøve. Gjennomsnitt av prosentvis adhererte celler ble beregnet ut fra disse parallellene, standardavvik ble også beregnet. Standardavvik vises som «feil felt» i hver stolpe. Stolpene viser varierende grad av adhererte celler, og sammenlignet med kontroll (kun DSM20016 og 6475) viste stammene tilsatt galle og mucin høyere prosentvis adhesjonsevne i dette tilfellet.



Figur 4.26 Analyse av repetitivt område: DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin. Bånd i brønn 1 og 8 viser standard-kontroll.

Brønn 2 og 3 illustrerer repetitivt område i DSM20016 etter $OD_{600}=0,3$ (brønn 2) og $OD_{600}=1,5$ (brønn 3). Til tross for ulike OD_{600} -verdier ser båndene like ut. De to nederste båndene i brønn 2 er riktignok sterkere enn båndene i brønn 3. Brønn 4 og 5 viser 6475 tilsatt

mucin etter $OD_{600}=1,5$. Brønn 6 viser DSM20016 tilsatt mucin med $OD_{600}=1,5$. Brønn 6 viser flere bånd og er tilsynelatende lik båndene i brønn 2 og 3. Brønn 7 skal vise 6475 tilsatt mucin $OD_{600}=1,5$, men vises ikke av uviss årsak. DSM20016 og 6475 tilsatt galle med $OD_{600}=1,5$ kom ikke opp på analytisk agarosegel av uviss årsak. Forventet størrelse på nederste bånd er 1325 bp (se figur 2.6).

5 Diskusjon

5.1 Generelt

Hovedmålet i denne oppgaven var å konstruere plasmider med *cmbA* og introdusere disse i *L. reuteri*-stammene DSM17938 og *L. reuteri* 6475. Videre å analysere hvordan de repetitive regionene i *cmbA* er i ulike vekstfaser, både med og uten stressfaktorer, og om forskjellige uttrykk gir forskjeller i adhesjonskapasitet. For å oppnå målsetningen ble syntetiske gener transformert inn i *E. coli* TOP10-celler og videre inn i *Lc. lactis* før de ble introdusert for *L. reuteri*. *CmbA* skulle avslutningsvis testes for adhesjon til Caco-2. Stammene DSM20016 og *L. reuteri* 6475 ble benyttet i analysering av repetitivt område i *cmbA*-genet.

5.2 Konstruksjon av plasmider med ulike *cmbA*-varianter for introduksjon i *L. reuteri*-stammer

Syntetisk pUC57-*cmbA* ble i første omgang transformert inn i *E. coli* TOP10-celler. Videre ble de syntetiske *cmbA*-fragmentene forsøkt transformert inn i mellomverten *Lc. lactis* ved ligering til vektor pSIP411. Mellomvert benyttes for å forhåpentligvis gjøre det enklere for *cmbA* å introduseres til *L. reuteri*. pSIP411 er en vektor i pSIP-systemet. Dette systemet, utviklet ved Nofima i Ås, har vist gode resultater tidligere (Axelsson et al., 2003; Sørvig et al., 2003; Sørvig et al., 2005) blant annet benyttet Jensen et al (2014) vektoren pSIP411 da *cmbA* fra *L. reuteri* 6475 ble klonet og uttrykt i *L. reuteri* 6475*cmbA*-. Denne ble derfor valgt ut som vektor til *cmbA*-genene i dette arbeidet. pSIP411 kan være ustabil i *E. coli*, som vanligvis er foretrukket mellomvert i kloningsarbeid (L. Axelsson, pers. komm.). *Lc. lactis* har derfor vanligvis blitt benyttet for denne vektoren (Sørvig et al., 2005).

5.2.1 Fra transformering av pUC57 til *E. coli*, til ligering av pSIP-*cmbA*

For å ha tilstrekkelig *cmbA* til dette arbeidet ble syntetisk pUC57-*cmbA* først transformert inn i *E. coli* TOP10-kompetente celler. Dette ble utført uten problemer og det lyktes å finne positive transformanter fra både pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4* ved første forsøk. Utvalgte kolonier av disse positive transformanter ble dyrket opp i buljong og plasmid av *cmbA* og pSIP411 ble isolert. *cmbA*-genene hadde på dette tidspunktet et høyt DNA-utbytte. pSIP411 hadde imidlertid lavt utbytte av DNA, det måtte derfor produseres mye isolert plasmid for å oppnå tilstrekkelig mengde nanogram (ng) DNA (se figur 4.2), noe som var meget tidkrevende.

5.2.2 Konstruksjon av *cmbA* for uttrykk i *L. reuteri*, bruk av *Lactococcus lactis* som mellomvert

Jensen et al (2014) benyttet *Lc. lactis* som mellomvert i sitt arbeid og hadde god erfaring med det, det ble derfor bestemt at bakterien også i dette arbeidet skulle tas i bruk. Det lyktes å konstruere pSIP-*cmbA3* i *Lc. lactis*. Positiv kontroll og pSIP-*cmbA3* hadde en transformasjonseffektivitet på hhv 187,5 og 75 cfu trans/ μ g DNA (se vedlegg 4) det var altså svært få kolonier som vokste opp på agarskåler. Det ble plukket 2 kolonier fra agarskål med pSIP-*cmbA3* og én av disse ble sekvensert. Sekvensering (ikke vist data i oppgaven, det henvises til L. Axelsson, Nofima) av denne kolonien viste korrekt sekvens og det ble besluttet å gå videre med denne. Det var ønskelig å transformere ~400 ng DNA av pSIP-*cmbA3* inn i *L. reuteri*. Isolering av denne kolonien ga et lavt utbytte av DNA, det måtte derfor isoleres store mengder plasmid for å ha tilstrekkelig ng DNA. Det lyktes ikke å transformere pSIP-*cmbA4* inn i *Lc. lactis* selv etter gjentatte forsøk og det var ingen vekst på agarskålene (0 cfu trans/ μ g DNA) i noen tilfeller. For positiv kontroll er det kun beregnet transformasjonseffektivitet fra én elektroporering, men denne var generelt lav i alle transformeringer. Siden det ikke lyktes å konstruere pSIP-*cmbA4* og fordi DNA-utbyttet i pSIP-*cmbA3* var såpass lavt ble det besluttet å bytte ut *Lc. lactis* med *E. coli* PK401. Denne ble anbefalt av Stefan Roos, Uppsala, som egnet til dette arbeidet på grunn av god transformasjonseffektivitet, generelt høyt utbytte av DNA (se figur 4.2 og 4.8 for å sammenligne forskjellen i DNA-ubytte) og at pSIP411 har vist seg stabil i denne verten. Med god transformasjonseffektivitet ville man kunne transformere med betydelig mindre ng (~10 ng) DNA og konstruksjonsarbeid blir enklere. Høyt utbytte ble mer effektivt og man slapp å produsere så mye plasmid som tidligere.

5.2.3 Konstruksjon av *E. coli*-stammer med pSIP-*cmbA1*, pSIP-*cmbA3* og pSIP-*cmbA4*

Til tross for at pSIP-*cmbA3* allerede var introdusert til *Lc. lactis* var det som tidligere nevnt generelt lavt utbytte av DNA i isolerte plasmid. Plasmid av pSIP-*cmbA3* med ~10 ng DNA ble derfor transformert inn i *E. coli* PK401. For å kunne elektroporere *cmbA4* inn i *E. coli* PK401 ble hele prosessen i metodedel 3.2.1 – 3.2.10 gjentatt, og ligeringen med ~10 ng DNA ble elektroporerert. På dette tidspunkt ble det også bestemt at pSIP-*cmbA1* (benyttet i Jensen et al., 2014, da kalt pSIP-*cmbA*) skulle tas med i arbeidet og introduseres til DSM17398 og for å brukes som en positiv og negativ kontroll i adhesjonsforsøket. *L. reuteri* DSM17398 er en human *L. reuteri*-stamme med lav adhesjonskapasitet (Jensen et al., 2012) som ikke inneholder *cmbA*-genet og ville derfor være en bedre egnet stamme for å se på effekten av *cmbA*-genet enn den muterte varianten *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻. Plasmid av pSIP-*cmbA1* ble elektroporerert inn i *E. coli* PK401 for å oppnå høyere DNA-utbytte. Det ble funnet positive transformanter

