

Design av en transkripsjonssensor i *Escherichia coli*

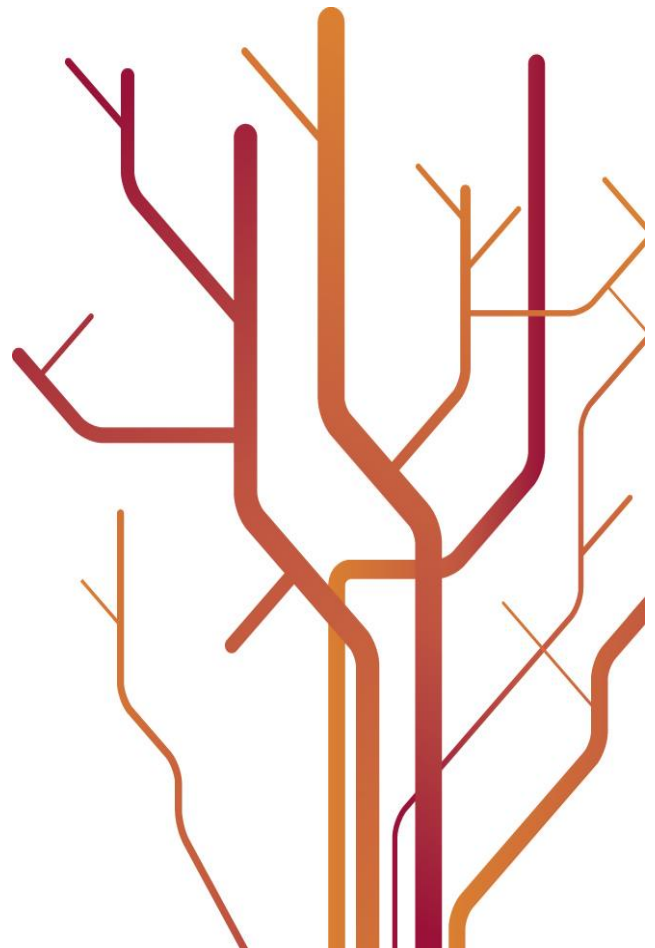
Til deteksjon av virkningsmåten til nyoppdagede antimikrobielle peptider



Magnus Støback Bjørsvik

Masteroppgave i marin bioteknologi
(60STP)

Mai 2013



Forord

Denne masteroppgaven i marin bioteknologi ble utført ved Norges fiskerihøgskole (NFH) ved fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Universitetet i Tromsø. Veiledere var Hans-Matti Blencke og Klara Stensvåg.

En stor takk rettes til Hans-Matti for en spennende masteroppgave og samtidig for uvurderlig hjelp under arbeidet på lab, og i skriveprosessen. Jeg ønsker også å takke Klara for god hjelp i arbeidet med skriving av oppgaven.

I tillegg vil jeg takke Kristoffer, Renate, Tormod og Alf for trivelig samvær både på og utenfor universitetet under hele mastergraden.

Tusen takk til Heidi, for støtten og tålmodigheten.

Magnus Støback Bjørsvik

Tromsø, mai 2013

Abstract

Antibiotic resistance is considered to be the greatest threat to the treatment of infectious diseases in the western world, due to the increase in infections caused by multiresistant bacteria. Recent outbreaks of disease caused by bacteria with total or partial resistance to available antibiotics can be very severe since the opportunities for treatment are very limited.

Marine bioprospecting is the exploration of marine sources with the aim of finding biologically active compounds that can be used in research and development of new medicines.

The aim of this thesis was to create a biosensor for detecting effectiveness of newly discovered antimicrobial peptides in *E. coli*. Such a sensor could contribute to make the testing of newly discovered antimicrobial peptides easier and more efficient. Biotechnological methods were used to incorporate suitable reporter genes encoding for fluorescent proteins, in a system where color can be read in a fluorescence plate reader depending on influence of the antibiotics.

Initial tests indicate partial functionality, although for full functionality the choice of promoters and fluorescent protein needs adjustment

Further work will involve fine tuning of the system to avoid background noise in fluorescence from the bacteria and culture media. Some work also remains with the incorporation of the system into a wild-type *E. coli* strain, which can be used to directly measure effects on cellular processes in wild type strains of *E. coli*.

Sammendrag

Antibiotikaresistens er vurdert som den største trusselen knyttet til behandling av de smittsomme sykdommene i den vestlige verden, på grunn av økningen i infeksjoner som følge av multiresistente bakterier. Nylige sykdomsutbrudd forårsaket av bakterier med total eller delvis resistens mot tilgjengelige antibiotika, kan være meget alvorlige siden mulighetene for behandling er svært begrenset.

Marin bioprospektering er utforskning av marine kilder med hensikt å finne biologisk aktive forbindelser som kan benyttes i forskning og utvikling av nye medisiner.

Målet med denne oppgaven var å lage en biosensor for detektering av virkningsmåten til nyoppdagede antimikrobielle peptider i *E. coli*. En slik sensor vil kunne gjøre arbeidet med testing av nyoppdagede antimikrobielle peptider lettere og mer effektiv. Det ble benyttet bioteknologiske arbeidsmetoder for å inkorporere egnede reportergener kodende for fluorescerende proteiner, i et system hvor fargene kunne avleses i en fluorescensplateleser.

Innledende tester tyder på delvis funksjonalitet, men systemet krever tilpasninger i både promotorvalg og valg av fluorescerende proteiner.

Videre arbeid involverer finjustering av systemene for å unngå bakgrunnssignaler fra bakterier og dyrkningsmedie. Det gjenstår også arbeid med inkorporering i en *E. coli* villstamme, for å kunne måle direkte påvirkning av cellulære prosesser i villstammer av *E. coli*.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Abstract	ii
Sammendrag	iii
1.0 Innledning.....	1
1.1 Betydning av smittsomme sykdommer de siste hundre år	1
1.1.1 Bakterielle sykdommer.....	2
1.1.2 Antibiotika.....	3
1.1.3 Antibiotikaresistens	4
1.1.4 Måter å bekjempe resistente patogener og redusere resistensutvikling	4
1.2 Antimikrobielle peptider	6
1.2.1 Funksjoner	6
1.2.2 Virkningsmekanismer	7
1.2.3 Screening og identifisering av virkningsmekanisme	8
1.3 Marin bioprospektering, nye kilder for AMPs	9
1.4 Biosensorer.....	10
1.4.1 Biosensorer i antibiotikaforskning	11
1.4.2 Bakteriesensorer i bruk ved NFH i dag.....	11
1.4.3 Egnede reporter gener	12
1.4.4 Nye generasjoner av biosensorer.....	13
1.6 Metodikk	14
1.6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)	14
1.6.2 Gel-elektroforese	14
1.6.3 Vektorer.....	15
1.6.3 Ligering inn i vektor.....	16
1.6.4 Transformering.....	16
1.6.5 Sekvensering av DNA	17