for både pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3*. Positiv kontroll hadde høy transformasjonseffektivitet ($2,5 \times 10^5$ cfu trans/ μ g DNA), både pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* hadde også relativt høy verdi (hhv 5×10^5 og $2,1 \times 10^4$ cfu trans/ μ g DNA). Det vokste flere kolonier opp på agarskåler med pSIP-*cmbA4* og transformasjonseffektiviteten var $2,5 \times 10^4$ cfu trans/ μ g DNA, altså noe lavere enn i både pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3*. Koloniene skilte seg imidlertid ut fra kolonier fra både pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* ved at de var betydelig større (ikke vist i oppgaven). Det lyktes ikke å finne positive transformanter for pSIP-*cmbA4*. Figur 4.9 viser *cmbA4*-bånd som er lavere enn *cmbA3* og man kan dermed slå fast at dette er feil. På dette tidspunkt ble det besluttet å ikke gå videre med *cmbA4* og dermed avslutte forsøkene med å transformere den inn i *E. coli* PK401. Det kan spekuleres i om *cmbA4*-genet på 3.4 kb er for stort til å introduseres i *Lc. lactis* siden et større gen alltid er litt vanskeligere, og effektiviteten var så lav at det kunne gi utslag. Forsøk på å transformere ligering av *cmbA4* inn i *E. coli* ble muligens vanskelig fordi ligeringer alltid er vanskeligere enn plasmid (som både *cmbA1* og *cmbA3* ble transformert med) og her kan også de repetitive regionene årsake problemer, da vil en ligering være utsatt. *cmbA3*-genet fikk positive transformanter i begge mellomverten så man kan anta at fragmentstørrelsen genet har på 3.1 kb ikke er for stort for introduksjon til hverken *Lc. lactis* eller *E. coli* PK401.

5.2.4 Konstruksjon av *L. reuteri*-stammer med pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3*

Plasmid av både pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* ble videre elektroporert inn i *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ (kun pSIP-*cmbA3*) og DSM17398. Positiv kontroll med *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ hadde en transformasjonseffektivitet på 2500 cfu trans/ μ g DNA mens positiv kontroll med DSM17398 hadde en mye lavere verdi med 7,5 cfu trans/ μ g DNA, dette gjenspeiles også i pSIP-*cmbA3* hvor transformasjonseffektiviteten i *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻ og DSM17398 var på hhv 375 og 25 cfu trans/ μ g DNA. Videre vokste det ikke opp noen kolonier med pSIP-*cmbA1* i DSM17398. Kolonier fra pSIP-*cmbA3* ble isolert og analysert, og positive transformanter ble funnet ved PCR og sekvensering i *L. reuteri* 6475*cmbA*⁻. Det lyktes ikke å finne positive transformanter med pSIP-*cmbA3* i DSM17398. Med lav transformasjonseffektivitet i positiv kontroll, og negativt resultat i både pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3* kan det tyde på at det er vanskeligere å introdusere genene i akkurat denne stammen.

5.3 Adhesjonsforsøk med pSIP-*cmbA1* og pSIP-*cmbA3*

Målsetningen i adhesjonsforsøket med *cmbA* var å se om det er forskjell på adhesjon for *L. reuteri* som uttrykker *cmbA3* eller *cmbA1*. Stammene ble tilsatt induksjonspeptid for å kontrollert uttrykke genene, adhesjon ble dermed testet med induisert og ikke-indusert *cmbA*. Forsøket ble kun utført én gang på grunn av tidsmangel, det er derfor vanskelig å tolke resultatene på en ønskelig måte. Indusert pSIP-*cmbA3* hadde en tendens til høyere prosentvis adhererte celler enn ikke-indusert pSIP-*cmbA3* i dette tilfellet (ikke statistisk signifikant). Positiv og negativ kontroll viste imidlertid motsatt resultat. I arbeidet til Jensen et al (2014) viste adhesjonsforsøk at prosentvis adhererte celler til Caco-2 varierte fra ~1 og ~10%. I dette forsøket hadde induisert og ikke-indusert prosentvis adhesjon på hhv 4,6 og 6,4 %. Positiv og negativ kontroll hadde en prosentvis adhesjon på hhv 6,9 og 4,9 %. Standardavvikene er i midlertidig for store til at man kan konkludere ut fra kun ett forsøk.

5.4 Vekstforsøk med *L. reuteri* DSM20016 og *L. reuteri* 6475 med og uten galle eller mucin

Målsetningen i denne delen var å analysere variasjonen i repetitive områder i *cmbA* i ulike vekstfaser og i tillegg til å se om tilsats av galle og mucin påvirket resultatet. Målet var å sammenligne DSM20016 og 6475 dyrket i kun MRS, som ble brukt som kontrollkultur, med samme stammene tilsatt galle og mucin. MOPS-buffer ble etter hvert tilsatt i MRS-buljongen for å hindre en eventuell felling i kulturen (spesielt ble dette observert i stammene tilsatt galle). Vekstforsøk ble utført fire ganger på kontrollene (DSM20016 og 6475 kun med MRS-buljong) og tre ganger på de resterende bakteriekulturene.

5.4.1 Bestemmelse av konsentrasjon av galle

Det var viktig å finne en såkalt subinhiberende konsentrasjon av galle, dvs. en konsentrasjon som hverken hemmet helt (for høy konsentrasjon) eller ikke hadde noen påvirkning (for lav konsentrasjon) i forsøkene. Påvirkningen på vekst for hver konsentrasjon av galle ble bestemt ved hjelp av øyemål og OD₆₀₀-verdier etter 5 timer vekst. For høy konsentrasjon (1 og 2%) av galle hadde tydeligvis en hemmende effekt da det var liten vekst å se (også i overnattekultur, ikke vist i oppgaven). På bakgrunn av øyemål og OD₆₀₀-verdi i 0,25 % galle ble det besluttet å bruke denne konsentrasjonen i adhesjon- og vekstforsøk.

5.4.2 Analyse av repetitivt område i DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin

Jensen, Rud & Axelsson (upublisert) observerte opptil 8 slike regioner i kultur fra agar, og antall regioner så også ut til å være tilfeldig og varierende. Forskerne så at i den dominante typen av *cmbA* i *L. reuteri* 6475 fra buljong ga et fragment på 1300 – 1350 bp (med primerpar *cmbA* f2 og *cmbA* rev) og indikerte en tilstedeværelse av hovedsakelig én repetert region (se figur 2.6). Flere bånd betyr at kulturen (som kjøres på PCR) er mer heterogen, og flere slike bånd tyder på at noen celler har 1 region, andre har 2, osv. Hvis celler som har blitt dyrket en stund og har høy OD₆₀₀-verdi har flere bånd kan det bety at vekstfase har litt betydning for variasjonen. En målsetning var derfor å undersøke årsaken og effekten av dette fenomenet. Målsetningen i vekstforsøkene var også å sammenligne DSM20016 og 6475 dyrket opp i kun MRS-buljong (eventuelt med MOPS-buffer), med samme stammer tilsatt mucin eller galle, og se om dette påvirket variasjonen av de repetitive regionene. MOPS-buffer så ikke ut til å påvirke noen av kulturene ved analyse av de repeterende regionene fra PCR-produkt på agarosegel. Pelletene fra stammene tilsatt galle (som ble plukket for PCR) så imidlertid ut til å bli mer lik stammene med og uten mucin. Før tilsats av MOPS-buffer hadde disse pelletene fra stammene tilsatt galle en rødaktig farge, og pelletene hadde dessuten en løsere konsistens.

Analyse av DSM20016 med og uten tilsats av galle eller mucin

I kontrollen (DSM20016 med kun MRS og eventuelt MOPS-buffer) var båndene med kraftigst utbytte i starten av vekstfasen. Båndene i slutten av vekstfasen viste flere bånd, noe som kan antyde større variasjon når det gjelder de repetitive regionene (se figur 4.14). I DSM20016 med mucin kom det ikke opp bånd i starten av vekstforsøket, av uvisst årsak, til tross for flere forsøk på å kjøre PCR. Bånd i brønn 6-11 viste imidlertid flere bånd og dermed stor variasjon på antall repeterende regioner i kulturen. Mønsteret var ellers likt (se figur 4.19). Også i DSM20016 med galle kom det ikke opp bånd i starten, av uvisst årsak, det ble også her forsøkt å kjøre PCR flere ganger uten å lykkes. Sammenligner man båndene i kontrollen med DSM20016 tilsatt mucin eller galle, ser man at båndene i mucin og galle har bedre utbytte enn i båndene (brønn 7-11) i kontrollen. DSM20016 med mucin og galle har et ganske likt mønster med flere repeterende regioner. Det kan tenkes at mucin muligens kan inducere større variasjon og eventuell forskjell til binding tatt i betraktning at mucin har høyere utbytte på slutten enn kontrollen.