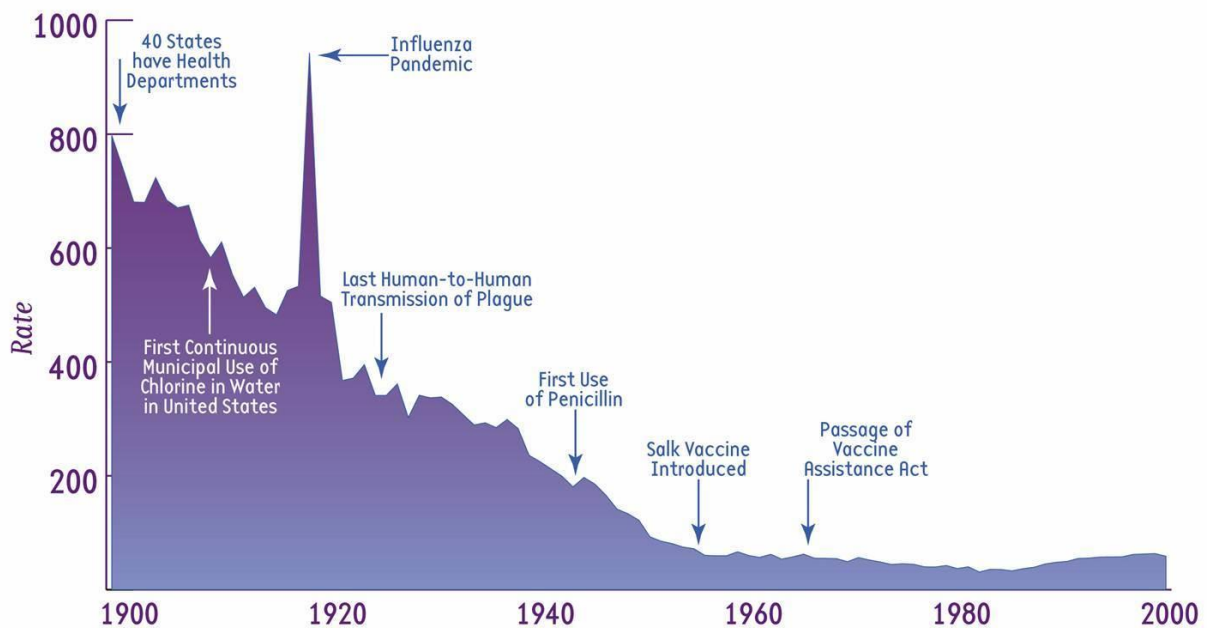
1.6.6 Indusering av genuttrykk på molekylnivå.....	17
1.7 Mål med oppgaven	18
1.7.1 Hensikt	18
1.7.2 Hypotese.....	18
2. Material og metode.....	19
2.1 Dyrking av bakterier.....	19
2.1.2 Tillaging av LB (Luria Bertani) agar og flytende medium	19
2.1.3 Seleksjonskonsentrasjoner	19
2.2 Transformasjon av kompetente celler	20
2.3 Rensing av plasmid	21
2.4 Testing av fluorescens	21
2.5 Designing av primere	22
2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)	24
2.7 Gel-elektroforese	24
2.8 Rensing av PCR-produkt.....	25
2.9 Sekvensering	25
2.10 Ligering inn i vektor.....	25
2.11 Konstruksjon av aptamerinsert.....	26
2.12 Åpning av plasmid med restriksjonsenzym	26
2.13 Rensing av bånd isolert fra agarosegel.....	26
3. Resultat.....	27
3.1 Sammenligning av Fluorescens mCherry og dsRed i forskjellige stammer av <i>E. coli</i> ..	27
3.2 Kloning av mCherry i pTrcHis2TOPO	28
3.2.2 PCR amplifisering av mCherry	28
3.2.3 Kloning av PCR-produkt i pTrcHis2TOPO	29
3.2.5 Sekvens av pMB1.....	30
3.2.6 Fluorescensmåling av pMB1.....	31

3.3 Resultat av funksjonstest Split-GFP	32
3.3.1 Transformasjon av DH5 α og rensing av plasmider.....	32
3.3.2 Fluorescensmåling av pMB53/84/99/114	33
3.3.3 Sekvens av pMB53/84/99/114	34
3.3.4 Sekvens av ny pMB53.....	35
3.3.5 Ny Fluorescensmåling av pMB53/84/99/114	36
3.4 Kloning av transkripsjonssensor	37
3.4.1 Konstruksjon av insert og åpning av pASK-IBA3plus	37
3.4.2 Ligering av aptameret i pASK-IBA3plus.....	39
3.4.3 Restriksjonssetet	40
3.4.4 Fluorescens i pMB53 og pMB2	41
3.4.5 Effekt av rifampicin og kanamycin på fluorescens i <i>E. coli</i> BL21 med pMB53 og pMB2.....	42
4. Diskusjon.....	44
4.1 Rødt fluorescerende proteiner til bruk i biosensorer basert på <i>E. coli</i>	44
4.2 Split-GFP i biosensorer	47
4.3 Utkobling av aptamertranskripsjon	49
4.3.6 Virkning av Rifampicin på fluorescens i <i>E. coli</i>	51
Oppsummering og videre arbeid	51
7. Referanser.....	52
Appendix	61
Appendix 1: Fullstendig sekvens av pMB53	61

1.0 Innledning

1.1 Betydning av smittsomme sykdommer de siste hundre år

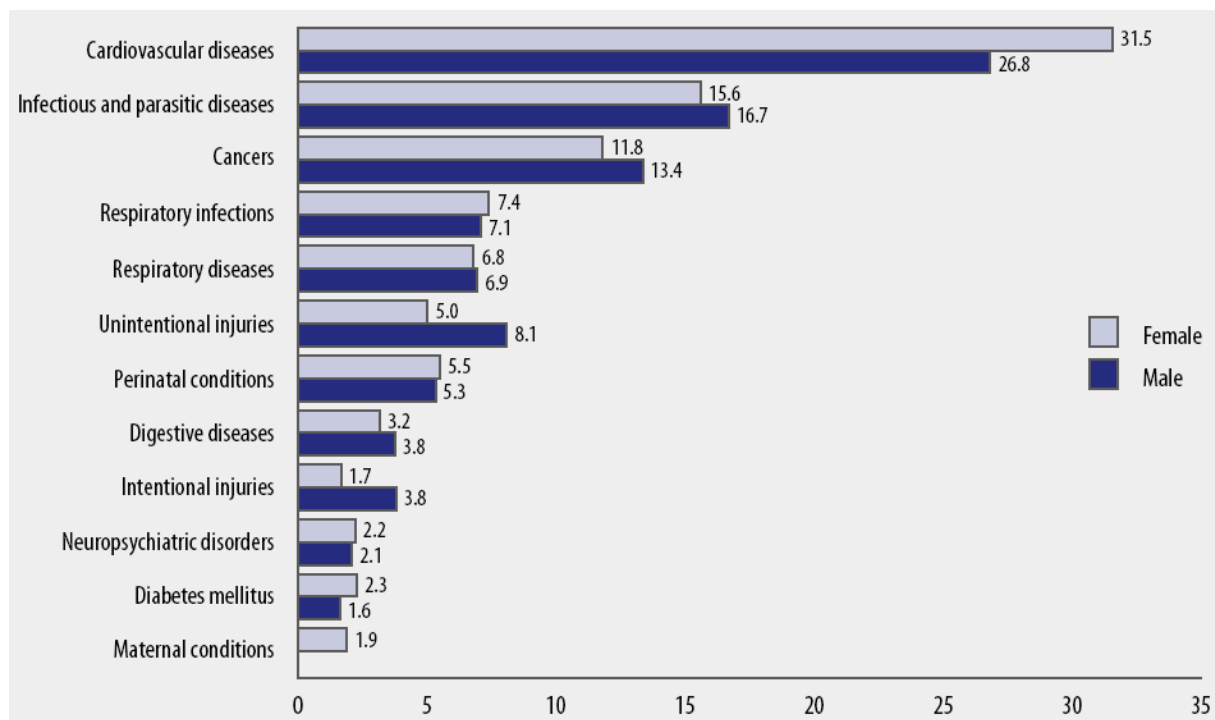
I begynnelsen av det tjuende århundre var den største årsaken til dødsfall blant innbyggere i USA sykdommer forårsaket av mikroorganismer (Madigan, Martinko et al. 2009). Barn og eldre var særlig utsatt for patogener. I dag er smittsomme sykdommer mindre dødelig i vestlige land. Kontrollen av disse sykdommene er blitt bedre som følge av bedre forståelse av sykdomsprosessen, forbedret hygiene og bruk av antibiotika (Madigan, Martinko et al. 2009). Mer enn 25 % (ca.15 millioner) av årlige dødsfall er forårsaket av smittsomme sykdommer som lungebetennelse, HIV/AIDS, diaré, tuberkulose, malaria og flere andre (WHO 2004). I utviklede land som USA, er smittsomme sykdommer bare den tredje største årsaken til dødelighet i befolkningen, mens de samme sykdommene tar livet av veldig mange spedbarn



Figur 1: Dødstall (per 100000) for infeksjonssykdommer, og utviklingen av disse fra 1900 og fram til 2000. (Teutsch 2009)

og barn i utviklingsland (Morens, Folkers et al. 2010). Infeksjonssykdommer kan være forårsaket av forskjellige ting. Tropiske sykdommer forårsaket av parasittiske ormer og protister er av stor offentlig bekymring, og påvirker millioner av mennesker over hele verden (Batista and Marques 2011). Hyppig bruk av kateter, mekaniske vifter og bredspektret antibakterielle legemidler kan føre til soppinfeksjon (Colombo, Soares et al. 2012),

Virusinfeksjoner er også vanlige. Noen av disse holdes under kontroll ved hjelp av vaksiner (Nathanson, McGann et al. 1993). Bakterieinfeksjoner er nokså vanlig, og når disse forårsaker sykdom behandles det med antibiotika (Freire-Moran, Aronsson et al. 2011).



Figur 2: Prosent fordeling av ledende dødsårsaker, menn og kvinner, verden, 2004 (WHO 2004).

På tross av at antall dødsfall forårsaket av smittsomme sykdommer har gått kraftig ned de siste hundre årene, er det fremdeles den andre største dødsårsaken i verden (WHO 2004). Fra 1980-tallet har det vært en økning i de årlige dødsfallene forårsaket av disse sykdommene (Teutsch 2009).

1.1.1 Bakterielle sykdommer

For tretti år siden trodde man at lungebetennelse og andre bakterielle sykdommer snart ville være bekjempet for godt på grunn av utviklingen av effektive antibiotika. Derimot viste det seg at flere av sykdommene som tidligere var under kontroll, igjen ble et problem på grunn av den økningen i antibiotikaresistens i smittsomme bakterielle sykdommer (WHO 2004). I senere år har flere vitenskapelige rapporter reist bekymring for at utviklingen av antibakterielle medisiner ikke vil være tilfredsstillende på grunn av problemene som forårsakes av antibiotikaresistens blant viktige bakterielle patogener (Cars, Hogberg et al. 2008; Boucher, Talbot et al. 2009). Det Europeiske senter for sykdomsforebygging og kontroll har vurdert antibiotikaresistens som den største trusselen knyttet til de smittsomme

sykdommene på grunn av økningen i infeksjoner som følge av multiresistente bakterier i Europa (Liverani and Coker 2012). Nylige sykdomsutbrudd forårsaket av bakterier med totalt eller delvis resistens mot tilgjengelige antibiotika, kan være meget alvorlige siden mulighetene for behandling er svært begrenset (Lepape, Monnet et al. 2009; Nordmann, Cuzon et al. 2009). Det er estimert at 25000 pasienter dør hvert år i EU som følge av infeksjoner av multiresistente bakterier (ECDC/EMEA 2009). Lungebetennelse er blant de smittsomme sykdommene som forårsaker flest dødsfall, og dermed krever store ressurser av helsevesenet (Capelastegui, España et al. 2010). Lungebetennelse dreper flere barn under fem år enn noen annen sykdom i alle deler av verden, og forårsaker årlig over 2 millioner dødsfall blant barn under 5 år (Singh and Aneja 2011). I USA forårsaker lungebetennelse flest dødsfall av alle de smittsomme sykdommene. Vanlige årsaker er bakterier, virus og sopp, men hovedsakelig er årsaken bakterier som *Streptococcus pneumoniae* som vanligvis kan være motstandsdyktige mot flere typer antibiotika, og kan dermed gjøre behandling vanskelig (Niederman 2006).

1.1.2 Antibiotika

I 1928 registrerte Alexander Fleming et uvanlig fenomen med vekst av bakterier og sopp i petriskåler som ikke hadde blitt berørt av Lysol (desinfeksjonsmiddel): separate kolonier av stafylokokker og en koloni av mugg i nærheten av petriskålens kant, viste seg å produsere noe som hemmet vekst av omliggende bakterier. Dette viste seg å være en forbindelse som senere ble kalt penicillin. Howard Walter Florey og Ernst Boris Chain realiserte penicillins potensial for medisinsk bruk. Dette var det første antibiotikumet som ble tatt i bruk (Chain, Florey et al. 1940). Oppdagelsen og utviklingen av penicillin representerer en av de viktigste utviklingene i medisinsk historie (Ligon 2004). Antibiotika (AB) er forbindelser som er giftig for mikroorganismer, og dreper eller bremser veksten av disse. AB er lite eller ikke giftig for mennesker. AB blir vanligvis produsert eller syntetisert fra mikroorganismer, slik som sopp. De hemmer patogener ved å forstyrre essensielle intracellulære prosesser, slik som syntese av proteiner og fett. AB dreper ikke virus, og er ikke effektive i behandling av virusinfeksjoner. Flere typer av antimikrobielle forbindelser er oppdaget etter at de første kommersielle produktene kom på markedet i 1940-årene. Flere av disse er fortsatt i bruk. Hovedgruppene av antibiotika inkluderer beta-lactamer (f. eks penicillin), cephalosporiner (toframycin og streptomycin), macrolider (erythromycin), polymyxiner (colisitin), fluoroquinolones (ciprofloxacin) og glycopeptider (vancomycin).

Siden oppdagelsen av Penicillin og effektive behandlingsmetoder for lungebetennelse og flere andre alvorlige infeksjonssykdommer, har den medisinske verden blitt utfordret til å utvikle nye antimikrobielle medisiner før mikroben kunne utvikle resistens mot eksisterende medikamenter (Guillemot 1999). WHO (2004) har estimert at 60 % av sykehusinfeksjoner i den industrielle verden er forårsaket av mikrober som er resistente mot tradisjonelle antibiotika. I USA får 2 millioner årlig infeksjoner under sykehusopphold, og 90000 av disse dør.

1.1.3 Antibiotikaresistens

Alvorlige infeksjoner forårsaket av bakterier som er resistente mot vanlige typer antibiotika har blitt et globalt helseproblem i det 21. århundre. De er mer alvorlige og krever lengre og mer komplekse behandlinger, men de er også vesentlig dyrere å diagnostisere og behandle (Alanis 2005). Antimikrobiell resistens er en alvorlig trussel mot folkehelsen. Årsaken til økende grad av resistens mot flere typer AB er i all hovedsak et stort overforbruk de siste årene, i behandling av mennesker og husdyr (Heinemann, Ankenbauer et al. 2000). Det sees på som en selvfølgelighet at alle skal ha medisiner ved det minste tegn til små infeksjoner. Resistensen kommer som en direkte følge av bruk, ved at organismene tilpasser seg denne eksponeringen (Wise and Soulsby 2002). Bakterier har utviklet sofistikerte metoder for utveksling av DNA, noe som gjør at en eventuell resistens raskt sprer seg mellom forskjellige arter. Ved konjugering overføres plasmider mellom bakterier. Ved transformasjon tar bakterier opp fritt DNA, og ved transduksjon overføres gener med bakteriofager (Madigan, Martinko et al. 2009). AB er hovedsakelig brukt til to ting; behandling av mennesker med infeksjoner, og til vekstfremming og profylakse hos husdyr. Mellom 40 og 80 % av AB som brukes i USA hvert år blir brukt i husdyr, mesteparten tilsettes mat for å fremme vekst og øke fôr-utnyttelse eller for å hindre sykdom. Denne profylaktiske bruken bidrar til utviklingen av resistens og skaper helsemessig risiko for mennesker (Shea, Health et al. 2004).

1.1.4 Måter å bekjempe resistente patogener og redusere resistensutvikling

I dagens samfunn skal alt skje fort. Folk har travle hverdager med jobb, familie og fritidsaktiviteter. I en slik travel hverdag er det de færreste som 'har tid' til å være syk. Det forventes derfor at man skal kunne få medisiner, og bli fort frisk igjen i stedet for å holde seg i ro. Dette fører til at enormt press på leger til å skrive ut resepter på blant annet AB (Cockburn

and Pit 1997; Macfarlane, Holmes et al. 1997). Kunnskapen om hvordan AB fungerer er nok også generelt lav, og folk tror at det kan hjelpe dem å bli kvitt forkjølelsen eller influensa. For å få bukt med den raske utviklingen av AB resistens er det viktig at man får et høyere kunnskapsnivå i befolkningen om hvordan AB fungerer, og hvorfor det er lite gunstig for samfunnet at vi bruker det for mye og for ofte. For å redusere konsekvensene av AB resistens, må man klare å hindre spredningen på sykehus og i samfunnet. Dette kan i stor grad oppnås ved at folk flest kutter ned på sitt forbruk, men utviklingen av nye AB med aktivitet mot multidrug resistente bakterier er også av stor viktighet for folkehelsen. Dette gjør at det hele tiden må utvikles nye typer antibiotika. Dette kan gjøres enten ved screening etter uoppdagede molekyler, slik som ved Norges Fiskerihøgskole og MabCent hvor det arbeides med naturlige forekommende antimikrobielle peptider (Haug, Kjuul et al. 2002; Tadesse, Gulliksen et al. 2008; Sperstad, Haug et al. 2009). I tillegg kan modifikasjoner av allerede kjente AB gjøre at bakteriene ikke lenger kjenner igjen og tåler disse. I løpet av det siste tiåret har det kommet rundt 25 nye antimikrobielle medisiner på markedet (Newman and Cragg 2012), mindre enn ti av disse har betydelig innvirkning på ny resistens (Monaghan and Barrett 2006).