Analyse av 6475 med og uten tilsats av galle eller mucin

I kontrollen (6475 kun med MRS og eventuelt MOPS-buffer) hadde båndene i starten av veksten (bånd i brønn 2-5) antydninger til flere bånd, noe som antyder større variasjon i de repeterende regionene, ellers hadde kontrollen ett bånd fra brønn 6-11. I 6475 med mucin viste de to første brønnene veldig svak antydning til to bånd. Båndene hadde generelt et høyt utbytte (se figur 4.22). 6475 med galle har svak antydning til to bånd i brønn 2-4. de to første båndene i brønn 2 og 3 har et svakere utbytte enn resterende bånd som har høyt utbytte. Kontrollen har antydninger til flere bånd i flere brønner enn 6475 med mucin og galle, som kan bety at mucin eller galle hemmer evnen til større variasjon i repeterende regioner. Kontrollen hadde også et høyere utbytte i hvert bånd. Utbytte i bånd kan imidlertid skyldes mer tekniske årsaker snarere enn biologiske årsaker, dette gjelder for alle PCR'ene.

Analyse av vekstutvikling i DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin

OD₆₀₀ ble målt for kontroll-stammene og stammene tilsatt mucin omtrent på samme tid gjennom hele vekstforsøkene. Stammene med galle vokste betydelig saktere, og OD₆₀₀ ble derfor alltid målt ~30 – 60 min etter øvrige kulturer. 6475 og DSM20016 tilsatt mucin vokste raskest i alle vekstforsøk utført, både med og uten tilsatt MOPS-buffer. På bakgrunn av dette kan det tyde på at mucin øker veksten i disse bakteriekulturene. Alle kulturene bortsett fra de tilsatt galle har omtrentlig lik vekstutvikling, det kan likevel se ut til at MOPS-buffer øker veksten (også i kultur tilsatt galle). Laktobaciller (og andre MSB) produserer melkesyre når de vokser. pH vil derfor synke i en kultur uten buffer (kun MRS har noe fosfatbuffer, men pH synker likevel). Lavere pH og melkesyre vil også hemme melkesyrebakterien selv (Axelsson, 2004). MOPS er en kraftig bufferforbindelse, som delvis vil hindre at pH synker så raskt som den ellers vil gjøre (melkesyre produseres fortsatt). Dette gjør at «selvinhiberingen» utsettes og bakterien kan vokse noe raskere. Når det gjelder galle blir effekten enda større fordi galle inhiberes mest ved lav pH. Også her vil altså MOPS forhindre at galle blir så inhiberende som den ellers hadde blitt. MOPS ble brukt for å forhindre utfelling, som også sannsynligvis har med pH å gjøre.

5.5 Adhesjonsforsøk med DSM20016 og 6475 med og uten galle eller mucin

Målsetningen i adhesjonsforsøk med DSM20016 og 6475 var å analysere adhesjonsegenskapene til disse, og se om tilsats av galle og mucin påvirket resultatet. Forsøket ble kun utført én gang på grunn av tidsmangel, det er derfor vanskelig å tolke resultatene på en ønskelig måte. I arbeidet til Jensen et al (2014) viste adhesjonsforsøk at prosentvis adhererte celler til Caco-2 varierte fra ~1 og ~10%. I dette forsøket er prosentvis adhererte celler for DSM20016 og 6475 hhv 1,64 og 1,46 % ved $OD_{600}=1,5$. For DSM20016 og 6475 tilsatt mucin er prosentvis adhererte celler hhv 2,25 og 5,2 %. For DSM20016 og 6475 tilsatt galle er prosentvis adhererte celler hhv 5,4 og 3,88 %. Adhesjon er her altså høyere i stammene tilsatt galle og mucin, det er likevel store standardavvik, spesielt i stammene tilsatt galle og mucin.

Repeterende regioner

I adhesjonsforsøket ble det også kjørt PCR av DSM20016 og 6475 med og uten galle og mucin for å kontrollere at mønsteret var det samme som i vekstforsøkene ved akkurat samme forhold. PCR-produkt av galle ble dessverre ikke påvist. Det var veldig liten forskjell i mønsteret i stammene fra både adhesjon – og vekstforsøk. Figur 4.26 viser at båndene er svært like hverandre, og at de også ligner på DSM20016 og 6475 i vekstforsøkene.

6 Konklusjon og forslag til videre arbeid

I dette arbeidet ble det brukt to syntetisk produserte varianter av *cmbA*-genet, tilstede i plasmidene pUC57-*cmbA3* og pUC57-*cmbA4*. Det lyktes å transformere *cmbA3*-varianten inn i *L. reuteri* 6475*cmbA* i en konstruksjon med vektor pSIP411 og stammen ble testet for adhesjon til Caco-2 celler. Siden det ikke lyktes å finne positive transformanter av *cmbA4* i hverken *Lc. lactis* og *E. coli* PK401 kan det tenkes at genet som er 3.4 kb kanskje er for stort, men også at genet har egenskaper som gjør det vanskelig å introdusere i ulike stammer. Siden antall repetitive regioner er det som skiller genene kan det være akkurat denne delen som årsaker vanskelighetene. I vekstforsøkene vokste DSM20016 og 6475 tilsatt galle betydelig saktere enn resterende, imidlertid økte veksten ved tilsats av MOPS-buffer. Det kan antas at MOPS hindrer stor hemming i bakteriekulturene med galle. Fra PCR-produkt var det ingen signifikante forskjeller i de repetitive mønstrene, men i DSM20016 kan det tenkes at mucin kanskje inducerer større variasjon og eventuell forskjell til binding tatt i betraktning at mucin hadde høyere utbytte i båndene på slutten av vekstforsøket enn kontrollen. I 6475 har kontrollen antydninger til flere bånd enn 6475 med mucin og galle i tillegg til et høyere utbytte i hvert bånd. Dette kan tyde på at mucin eller galle hemmer evnen til større variasjon i repeterende regioner i 6475.

Som en fortsettelse av dette arbeidet hadde det vært interessant å finne positive transformanter av *cmbA4* i *L. reuteri*-stammene, og av både *cmbA3*, *cmbA4* og *cmbA1* i DSM17398. Med dette utgangspunktet kan man analysere eventuelle ulikheter i *cmbA*-genet og betydningen av disse i adhesjonsforsøk. Adhesjonsforsøk burde også utføres flere ganger for å oppnå et signifikant resultat. En annen interessant målsetning kan være å tilsette flere stressfaktorer i vekstforsøkene med stammene DSM20016 og *L. reuteri* 6475 for å ytterligere analysere de repetitive regionene i *cmbA*. Noe som var tenkt helt i starten av denne oppgaven var også å teste de ulike variantene av *L. reuteri* for adhesjon til mucus. Siden det er vist at den repetitive regionen har betydning for binding til mucus (Etzold et al., 2014) så vil adhesjonseksperimenter med akkurat mucus kunne vise større forskjeller enn adhesjon til intestinale celler. Assay for mucusbinding er imidlertid ikke satt opp på Nofima og tidsmangel gjorde at det ikke var mulig å sette opp og optimalisere innen rammen for denne oppgaven. En annen mulighet for å studere variasjonen i de ulike stammene og under ulike forhold er å analysere direkte på proteinet istedenfor på genet, som ble gjort i denne oppgaven. Dette ble gjort av Etzold et al (2014) ved å bruke antistoff rettet mot den repetitive regionen.

7 Litteraturliste

- Ahrné S, Molin G & Axelsson L (1992). Transformation of *Lactobacillus reuteri* with electroporation: studies on the erythromycin resistance plasmid pLUL631. *Curr. Microbiol.* (24): 199-205.
- Ahrné S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I., Wold, A & Molin, G (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.*, (85): 88-94.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid bacteria: classification and physiology in Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded. S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand. New York, Marcel Dekker, Inc./CRC Press: 1-66.
- Begley M, Gahan C. G. M. & Hill C (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (4): 625-651.
- Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M & Siezen R. J (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology*. (152): 273-280.
- Bongaerts G. P. A & Severijnen R. S. V. M (2001). The beneficial, antimicrobial effect of probiotics,” *Medical Hypotheses*, vol. 56, no. 2, pp. 174-177.
- Buck B. L, Altermann E, Svingerud T & Klaenhammer T. R (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (12): 8344-8351.
- Båth K, Roos S, Wall T & Jonsson H (2005). The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 253 (1) 75-82.
- Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Z. Zhang Z & Fang W (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*: 115 (3): 307-312.
- Cotter PD, Hill C & Ross RP (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* (3):777-788.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE & Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (308): 1635-1638.
- Fozo E. M., Kajfasz J. K. R. G & Quivey Jr. R. G. (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 238 (2): 291-295.
- Gallo R. L. & Hooper L. V (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology*, vol. 12 (7): 503-516.
- Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M & Salminen S (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*, 39 (4): 467-471.
- Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E & Malagelada J. R (2001). Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut*, 48 (4): 503-507.
- Garmasheva I. L & Kovalenko N. K (2005). Adhesive properties of lactic acid bacteria and methods of their investigation. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 67 (4): 68-84, 2005.
- Granato D, Perotti F, Masserey I et al.,(1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3): 1071-1077.
- Gasson MJ (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* (154): 1-9.