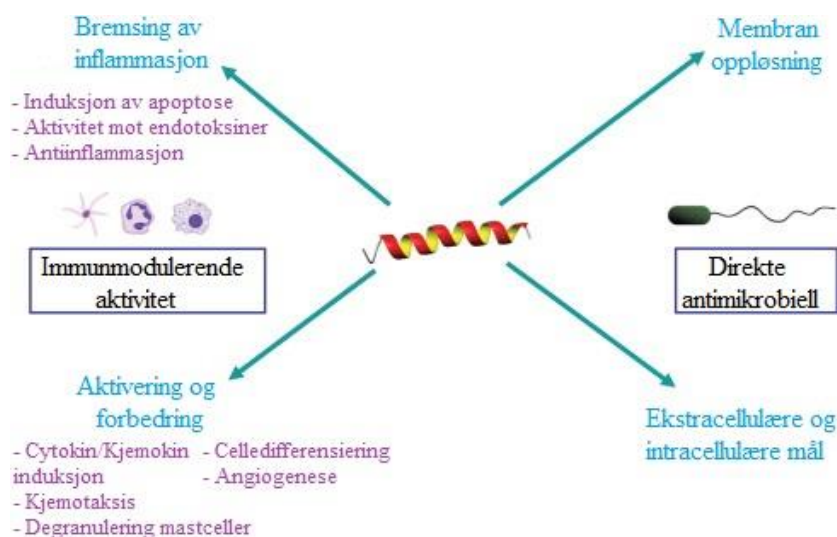
Figur 3: Bilde fra en T-banestasjon i Vancouver i 2012. Her hadde de en stor kampanje, for å øke bevisstheten rundt bruk av antibiotika. Foto: Magnus S. Bjørsvik

1.2 Antimikrobielle peptider

Antimikrobielle peptider (AMP) finnes over alt i naturen, og er identifisert i alle arter som er undersøkt for disse. Praktisk talt alle levende organismer har altså disse peptidene som kjennetegnes ved liten størrelse og høye prosent av kationiske og hydrofobe deler. Peptidene kategoriseres i noen forskjellige strukturelle klasser: α -heliks, β -sheet, utvidet, eller sløyfe strukturer. De utgjør en viktig komponent i det medfødte immunforsvaret til både prokaryote og eukaryote organismer (Kindrachuk, Nijnik et al. 2010). I dyr er de spesielt funnet på slimhinner, og i kroppsvæsker. De dreper eller hemmer veksten av enkelte virusarter, bakterier, sopp og parasitter (Hancock and Diamond 2000). Det er gjort forsøk som viser at disse kan ha stor aktivitet mot mikroorganismer, som har resistens mot vanlige antibiotika (Hancock and Lehrer 1998; Mishra, Leishangthem et al. 2013).

1.2.1 Funksjoner

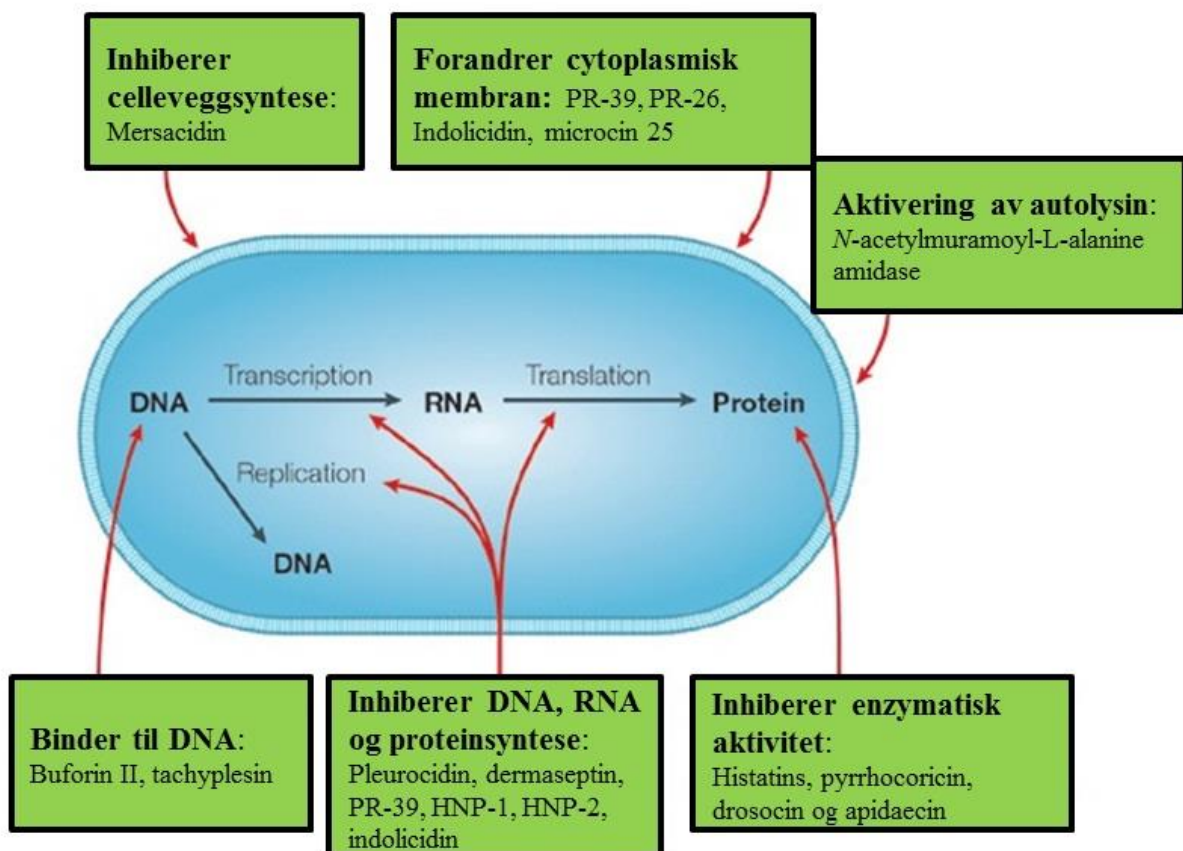
Antimikrobielle peptider kalles også for vertens forsvarspeptider (engelsk: host defence peptides), og kan ha funksjoner utover de antimikrobielle egenskapene. De kan være involvert i blant annet immunstimulering og reguleringen av immunforsvaret. Det har vært vist at de er fysiologisk relevant, siden de kan fungere som kjemokiner, indusere kjemokinproduksjon, fremme sårheling og angiogenese, bremse inflammasjon, og modulere den adaptive immunrespons (Kindrachuk, Nijnik et al. 2010).



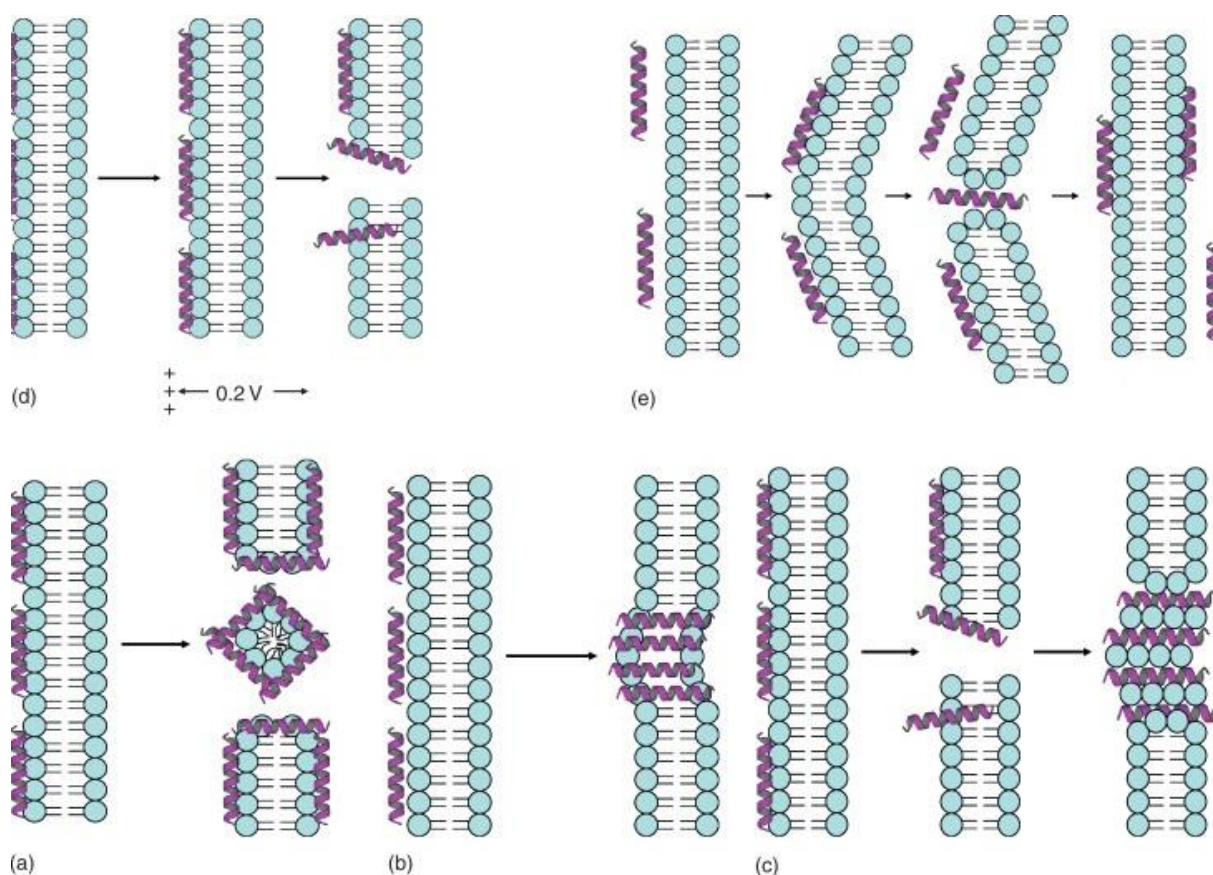
Figur 4: Direkte antimikrobiell og immunmodulerende aktiviteter til AMP. De direkte antimikrobielle egenskapene kan være knyttet til cellemembranen, eller direkte til prosesser som transkripsjon, replikasjon og translasjon inne i cellen. De immunmodulerende egenskapene kan være både direkte og indirekte. Modifisert etter Kindrachuk, Nijnik et al. 2010.