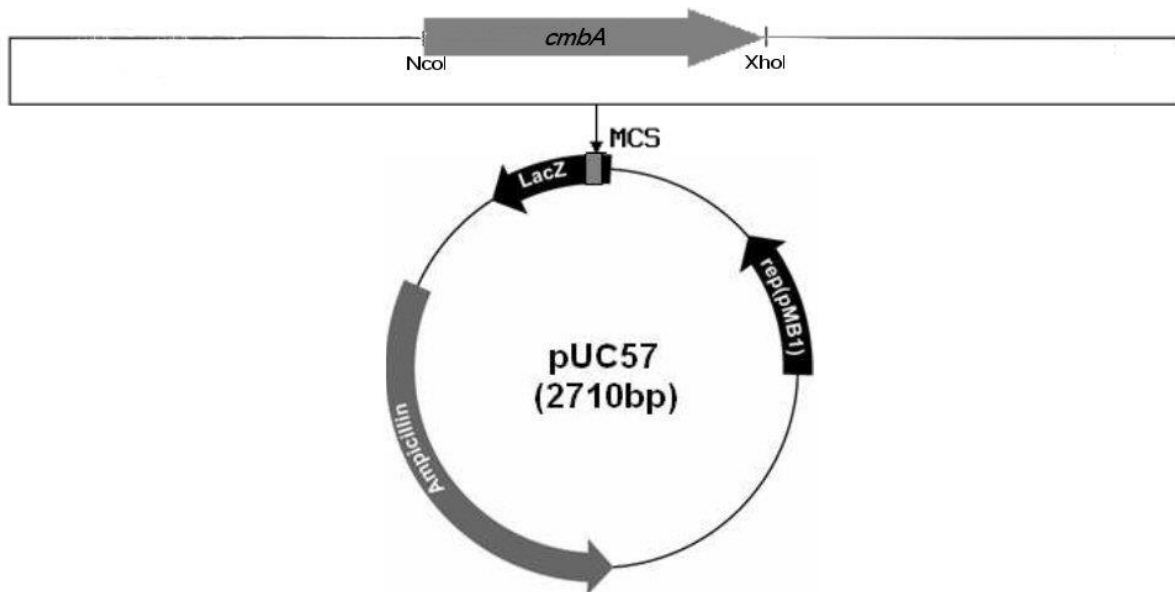
- Guerzoni M. E., Lanciotti R & Cocconcelli P. S (2001). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 147 (8): 2255–2264.
- Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F.R (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* (204): 63-113.
- Holo, H. & Nes, I.F (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* (55): 3119-3123.
- Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori L & Yokochi T (2003). The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiology and Immunology*, 47 (6): 405–409.
- Kandler O, Stetter K-O & Köhl R (1980). *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. C* (1): 264-269.
- Khoury KA, Floch MH & Hersh T (1969). Small intestinal mucosal cell proliferation and bacterial flora in the conventionalization of the germfree mouse. *J Exp Med.* (130): 659–70. 10.1084/jem.130.3.659.
- Kleerebezem M, Hols P, Bernard E et al., (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, (2): 199–230.
- Kravtsov E. G, Yermolayev A. V, Anokhina I. V, Yashina N. V, Chesnokova V. L & Dalin M. V (2008). Adhesion characteristics of *Lactobacillus* is a criterion of the probiotic choice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 145 (2): 232–234.
- Ley RE, Peterson DA og Gordon JI. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. (124): 837–848.
- Libudzisz Z (2004): Human intestinal microflora and probiotics. *Zakażenia* (6): 47-51 (Polish).
- Lorca G, Torino M. I, Font de Valdez G & Ljungh A (2002). Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiology Letters*, 206 (1): 31–37.
- Mack D. R , Michail S, Wei S, McDougall L, & Hollingsworth M. A (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology*, 276 (4): 941–950.
- Mack D. R, Ahrne S, Hyde L, Wei S & Hollingsworth M. A (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52 (6): 827–833
- MacKenzie D. A, Jeffers F, Parker M. et al., (2010). Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 156 (11): 3368– 3378.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, et al (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* (103): 15611-15616.
- Maukonen J, Mättö J, Suihko M. L, & Saarela M (2008). Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota. *Journal of Medical Microbiology*, 57 (12): 1560–1568.
- Marraffini L. A, Dedent A.C & Schneewind O (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (1): 192–221.
- Navarre W. W & Schneewind O (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 14 (1): 115–121.

- Neville B. A, Forde B. M, Claesson M. J, et al., (2012). Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile lactobacilli. *PLoS ONE*, (7): 7, Article ID e40592.
- Oh PL, Benson AK, Peterson DA, Patil PB, Moriyama EN, Roos S & Walter J (2010) Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *ISME Journal* (4): 377-387.
- Piątek J, Gibas-Dorna M, Olejnik A, et al. (2012): The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination – in vitro study. *Ann Agric Environ Med* (19): 99-102.
- Rakoff-Nahoum S & Medzhitov R (2008). Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunol.* (1): S10–S14.
- Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One.*;6:e17996. doi: 10.1371/journal.pone.0017996.
- Reuter G (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol* (2): 43–53.
- Rosander A, Connolly E & Roos S (2008) Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol* (74): 6032-6040.
- Sambrook J, Fritsch E. F & Maniatis T (1989). *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Servin A. L (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (4): 405–440.
- Steele J, Broadbent J & Kok J (2013): Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Curr Opin Biotechnol*, (24):135-141.
- Stiles ME & Holzapfel WH (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, (36):1-29.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H & Hale LP (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. (11): 1131–1140.
- Sørvig E, Grönqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VGH & Axelsson L (2003). Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* (229): 119-126.
- Taranto M. P, Fernandez Murga M. L, Lorca G & De Valdez G. F (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (1): 86–91.
- Vélez M. P, De Keersmaecker S. C. J & Vanderleyden J (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276 (2): 140–148.
- von Wright A, Tynkkynen S & Suominen M (1987). Cloning of a *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* chromosomal fragment associated with the ability to grow in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* (53): 1584-1588.
- Yvon M & Rijnen L (2001): Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Research* (11): 185-201.
- Årsköld E, Lohmeier-Vogel E, Cao R, Roos S, Rådström P & van Niel EWJ (2008). Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis. *J Bacteriol*,190(1):206–212.

8 Vedlegg

8.1 Vedlegg 1: Figur av pUC57 med innsatt *cmbA*-gen

Sekvensen nedenfor er pUC57 (uten *cmbA*). Multikloningsete og AatII restriksjonssete er markert.



>pUC57

```
TCGCGCGTTTTCCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
CGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCCTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACATG
CGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAAT
ACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
GTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCGGATCCCGGGCCCGTC
GACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA
CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
AAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGA
TACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT
GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT
GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC
```