1.2.2 Virkningsmekanismer

Forskjellige typer AB og AMP peptider fungerer på forskjellige måter. AB på markedet i dag fungerer hovedsakelig på fem forskjellige måter; inhibering av celleveggsyntese, inhibering av proteinsyntese, forstyrning av cellemembran, inhibering av nukleinsyresyntese eller ved aktivitet mot forskjellige metabolitter (Kohanski, Dwyer et al. 2010). Peptidene er ulik i sin aminosyresammensetning og struktur, og viser generelt god og bredspektret antimikrobiell aktivitet. Antimikrobielle peptider fungerer hovedsakelig ved å forstyrre den bakterielle membranen, mens noen reagerer med DNA eller inhiberer proteiner i bakterien (Hancock and Lehrer 1998). De hydrofobiske og positivt ladede overflatene til antimikrobielle peptider kan medføre binding til negativt ladede molekyler slik som DNA og proteiner (Hancock and Diamond 2000). For å finne ut hvordan nyoppdagede AB og AMP fungerer trenger man metoder for identifisering og screening av virkningsmåte. Det er brukt mikroskopering, studier med modellmembraner i NMR spektroskopi og flere andre metoder for identifisering av virkningsvei. Dette er alle metoder som er tidkrevende og kostnadskrevende. Ved bruk av såkalte biosensorer vil man derimot være i stand til å teste for flere aktiviteter på en rask og effektiv måte.



Figur 5: Eksempler på peptider som påvirker prosesser inne i bakteriecellen. Modifisert etter Brogden (2005).



Figur 6: Forskjellige virkningsmåter for AMP, ved forstyrring av den bakterielle membranen. a) teppe-modellen, b) tønne-stav modellen, c) torroidal pore modellen, d) molekylær electroporasjon modell, e) synkende flåte modell. (Kindrachuk, Nijnik et al. 2010)

1.2.3 Screening og identifisering av virkningsmekanisme

Identifisering av virkningsmekanisme spiller en viktig rolle i oppdagelsen av AMP, antibiotika og andre biologisk aktive forbindelser. Primær screening etter aktive forbindelser har blitt mer effektiv, og har dermed økt etterspørselen etter systemer som på en enkel måte kan fastslå den nøyaktige virkningsmåten for disse biologisk aktive forbindelsene på proteinnivå. Identifisering av virkningsmekanismer kan gjøres gjennom dyrkning, biokjemiske metoder eller mikroskopering og andre mekaniske framgangsmåter. Kombinasjoner av flere forskjellige metoder kan være nødvendig for å karakterisere mekanismene fullstendig. Flere teknologier er tilgjengelig for påvisning av bestemte antibiotika; kromatografiske metoder som ofte brukes i kombinasjon med massespektrometri, antibiogramtester som avslører antimikrobielle aktiviteter på spesifikke indikatorstammer og immunodetektering basert på antistoffer spesifikke for bestemte antibiotikastrukturer. Flere av disse metodene gir begrenset informasjon, eller er veldig spesifikk for noen typer antibiotika.

Biosensor-analyser kan potensielt detektere flere antibiotika av en klasse (Weber, Link et al. 2005).

1.3 Marin bioprospektering, nye kilder for AMPs

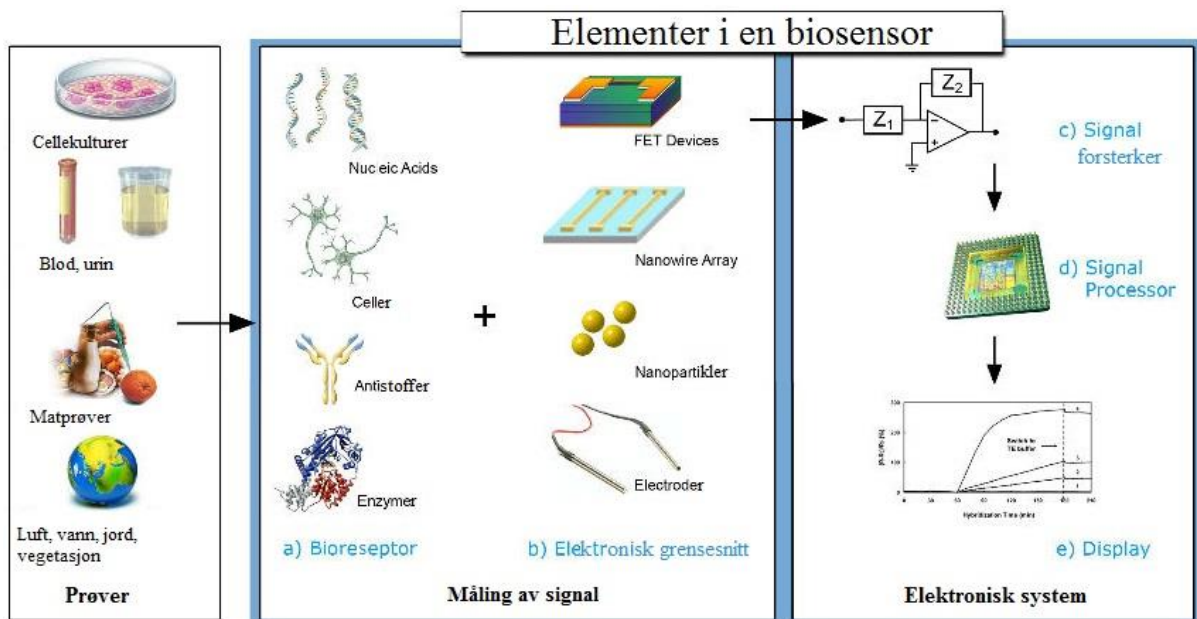
Marin bioprospektering er utforskning av marine kilder med hensikt å finne biologisk aktive forbindelser som kan benyttes i forskning, utvikling og potensielt kommersialisering av nye medisiner, kosttilskudd, mat og fôringredienser, produkter innenfor petroleumsvirksomhet og fornybar energiproduksjon. Marin bioprospektering er et fagområde med stort potensial for verdiskaping og et nasjonalt satsningsområde for å øke innovasjonen og forskning blant annet i nordområdene. Dette kan være med på å gjøre Tromsø verdensledende på området (handelsdepartementet 2008). Mange av organismene i havet i nordområdene må takle høy mikrobetetthet, høyt trykk, høy saltkonsentrasjon og store variasjoner i temperatur-, saltkonsentrasjon, ione-konsentrasjon og variasjoner i lys og mørke. I tillegg skal de kjempe for mat, forsvare sitt territorium, beskytte seg fra begroing og for plass for seg selv, etc. Alle disse stressfaktorene gjør at flere organismer har utviklet forbindelser som skal hjelpe dem å overleve, og det er naturlig å tro at disse forbindelsene kan ha funksjoner som kan benyttes i moderne medisin (Trincon 2010).



Figur 7: De kalde havene i nordområdene har en stor biodiversitet, og store muligheter for oppdagelser av nye arter for bioprospektering. Fra venstre *Parastichopus tremulus*, *Hormathia nodosa* og amfipoden *Epimeria loricata* samlet inn ved MabCent/UiT. Bilde: Johan Svenson & Robert Johansen, UiT/Marbank. (Svenson 2012)

1.4 Biosensorer

En biosensor er en enhet som registrerer informasjon om en fysiologisk eller biokjemisk forandring. Teknisk sett består den av en biologisk komponent og en elektronisk komponent, som konverterer det biokjemiske signalet til en kvantifiserbar elektronisk respons. Biosensorer kan ha elektrokjemiske, optiske eller akustiske komponenter som registrer informasjon fra den biologiske komponenten (Ivnitski, Abdel-Hamid et al. 1999). Funksjonen til biosensoren avhenger av den biokjemiske spesifisitet til det biologisk aktive materialet. Valget av biologisk materiale avhenger av faktorer som spesifisitet, lagring, og stabilitet. Hva som skal detekteres er også avgjørende. Eksempler kan være kjemiske forbindelser, antigener, mikrober, hormoner, nukleinsyrer eller subjektive parametere som lukt og smak. Enzymer, antistoffer, DNA, reseptorer, organeller og mikroorganismer, samt dyre- og planteceller og vev har vært brukt som biologiske komponenter (D'Souza 2001). Biosensorer kan altså være allsidige analyseverktøy og brukes i medisin, matkvalitet, matsikkerhet, og kontroll av forurensning.