MultiCloning

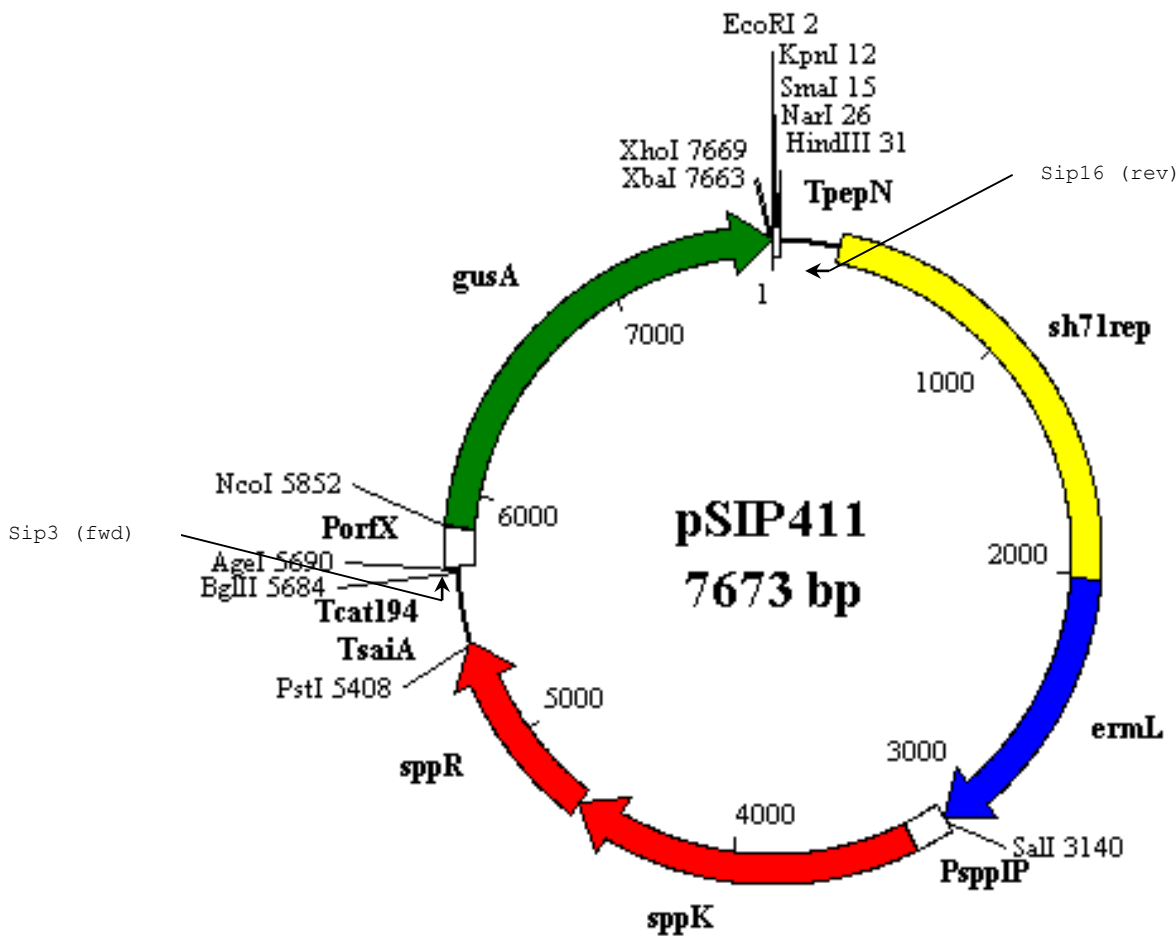
GGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTTGATCTTTTCT
ACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGT
TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC
TCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTA
TCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAAC
GTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAA
CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTC
AGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
GTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC
TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTTGAAAAACGT
TCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC
TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT
TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTGACGTC TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGG
CCCTTTCGTC

AatII

AatII	G_ACGT'C	1	2646
BsmI	GAATG_Cn'	1	425
EcoRI	G'AATT_C	1	397
EcoRV	GAT'ATC	1	432
HindIII	A'AGCT_T	1	472
KpnI	G_GTAC'C	1	413
NruI	TCG'CGA	1	417
NsiI	A_TGCA'T	1	425
PspOMI	G'GGCC_C	1	443
PstI	C_TGCA'G	1	458
SacI	G_AGCT'C	1	407
SalI	G'TCGA_C	1	449
SapI	GCTCTCn'nnn_	1	715
SmaI	CCC'GGG	1	442
SphI	G_CATG'C	1	470
StuI	AGG'CCT	1	462
XbaI	T'CTAG_A	1	426
XmaI	C'CCGG_G	1	440

8.2 Vedlegg 2: Plasmidkart og sekvens av vektoren pSIP411

Posisjon av relevante primere, restriksjonsseter og reporter-genet *gusA* er markert.



>pSIP411

EcoRI GAATTCGGTACCCCGGGTTTCGAAGGCGCCAAGCTTCAAATTACAGCACGTGTTGCTTTGATTGATAGCCAAAAAG
 CAGCAGTTGATAAAGCAATTACTGATATTGCTGAAAAATTGTAATTTATAAAATAAAAAATCACCTTTTAGAGGTGG
 TTTTTTTATTTATAAATTATTCGTTTGTATTCGCTTTTCGATAGAACAATCAAAGCGAGAATAAGGAAGATAAAATC
 CCATAAGGGCGGGAGCAGAAATGTCCGAGACTAATTCATGAGATCGATTTTTTTATTTAAACGTCTCAAAAATCGTTT
 CTGAGACGTTTTAGCGTTTTATTTTCGTTTAGTTATCGGCATAATCGTTAAAAACAGGCGTTATCGTAGCGTAAAAAGC
 CCTTGAGCGTAGCGTGCTTTGCAGCGAAGATGTTGTCTGTTAGATTATGAAAGCCGATGACTGAATGAAATAATA
 AGCGCAGCGTCTTCTATTTTCGTTTGGAGGAGGCTCAAGGGAGTTTGGAGGAATGAAATTCCTCATGGGTTTGA
 TTTTAAAAATTGCTTGCAATTTTGCCGAGCGGTAGCGCTGGAAAAATTTTTGAAAAAAATTTGGAATTTGGAAAA
 AAATGGGGGGAAAGGAAGCAATTTTGCTTCCGTACTACGACCCCCCATTAAAGTGCCGAGTGCCAATTTTTGTGC
 CAAAAACGCTCTATCCCAACTGGCTCAAGGGTTTGGAGGGTTTTTCAATCGCCAACGAATCGCCAACGTTTTTCGC
 CAACGTTTTTTATAAATCTATATTTAAGTAGCTTTATTGTTGTTTTTATGATTACAAAGTGATACACTAATTTTA
 TAAAATTTTGGATTGGAGTTTTTTAAATGGTGATTTTCAGAATCGAAAAAAGAGTTATGATTTCTCTGACAAAA
 GAGCAAGATAAAAAATTAACAGATATGGCGAAACAAAAAGGTTTTTCAAATCTGCGGTTGCGGCGTTAGCTATA
 GAAGAATATGCAAGAAAGGAATCAGAATAAAAAAATAAGCGAAAGCTCGCGTTTTTTAGAAGGATACGAGTTTTTC

Sip16 (rev)