Figur 8: Oversikt over forskjellige mulige elementer i en biosensor, og hvilke signaler som kan måles og hvordan disse detekteres i et elektronisk system. Modifisert fra wikimedia commons (commons).

1.4.1 Biosensorer i antibiotikaforskning

En mikrobiell biosensor består av bakterieceller og et apparat som måler lys eller andre signaler fra cellene. Cellene inneholder reportergener som induseres ved hjelp av spesielle promotere. Slike biosensorer brukes i farmasøytisk industri, til å screene for nye medisiner, og i påvisning av bioaktive forbindelser i miljøprøver (Urban, Eckermann et al. 2007). Reportergenene kan plasseres på plasmider eller på kromosomet, og koder for proteiner som produserer lys eller andre detekterbare signaler.

1.4.2 Bakteriesensorer i bruk ved NFH i dag

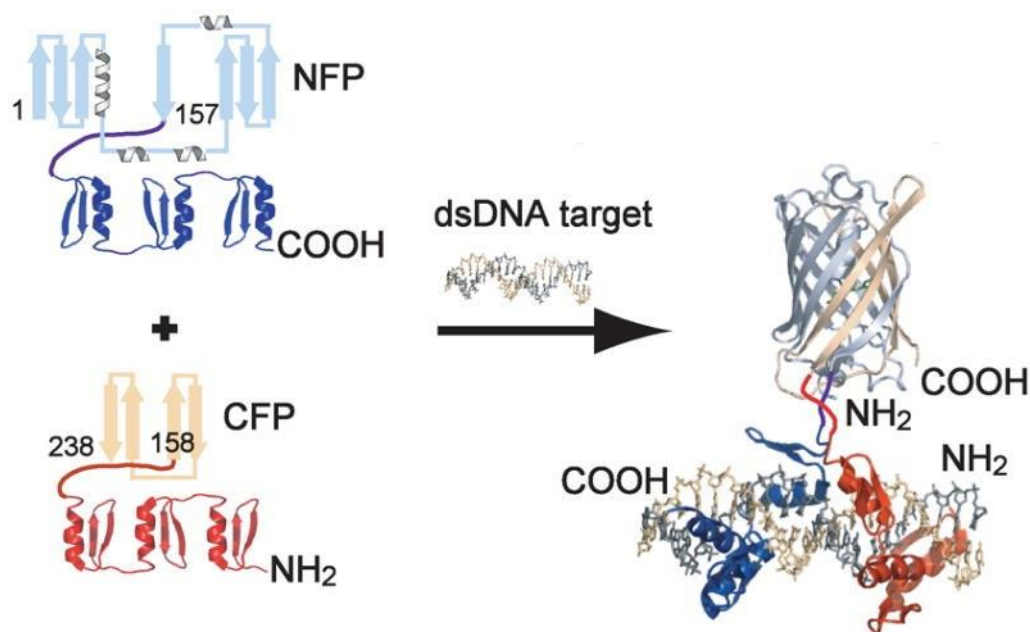
Minimum Inhibitor konsentrasjons assay (MIC-assay) er en metode som benyttes i dag for å bestemme hvor lav konsentrasjon som trengs av et antibiotikum (eller en annen forbindelse), for å hindre vekst eller drepe en spesiell bakterie (minimum bactericidal concentration). Testen gjøres ved å lage forskjellige fortyninger av forbindelsene og deretter inkubere dette sammen med en kjent mengde av bakterien man ønsker å teste mot. Etter inokulering måles veksten kontinuerlig ved hjelp av absorbans, og informasjonen kan detekteres digitalt (Paulsen, Blencke et al. 2013). Dette tar så lang tid det tar for bakterien å vokse, slik at en kan sammenligne med positive og negative kontroller. Oftest tar dette minimum to dager. Membran assay brukes for å teste påvirkning av membranpermeabilitet. *E. coli* celler som uttrykker en rekombinant luciferase blandes med molekylet som skal testes og fluorescensen overvåkes med en plateleser (Li, Blencke et al. 2010). Viability assay, er en assay for å bestemme evnen til å opprettholde eller gjenvinne levedyktigheten hos bakteriecellene. Den krever små volumer, men kan gi feil ved at kvantitative mål ikke sier om levedyktigheten kan gjenvinnes (Paulsen, Blencke et al. 2013). Ekspresjonssensor brukes for å påvise om prosessen med uttrykking av gener påvirkes. Dersom en slik sensor gir et positivt utslag er det flere prosesser som potensielt kan være påvirket, og man må bruke andre metoder for å smalne inn resultatet. Dersom ekspresjonen er påvirket kan det være transkripsjon, RNA-prosessering, RNA eksport, translasjon, proteinfolding, translokering, proteintransport og flere andre ting som kan være påvirket. Det er derfor ønskelig med biosensorer som kan gi et korrekt svar umiddelbart, i stedet for å bruke tidkrevende metoder for påvisning av hver enkelte prosess.

1.4.3 Egnede reportergener

Det er ønskelig å bruke reportergener som koder for lett detekterbare proteiner eller RNA. Dette kan være på grunn av fluorescens eller andre signaler som lett kan leses visuelt eller ved hjelp av forskjellige detektorer. Det er også viktig at disse signalene har stor forskjell fra eventuelle bakgrunnssignaler som vil kunne forstyrre. Slike egnede reportergener kan for eksempel være fluorescerende proteiner som mCherry og GFP (Green Fluorescent Protein) som fluorescerer sterkt i henholdsvis rødt og grønt. Det finnes også forskjellige typer luciferaser som kan brukes. Disse vil skille seg godt fra et bakgrunnssignal fra for eksempel flytende LB-medium. Det finnes også elektronisk måleutstyr som lett kan detektere denne fluorescensen og samtidig gjøre dette over tid. Fluorescerende proteiner er en klasse av strukturelt homologe proteiner som deler egenskapen til selv å kunne danne en synlig bølgelengde av lys fra en sekvens av 3 aminosyrer innen eget polypeptidsekvens. Det er vanlig å introdusere et gen som koder for et konstruert fluorescerende protein i levende celler og senere visualisere genproduktet med fluorescens mikroskopi. Bakterier med reportergener som uttrykker fluorescerende proteiner, kombinert med promotorer som reagerer på antibiotika kan brukes til å undersøke virkningsmåten til nyoppdagede potensielle antibakterielle legemidler (Urban, Eckermann et al. 2007). Ved å ha fluorescerende proteiner med forskjellige farger, koblet til forskjellige prosesser i cellen, som proteinsyntese og fettsyresyntese, vil man kunne se hvilken spesifikk prosess som inhiberes av det gitte molekylet.

1.4.4 Nye generasjoner av biosensorer

Utvikling av metoder for å opplyse komponenter bakteriecellene krever bruk avanserte bioteknologiske verktøy. En ny tilnærming er å tilpasse reporterproteiner for å lage intracellulære sensorer. Signalet som sendes ut fra disse sensorene er regulert av deres interaksjon med cellulære komponenter (Binkowski, Fan et al. 2009). En god framgangsmåte er bruk av protein-fragment komplementering, hvor ikke-funksjonelle fragmenter av split-proteiner induseres for komplementering via spesifikke interaksjoner (Binkowski, Fan et al. 2009; Torkzadeh-Mahani, Ataei et al. 2012), illustrert i figur 9. Et eksempel kan være transkripsjonen av DNA til RNA, hvor påvirkning kan detekteres ved bruk av aptamerbindende proteiner (proteiner som binder til RNA) som er koblet til et split system (Jiang, Fang et al. 2004). eIF4A er et eksempel på en slik aptamerbindende protein som er isolert fra mus.



Figur 9: Split-protein. De to konstruktene er i utgangspunktet ikke fluorescerende, ved binding til DNA vil de to konstruktene sammen danne et komplett og fluorescerende protein. Modifisert fra Furman, Badran et al. (2009) (Furman, Badran et al. 2009).

1.6 Metodikk

1.6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode som benyttes for å amplifisere ønsket DNA fragment fra et større og kompleks DNA-molekyl eller en blanding av molekyler. I en PCR reaksjon blir spesifikke deler av et DNA amplifisert, slik at man får mange kopier av det ønskede DNA fragmentet. Amplifiseringen av det DNA fragmentet skjer ved hjelp av termostabile enzymer og primere. Ved bruk av PCR må man kjenne deler av sekvensen man ønsker å amplifisere: Dette fordi at det ved PCR blir brukt spesifikke oligonukleotider/PCR-primere som skal være komplementære til denne sekvensen. Reaksjonsmiksen ved PCR består av ønsket DNA fragment, PCR-primere, enzymet *Taq* DNA polymerase, dNTP (nukleotider) og en buffer. Denne miksen settes inn i en PCR maskin, hvor den blir kjørt gjennom sykluser av ulik tidslengde og ulike temperaturtrinn som har blitt programmert på forhånd. Syklusene repeteres til ønsket mengde amplikoner er dannet. DNA-produktene kan fremvises i en agarosegel ved hjelp av UV lys, og om ønskelig brukes videre i andre eksperimenter (Nelson and Cox 2005).