GCTACTTGTTTTTGATAAGGTAATATATCATGGCTATTAATACTAAAGCTAGAAAATTTGGATTTTTATTATAT
CCTGACTCAATTCCTAATGATTGGAAAGAAAAATTAGAGAGTTTTGGGCGTATCTATGGCTGTCAGTCCTTTACAC
GATATGGACGAAAAAAGATAAAGATACATGGAATAGTAGTGATGTTATACGAAATGGAAAGCACTATAAAAA
CCACACTATCACGTTATATATATTGCACGAAATCCTGTAACAATAGAAAAGCGTTAGGAACAAGATTAAGCGAAAA
TTGGGGAATAGTTTCAAGTTGCTCATGTTGAGATACTTGATTATATCAAAGGTTTATATGAATATTTGACTCATGAA
TCAAAGGACGCTATTGCTAAGAATAAACATATATACGACAAAAAAGATATTTTGAACATTAATGATTTTGATATT
GACCGCTATATAACACTTGATGAAAGCCAAAAAGAGAATTGAAGAATTTACTTTTAGATATAGTGGATGACTAT
AATTTGGTAAATACAAAAGATTTAATGGCTTTTTATTTCGCTTAGGGGAGCGGAGTTTGAATTTTAAATACGAAT
GATGTAAGATATTGTTTCAACAACTCTAGCGCTTTAGATTATGGTTTGGGGCAATTATCAGTGTGGATAT
AGAGCAAGTTATGCAAAGTTCTTGATGCTGAAACGGGGGAAATAAAATGACAAACAAAAGAAAAAGAGTTATTTG
CTGAAAATGAGGAATTAAAAAAGAAATTAAGGACTTAAAAGAGCGTATTGAAAGATACAGAGAAAATGGAAGTTG
AATTAAGTACAACAATAGATTTATTGAGAGGAGGGATTATTGAATAAAATAAAAGCCCCCTGACGAAAGTCGAAG
GGGGCTTTTTATTTTGGTTTGGATGTTGCGATTAATAGCAATACGATTGCAATAAACAAAATGATCCCTTAGAAGC
AACTTAAGAGTGTGTTGATAGTGCATTATCTAAAATTTGTATAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAA
AAATAGGAATTGAAGTTAAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAAGGAGGGATTTCGTCATGTTGGTATTCCA
AATGCGTAATGTAGATAAAACATCTACTGTTTTGAAACAGACTAAAAACAGTGATTACGCAGATAAAATAAATACG
TTAGATTAATTCCTACCAGTGACTAATCTTATGACTTTTTAAACAGATAACTAAAAATACAAACAAATCGTTTAA
CTTCAGGAGAGATTACATGAACAAAAATATAAATATCTCAAATTTTTAAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAAAAT
AATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTTACGAAATTTGGAACAGGTAAAGGGCATTTAACGACGAA
ACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCATTGAATTAGACAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATTT
AAAATGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTTAACAAAACAGAGGTATAA
AATTTGTTGGGAATATTCCTTACAATTTAAGCACACAAATTTAATAAAAGTGGTTTTTGAAGCCGTGCGTCTGA
CATCTATCTGACTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCA
CACTCAAGTCTCGATTAGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCCTAAACCAAAAAGTAAACAGTGT
CTTAATAAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAAATATTGGAAGCTATATAAGTACTTTGTTTTCAA
ATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTTCGTCAAGCAATGAAACACGCCAAAAGTAA
CAATTTAAGTACCATTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAATAGTTATCTATTATTTAACGGGAGGAAATA
ATTCATGAGTCGCTTTTTTAAATTTGGAAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATGGAGACCGGGTTCGACCTTCA
ATAGAGTTCTTAACGTTAATCCGAAAAAACTAACGTTAATATTAATAAATAAGATCCGCTTGTGAATPATGTAT
AATTTGATTAGACTAAAGAATAGGAGAAAGTATGATGATATTTAAAAAACTTCTCGTTAAGATAGGTTGTTGGT
GAGCATGTTATATACGGATGTATCGGTTTTCTTAATGCAAAATTTTGGTTGCTATCTTATTAATTTTCTATTATA
TAGATATATTTCAAAGAAAGATAACATTTAAACGGATCATATTAGATATTTAATAGCGATTATTTTTCAATATT
ATATCTGTTTTATTTAGATGCGTCATTACTTGTAAATGGTATTAATGCGATTAGGGTGGCATTTCATCAACAAAA
AGAAAATAAGATAAAAACGACTGATACAGCTAATTTAATTCCTAATTATCGTGATCCAGTTATTGTTAGTTGCGGT
TGGGACTATTATTAGTCAGTTTACCATATCGATTATCAAAAGTGATTTAGCCAAAATATATTGAACAATAGTGC
AACAGATATAACTTTATTAGGTATTTCTTTGCTGTTTTATTTGACGGCTTGTCTTATATTATTGAAGAATAA
GCGGACTGAATTACAACATTTAAATCAAGAAATCATTGAATTTTCGTTAGAAAAACAATTTTTATATTATATT
TATTTTATTTATAGTAATAGAAATTTTATTTAGCAGTTGGGAATCTTCAAGGAGTAACAGCCACGATATTATTAAC
CATTATCATTATTTTTGTGTCTTATCGGGATGACTTTTTGGCAAGTGATGCTTTTTTTGAAGGCTTATTCGAT
TCGCCAAGAAGCCAATGACCAATTGGTCCGGAATCAACAACCTTCAAGATTATCTAGTCAATATCGAACAGCAGTA
CACCGAATTACGGCGATTTAAGCATGATTATCAAAACATCTTATTATCGTTGGAGAGTTTTGCCGAAAAGGGCGA
TCAGCAACAGTTAAGGCGTATTACCAAGAATTATTAGCACACCGCCAATTCAAAAGTGAATCCAAGGGGCAAGT
CATTGCACAACCTCGACTACTTGA AAAATGATCCTATTTCGAGGATTAGTCATTCAAAAAGTTTTTGGCAGCCAAA
GGCTGGTGTACTTTAAAATTCGAAATGACCGAACCAATCGAATTAGCAACCGCTAATCTATTAACGGTTATTCG
GATTATCGGTATTTTATTAGACAATGCGATTGAACAAGCCGTTCAAGAAACCGATCAATTTGGTGAGTTGTGCTTT
CTTACAATCTGATGGTTTAAATCGAAATACGATTGAAAATACGGCCAGTCAAGTTAAGAATCTCCAAGCATTTTC
AGAGTTAGGCTATTCACGAAAGGGCGCTGGTTCGGGGGACTGGTTTAGCTAATGTGCAGGATTTGATTGCCAAA
AACCAATTTATTCTTAGAAACACAGATTGAAAATAGAAAGTTACGACAGACATTGATGATTACGGAGGAACTTA
ATTTGTATCCCGTTTATTTATTAGAGGATGATTTACAGCAACAAGCGATTTATCAGCAAAATATCGCGAATACGA
TTATGATTAACGAATTTGCAATGACTTTAACATGCGCTGCCAGTGATACTGAGACATTGTTGGCGGCAATTAAGG
ATCAGCAACGAGGTTTTATTCTTTTTGGATATGGAAATTTGAGGATAACCGCCAAGCCGGTTTTAGAAGTGGCAACTA
AGATTCCGGCAGATGATGCCGTTTTGCGCAAAATTTGCTTTCATTACAACCCACGAGGAACTGACATTATTAACGTTAG
AACGAAAAATAGCGCTTTAGATTACATTCTCAAGGACCAACAATGGCTGAAATCAAAAAGGCAATTTGATTGATG
ATCTATTGTTAGCTGAGAAGCAAAACGAGGCGGCAGCGTATCACCGAGAAAATTTATTTAGTTATAAAAATAGGTC
CTCGCTTTTTCTCATTACCATTAAAGGAAGTTGTTTATTTATATACTGAAAAAGAAAATCCGGGTCATATTAATTT
TGTTAGCCGTTACCAGAAAGGTTACTTTTTCCAGGAAATTTAAATGCGCTGGAAGCCCAATATCCAATGCTCTTTC
GGTGTGATAAAAGTTACTTAGTTAACCTATCTAATATTGCCAATTATGACAGTAAAACACGGAGTTAAAAATTTG

TAGATGGCAGTGAGGCCAAAAGTCTCGTTCCGGAAATCACGGGAACTAGTGGCCAAATTTAAAACAAATGATGTAGC
GCCTGCAGGCACGCCAAATGATCCCAGTAAAAAGCCACCCGCATGGCGGGTGGCTTTTTATTAGCCCTAGAAGGG
CTTCCCACACGCATTTTCAGCGCCTTAGTGCCTTAGTTTGTGAATCATAGGTGGTATAGTCCCAGAAATACCCGTCT
AAGGAATTGTCAGATAGGCCTAATGACTGGCTTTTATAATATGAGATAATGCCGACTGTACTTTTTACAGTCGGT
TTTCTAATGTCACTAACCTGCCCCGTTAGTTGAAGAAGTTTTTATATTACAGCTCCAGATCTACCGTTTAATT
TGAAAATTGATATTAGCGTTTAAACAGTTAAATTAATACGTTAATAATTTTTTTGTCTTTAAATAGGGATTGAAG
CATAATGGTGTATAGCGTACTTAGCTGGCCAGCATATATGTATTCTATAAAAATACTATTACAAGGAGATTTTAG
CCATGGTACGTCCTGTAGAAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATC
GCGAAAACCTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCA
GTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGCTCTGGTATCAGCGGAAGTCTTTA
TACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTTCGATGCGGTCACCTATTACGGCAAAGTGTGGGTCA
ATAATCAGGAAGTGTGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCAGCCGATGTTATTGCCG
GGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTA
CCGACGAAAACGGCAAGAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAA
TGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTGCGGCAAGACTGTAACCACG
CGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGTGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTG
CAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCT
ATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGG
CAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTTCGTATGAAGATGCGG
ACTTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACT
CCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTG
ATGAACTGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAAGAACTGT
ACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACA
AAAACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATT
TCGCGCCACTGGCGGAAGCAACCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCG
ACGCTCACACCGATAACCATCAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAA
GCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGA
TTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGT
ATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCGTGCGTGAACAGGTATGGA
ATTTTCGCCGATTTTTCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGATCTTCACTCGCGACC
GCAAACCGAAGTTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGGGAG
GCAAACAATGATCTAGACTCGAG

Sip3 (fwd)

gusA
gene

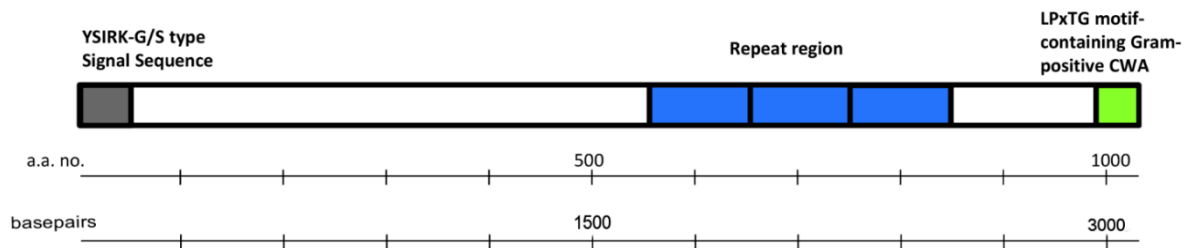
Inducible
promoter
P_{sppQ}

EgII

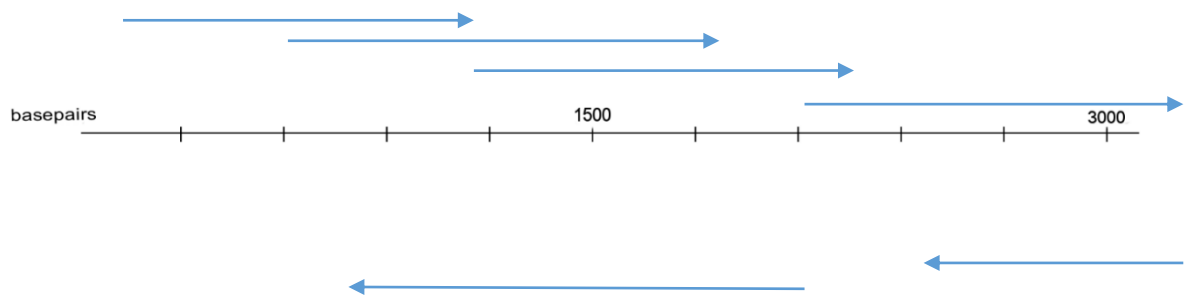
NcoI

XhoI

8.3 Vedlegg 3: Sekvensering av *cmbA3* i *L. reuteri*



Sequencing



8.4 Vedlegg 4: Verdier fra transformasjoner

Transformasjon av *L.lactis*

Transformanter	V	Tids- konstant	Transformasjons- koeffisient
Positiv kontroll: pSIP411 4µl + <i>L. lactis</i> MG1363 2 paralleller	2481 2482	4.9 ms 5.0 ms	187,5 cfu trans/µg DNA
Negativ kontroll: <i>L.lactis</i> MG1363 + 4µl dH ₂ O. 2 paralleller	2480 2479	4.9 ms 4.7 ms	0 cfu trans/µg DNA
4µl <i>cmbA3</i> + <i>L.lactis</i> MG1363 2µl <i>cmbA3</i> + <i>L.lactis</i> MG1363 1µl <i>cmbA3</i> + <i>L.lactis</i> MG1363	2480 2481 2480	4.9 ms 4.9 ms 4.9 ms	75 cfu trans/µg DNA
4µl <i>cmbA4</i> + <i>L.lactis</i> MG1363 2µl <i>cmbA4</i> + <i>L.lactis</i> MG1363 1,5µl <i>cmbA4</i> + <i>L.lactis</i> MG1363	2481 2480 2481	4.7 ms 4.9 ms 5.0 ms	0 cfu trans/µg DNA

Transformasjon av *E. coli* PK401

Transformanter	V	Tidskonstant	Transformasjons- koeffisient
Positiv kontroll: 1µl pVS2 + <i>E.coli</i> PK401 2 paralleller	1979 1978	4.9 ms 4.8 ms	2,5x10 ⁵ cfu trans/µg DNA
Negativ kontroll: <i>E.coli</i> PK401 + 4µl dH ₂ O. 2 paralleller	1979 1979	4.9 ms 4.7 ms	0 0
4µl <i>cmbA1</i> + <i>E.coli</i> PK401	1979 1979	5.0 ms 4.9 ms	5x10 ⁵ cfu trans/µg DNA
4µl <i>cmbA3</i> + <i>E.coli</i> PK401 2 paralleller	1979 1979	4.9 ms 5.0 ms	2,5x10 ⁴ cfu trans/µg DNA
4µl <i>cmbA4</i> + <i>E.coli</i> PK401 2 paralleller	1979 1979	4.9 ms 4.9 ms	2,1x10 ⁴ cfu trans/µg DNA

Transformasjon av *L. reuteri*

Transformanter	V	Tids- konstant	Transformasjons- koeffisient
----------------	---	-------------------	---------------------------------

Positiv kontroll:	2472	10.1 ms	
4µl pSIP411 + DSM17938.	2469	8.7 ms	7,5 cfu trans/µg DNA
4µl pSIP411 + <i>L.reuteri</i> 6475.	2471	9.2 ms	2500 cfu trans/µg DNA
	2469	9.3 ms	
Negativ kontroll:	2470	9.2 ms	0 cfu trans/µg DNA
DSM17938 + 4µl dH ₂ O	2469	9.2 ms	
<i>L.reuteri</i> 6475 + 4µl dH ₂ O	2471	8.9 ms	0 cfu trans/µg DNA
	2470	9.0 ms	
4µl <i>cmbA1</i> + DSM17938	2469	9.1 ms	0 cfu trans/µg DNA
2µl <i>cmbA1</i> + DSM17938	2469	9.1 ms	
4µl <i>cmbA3</i> + DSM17938	2469	9.2 ms	25* cfu trans/µg DNA
2µl <i>cmbA3</i> + DSM17938	2469	9.2 ms	
4µl <i>cmbA3</i> + <i>L.reuteri</i> 6475	2471	9.2 ms	375* cfu trans/µg DNA
2µl <i>cmbA3</i> + <i>L.reuteri</i> 6475	2469	9.0 ms	

*Transformasjonseffektiviteten beregnet fra 4µl plasmid elektroporert inn i *L. reuteri*

8.5 Vedlegg 5: Primere brukt ved PCR og sekvensering

Navn	Sekvens
Sip3 forward	5'GTCTAAGGAATTGTCAGATAGGC-3'
Sip16 reverse	5'-ATTAGTCTCGGACATTCTGC-3'
<i>cmbA</i> -seqf1 forward	5'-CTCCACAACCTCTATTTGCAA-3'
<i>cmbA</i> -seqf2 forward	5'-GTGACTTTCAATATGTAATATTAA-3'
<i>cmbA</i> -seqf3 forward	5'-GTCGATGGGAACTCTTTCC-3'
<i>cmbA</i> -seqr3 reverse	5'-CGTTCCAGGTTGACCATCA-3'
<i>cmbA</i> -f2 forward	5'-ATCTTCAAATCCTAATGTGGCGTCGAT GGGAACTCTTTCCAATTTG-3'

8.6 Vedlegg 6: OD-verdier på vekstforsøk for analyse av repetitivt område i *cmbA* under vekstfase

*Gj.snittlig OD₆₀₀ av to forsøk

Stamme DSM20016	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,10*
	2	00.45	0,135*
	3	01:30	0,268*
	4	02:15	0,256x2*
	5	03:00	0,281x4*
	6	03:45	0,205x10*
	7	04:30	0,294x10*
	8	05:15	0,374x10*
	9	06:00	0,252x20*
	10	06:45	0,292x20*

Stamme L. reuteri 6475	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,115*
	2	00.45	0,170*
	3	01:30	0,345*
	4	02:15	0,361x2*
	5	03:00	0,36x4*
	6	03:45	0,227x10*
	7	04:30	0,206x20*
	8	05:15	0,250x20*
	9	06:00	0,307x20*
	10	06:45	0,345x20*

Stamme DSM20016 m/bile	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,112
	2	00.55	0,125
	3	01:50	0,1205
	4	02:55	0,420
	5	03:50	0,375x2
	6	04:45	0,215x4
	7	05:40	0,307x4
	8	06:35	0,101x10
	9	07:20	0,116x10
	10	08:10	0,133x10

Stamme L. reuteri m/bile	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,120
	2	00.55	0,166
	3	01:50	0,320
	4	02:55	0,498
	5	03:50	0,420x2
	6	04:40	0,235x4
	7	05:30	0,343x4
	8	06:25	0,132x10
	9	07:00	0,140x10
	10	07:45	0,160x10

Stamme DSM20016 m/mucin	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
-------------------------------	--------	------------------------	-------------------

1	00.00	0,10
2	00.45	0,137
3	01:30	0,305
4	02:15	0,315x2
5	03:00	0,390x4
6	03:45	0,227x10
7	04:30	0,388x10
8	05:15	0,498x10
9	06:00	0,287x20
10	06:45	0,319x20

Stamme L. reuteri m/mucin	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,110
	2	00.45	0,165
	3	01:30	0,365
	4	02:15	0,342x2
	5	03:00	0,395x4
	6	03:45	0,241x10
	7	04:30	0,194x20
	8	05:15	0,260x20
	9	06:00	0,344x20
	10	06:45	0,357x20

Stamme DSM20016 m/MOPS	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,123
	2	00.45	0,163
	3	01:30	0,259
	4	02:15	0,353
	5	03:00	0,362x2
	6	03:45	0,157x10
	7	04:30	0,286x10
	8	05:15	0,392x10
	9	06:00	0,319x20
	10	06:45	0,366x20

Stamme l. reuteri m/MOPS	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,118
	2	00.45	0,151
	3	01:30	0,219
	4	02:15	0,338
	5	03:00	0,296x2
	6	03:45	0,155x10
	7	04:30	0,285x10
	8	05:15	0,397x10
	9	06:00	0,331x20
	10	06:45	0,355x20