1.6.2 Gel-elektroforese

Gel elektroforese er en biokjemisk teknikk, hvor man ved hjelp av et elektrisk felt kan separere mange typer organiske molekyler fra hverandre med tanke på størrelse og/eller konformasjon. Desto mindre partiklene er, og jo større ladning de har, desto hurtigere og lengre vil de gå mot motsatt ladet pol. Elektroforesen foregår i et geléaktig medium som er bygget opp av et nettverk av organiske polymerer. Agarosegeler er av de mest brukte til å separere større DNA fragmenter fra hverandre (100-20 000 nukleotider). Gelen hindrer at prøven beveger seg for fritt ved strømminger i væsken og nettverket gir en viss motstand mot diffusjon. Separasjonen vil kunne variere alt etter hvilken voltstyrke, gel tetthet (gelprosent) og buffer som blir benyttet (Becker, Kleinsmith et al. 2006).

1.6.3 Ligering inn i vektor

Vektorer er oftest sirkulære DNA fragmenter. For å kunne ligere inn et utvalgt DNA-fragment med ønsket gen i vektor, må vektor først kuttes med samme restriksjonsenzym som utvalgt DNA fragment. Den sirkulære vektoren blir da lineær, og de kuttete endene blir kompatibel med endene til DNA fragmentet. Dette gjør at baseparene mellom vektor og DNA fragment vil være komplementære og kan bindes til hverandre. DNA ligase blir benyttet for å ”lime” endene sammen. LIC-metoden benytter seg ikke av restriksjonsenzymmer og ligaser. I LIC benytter man i stedet plasmider med LIC-seter. Dermed benytter man disse til å binde DNA-fragmentene. For å få dette til, behandles DNA-fragmentene med T4 DNA polymerase, slik at de får ‘sticky ends’ som er komplementære til LIC-setene i plasmidet (Griffiths 2008).

1.6.4 Transformering

Vektor med insert av et utvalgt DNA fragment må tas opp i kompetente vertsceller, hvor *E. coli* er de mest brukte. Denne prosessen kalles transformasjon. Kompetente vertsceller er celler som har blitt spesialbehandlet med kjemikalier for å lettere skulle kunne ta opp vektor. Kalsium-klorid løsning blir ofte brukt for nettopp dette formålet. Transformasjonsprosessen blir utført ved at kompetente celler blandes med vektor og settes på is. Videre blir de varmebehandlet en kort stund, satt på is igjen, og etterpå inkubert i romtemperatur. Etter en kort inkuberingsperiode blir cellene spredt på agarplater med selektivt medium. Vektorer har gener som koder for antibiotikaresistens, for enklere å kunne selekttere dem. Celler som har tatt opp vektor vil derfor kunne vokse på agarplatene, og disse igjen vil kunne isoleres videre (Dale 2004).

1.6.5 Sekvensering av DNA

DNA sekvensering blir benyttet når man ønsker å identifisere de innsatte DNA fragmentene. Den mest brukte sekvenseringsmetoden er Sanger-metoden. Ved hjelp av denne metoden får man identifisert basesekvensene til DNA fragmentene. Sanger-metoden er en enzymatisk basert metode hvor man benytter dedeoksynukleotider (ddNTP), som er modifiserte 8 bp nukleotider. ddNTP er helt lik vanlige deoksynukleotider (dNTP), bare at de mangler en 3' hydroksylgruppe på riboseringen. Det er denne OH-gruppen som gjør det mulig å binde nye nukleotider. Så når DNA polymerase inkorporerer ddNTP til en nukleotidsekvens vil DNA-syntesen termineres. De ulike ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) er også merket med hver sin fluorescensfarge. Sekvenseringsreaksjonen blir kjørt på et vanlig PCR instrument, hvor det i tillegg til ddNTP og dNTP blir benyttet DNA polymerase og en liten enkeltrådet DNA-primer. Forholdet mellom de to nukleotidtypene er 99 % dNTP og 1 % ddNTP. DNA polymerease syntetiserer DNA fragmenter på vanlig vis, men syntesen avsluttes i det den inkorporerer ddNTP til fragmentene. På denne måten blir det produsert mange DNA fragmenter av ulik lengde, hvor samtlige har fått inkorporert en ddNTP i 3'enden. DNA fragmentene blir videre behandlet i en sekvensator, hvor båndene blir separert på en polyakrylamidgel, og en fluorescensdetektor detekterer fargene fra de fire ddNTPene. Dette blir registrert i et dataprogram, hvor hver enkelt base vises som en fargekurve (Wilson 2000).

1.6.6 Indusering av genuttrykk på molekylnivå

I kommersielle vektorer brukes det en T7 promoter som kun samsvarer med RNA polymerase fra en T7 bakteriofag. For at genet foran promotoren skal uttrykkes må Lac repressoren fjernes, og T7-RNA-polymerase være tilstedet og gjenkjenne T7. I fravær av laktose, binder lac repressoren til operatoren på DNA-sekvensen og blokkerer tilgang av T7 RNA-polymerase til promotoren og forhindrer transkripsjon av genet før induksjon. IPTG er en strukturell etterligning av laktose som også binder seg til lac repressoren, og induserer en konformasjonsforandring som reduserer affiniteten for DNA. I motsetning til laktose, er IPTG ikke del av eventuelle metabolske veier og vil ikke bli brutt ned. Dette sikrer at konsentrasjonen av IPTG tilsatt forblir konstant, noe som gjør det til en mer nyttig induktor av lac-operonet enn laktose selv (Daber, Stayrook et al. 2007). Det finnes også lignende systemer som kan induseres med mindre mengder tetracyclin som ikke fungerer antibiotisk (Carroll, Muttucumaru et al. 2005).

1.7 Mål med oppgaven

1.7.1 Hensikt

Hovedhensikten med denne masteroppgaven er å lage nye tester som kan karakterisere virkningsmekanismen til antibakterielle peptider eller andre antibiotiske forbindelser.

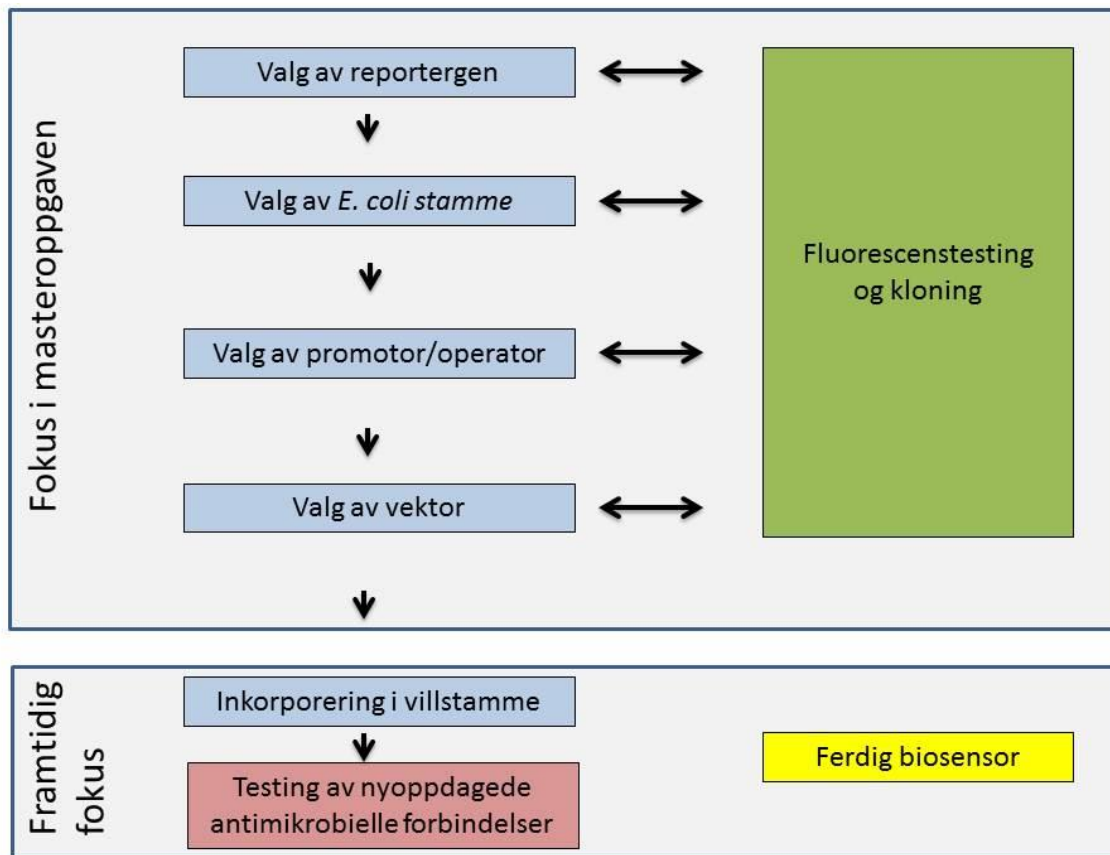
Delmål for oppgaven er derfor:

- 1) Designe en biosensor som kan detektere påvirkning av transkripsjon
- 2) Designe en biosensor som kan detektere påvirkning av translasjonen
- 3) Forsøke å kombinere de to i en og samme sensor.