Stamme L.reuteri m/mucin + MOPS	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
--	--------	------------------------	-------------------

Stamme DSM20016 m/mucin + MOPS	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,112
	2	00.45	0,153
	3	01:30	0,238
	4	02:15	0,336
	5	03:00	0,327x2
	6	03:45	0,161x10
	7	04:30	0,253x10
	8	05:15	0,348x10
	9	06:00	0,320x20
	10	06:45	0,386x20

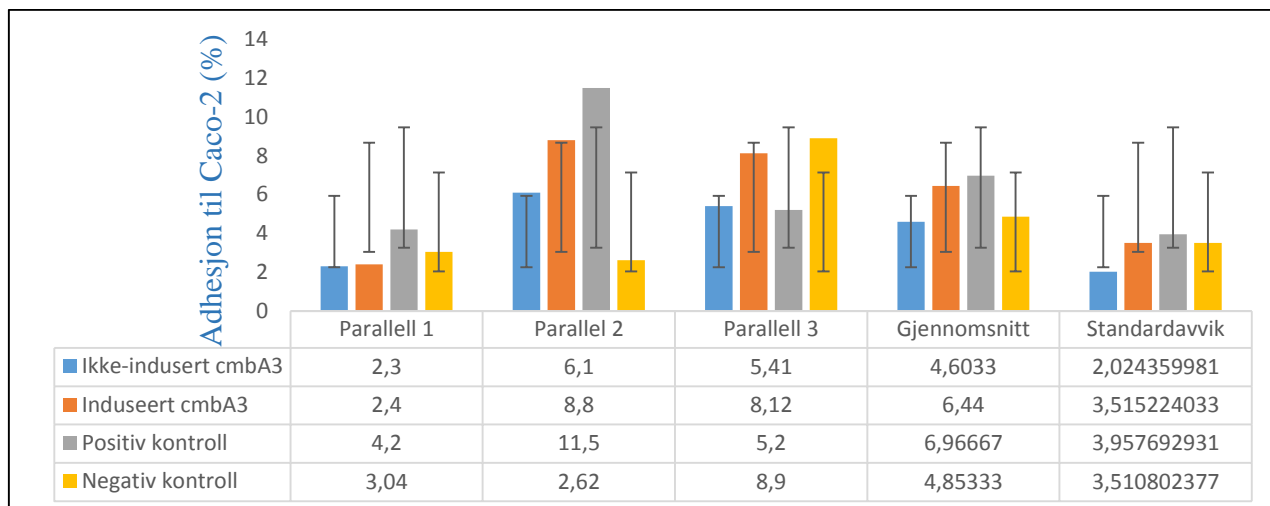
1	00.00	0,117
2	00.45	0,147
3	01:30	0,225
4	02:15	0,351
5	03:00	0,332x2
6	03:45	0,153x10
7	04:30	0,319x10
8	05:15	0,440x10
9	06:00	0,363x20
10	06:45	0,407x20

Stamme DSM20016 m/bile + MOPS	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,120
	2	00.45	0,166
	3	01:30	0,239
	4	02:40	0,437
	5	03:35	0,482x2
	6	04:45	0,217x10
	7	05:40	0,332x10
	8	06:45	0,205x20
	9	07:40	0,248x20
	10	08:45	0,254x20

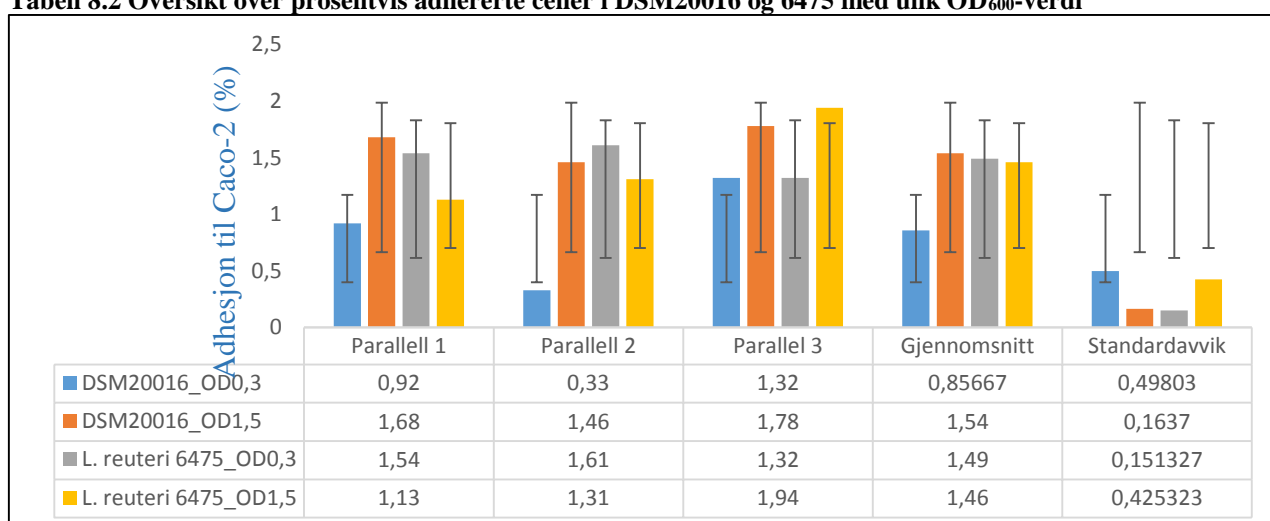
Stamme L. reuteri m/bile + MOPS	Rør nr	Tid, time: minutter	OD ₆₀₀
	1	00.00	0,119
	2	00.45	0,157
	3	01:30	0,200
	4	02:40	0,340
	5	03:35	0,325x2
	6	04:45	0,149x10
	7	05:40	0,278x10
	8	06:45	0,185x20
	9	07:40	0,178x20
	10	08:45	0,171x20

8.7 Vedlegg 7: Detaljer fra adhesjonsforsøk A og B

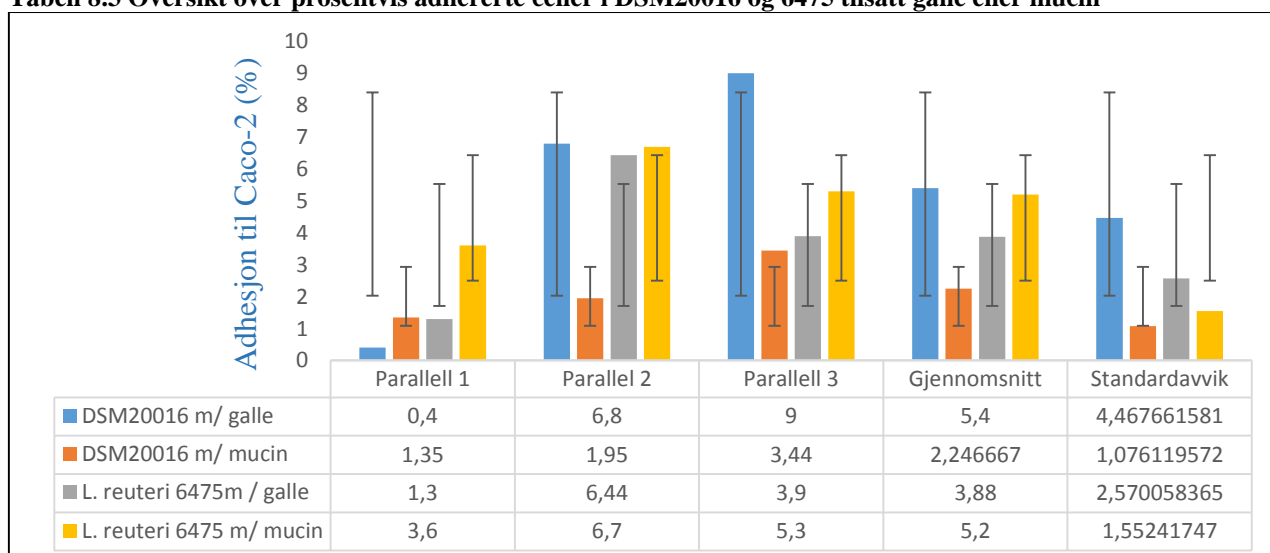
Tabell 8.1 Oversikt over prosentvis adhererte celler i pSIP-cmbA3 i *L. reuteri* 6475-

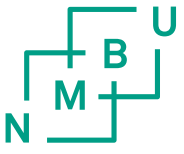


Tabell 8.2 Oversikt over prosentvis adhererte celler i DSM20016 og 6475 med ulike OD₆₀₀-verdi



Tabell 8.3 Oversikt over prosentvis adhererte celler i DSM20016 og 6475 tilsatt galle eller mucin







Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no