1.7.2 Hypotese

Påvirkning av translasjon burde kunne påvises ved inkorporering av et reportergen som koder for produksjon av et umodifisert fluorescerende protein. For å se om transkripsjonen påvirkes, må man se på tilstedeværelse av RNA. Her kan et alternativ være å bruke split-proteiner som fester seg til RNA og dermed komplementeres og fluorescerer.

2. Material og metode



Figur 11: Forsøksdesign. Figuren viser en skjematisk oversikt over hva som er gjort i denne masteroppgaven, og hva som skal gjøres videre.

2.1 Dyrking av bakterier

Alle bakterier ble bestilt fra Invitrogen, og dyrket ved 37 °C i varmeskap over natt

2.1.2 Tillaging av LB (Luria Bertani) agar og flytende medium

Flytende medium ble laget ved å blande 10 g tryptone, 5 g gjærekstrakt, 10 g NaCl og 1 ml med 1 M NaOH til 1 l vann, som deretter ble autoklavert. Agarmedium ble laget ved å blande 10 g tryptone, 5 g gjærekstrakt, 10 g NaCl, 1 ml med 1 M NaOH og 15 g agar til 1 liter vann, og deretter autoklavere.

2.1.3 Seleksjonskonsentrasjoner

I 5 ml flytende LB-medium ble det tilsatt 5 µl med 100 mg/ml ampicillin, for en sluttkonsentrasjon på 50 µl/ml. For chloramphenicol ble det tilsatt 5 µl med 34 mg/ml

konsentrasjon til 5 ml flytende LB-medium. For agarplater ble det tilsatt 1ml antibiotika til 1 liter medium, denne ble tilsatt LB-agar etter at den var nedkjølt til ca. 50 °C.

2.2 Transformasjon av kompetente celler

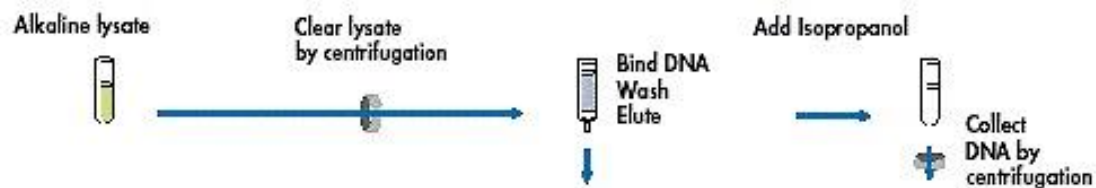
Kompetente celler ble tint på is. I transformasjonsprosessen ble det brukt 1,5 ml eppendorfrør. 1 µl plasmid (Benyttede plasmider i tabell 1) ble tilsatt i hvert sitt rør med 50 µl suspensjon av kompetente celler. Rørene ble videre inkubert på is i 30 min. Etterpå ble bakteriene utsatt for varmesjokk ved å inkubere rørene i 45 s i ett vannbad på 42 °C. Så ble de plassert på is i 2 min, og deretter tilsatt 400 µl romtemperert LB-medium til hvert av rørene etterfulgt av inkubasjon på 37 °C ved 250 rpm risting i 60 min. Til slutt ble transformasjonsløsningen platet ut. For å øke sannsynligheten av å få godt separerte kolonier ved samtidig oppsamling av så mange transformanter som mulig, ble bakteriesuspensjonen fordelt på to LB-plater supplert med passende antibiotika. En del av suspensjon (100 µl) ble direkte platet ut på den første platen, mens den resterende suspensjonen ble sentrifugert i 1 minutt ved 10000 rpm til bakteriecellene var pelletert for så å resuspendere pelleten i 100 µl LB-medium før plating. I dette arbeidet ble det brukt to forskjellige *E. coli*-stammer. For amplifisering av plasmider ble det brukt *E. coli* DH5α, og for uttrykk av reporterkonstruktene ble det benyttet *E. coli* BL21. Platene ble inkubert på 37 °C over natten.

Tabell 1: Plasmider benyttet i oppgaven. Vektorer ble bestilt fra Invitrogen og IBA. Egenproduserte plasmider ble satt sammen av deler fra leverte plasmider.

Navn plasmid	Kilde/Produsent
pTrcHis2 TOPO	Invitrogen
pASK-IBA3plus	IBA
pRSET-B mcherry	(Shaner, Campbell et al. 2004)
pBAD*RFPEC2	(Pfleger, Fawzi et al. 2005)
pMB53(33)	(Valencia-Burton, McCullough et al. 2007)
pMB84	(Valencia-Burton, McCullough et al. 2007)
pMB99	(Valencia-Burton, McCullough et al. 2007)
pMB114	(Valencia-Burton, McCullough et al. 2007)
pMB1	pTrcHis2 TOPO / pRSET-B mcherry
pMB2	pASK-IBA3plus /pMB114

2.3 Rensing av plasmid

Av enkeltkolonier fra transformasjon ble det laget fortynningsutstrykning. Enkeltkloner ble plukket fra fortynningsutstrykningen, og laget overnattkulturer i 5 ml flytende LB-medium med passende antibiotika. Fra disse overnattkulturene ble det rensset plasmid ved hjelp av QIAPREP MINI KIT (figur 12) (QIAGEN 2012). 5 ml prøve ble overført til falconrør, og spunnet på 11000 rpm i 3 min. Pelleten ble resuspendert i 250 µl buffer P1 (med LyseBlue), og overført til 1,5 ml eppendorfrør. En mengde av buffer P2 (250 µl) ble tilsatt og blandet ved å vende 6 ganger og deretter inkubert ved romtemperatur i < 5 min. En mengde av buffer N3 (350 µl) ble tilsatt og blandet inn ved å vende 6 ganger. Prøvene ble deretter spunnet på 13000 rpm i 10 min. Supernatanten ble overført til en QIAprep spin kolonne. Kolonnen ble sentrifugert ved 13000 rpm i 60 s, og eluat kastet. Kolonnen ble så vasket med 500µl buffer PB og sentrifugert i 60 s, og eluatet ble kastet. Kolonnen ble deretter vasket med 750 µl buffer PE, spunnet ved 13000 rpm i 60 s, og eluat kastet. Den ble så sentrifugert i ytterligere 60 s for å fjerne overskudd av buffer. QIAprep kolonnen ble deretter overført til et rent 1,5 ml eppendorfrør. For å eluere plasmidet, ble det tilsatt 50 µl elueringsbuffer EB. Røret fikk stå i 1 min, og deretter spunnet på 13000 rpm i 1 min.



Figur 12: Skjematisk framstilling av prosedyre for rensing av plasmid, ved hjelp av QIAGEN kit.

2.4 Testing av fluorescens

Kulturer av BL21(DE3) som var transformert med sekvenser for fluorescerende proteiner, og dyrket over natt, ble testet for fluorescens ved hjelp av plateleser Synergy H1 (Biotek, Winooski, United States), og programvaren Gen5. Bakterier med plasmider ble dyrket over natt i flytende LB-medium, i ristemaskin på 37 °C. Før måling ble bakteriene fortynnet til

OD₆₀₀=0,1 ved å tilsette passende mengde LB-medium, etter måling i et spektrofotometer. Det ble overført 150 µl bakterieløsning til hver brønn i en 96-brønns svart mikrotiterplate med blank bunn (Falcon, Bredford, MA, USA), og induisert med 100 µM IPTG eller arabinose til ønsket sluttkonsentrasjon. Målingen ble gjort 9 timer etter indusering, siden fluorescerende proteiner har en lang modningstid. DsRed flere timer, mCherry har en time, og GFP har enda lengre (Shaner, Steinbach et al. 2005). Det ble målt med 575 nm eksitasjon og 615 nm emisjon, de største eksitasjons/emisjonstoppene til mCherry er 587 nm/610 nm, mens DsRed er 584nm/610nm (Shaner, Steinbach et al. 2005). GFP som har de største eksitasjons/emisjonstoppene ved 488 nm/507 nm, ble målt ved 460 nm eksitasjon og 528 nm emisjon.

2.5 Designing av primere

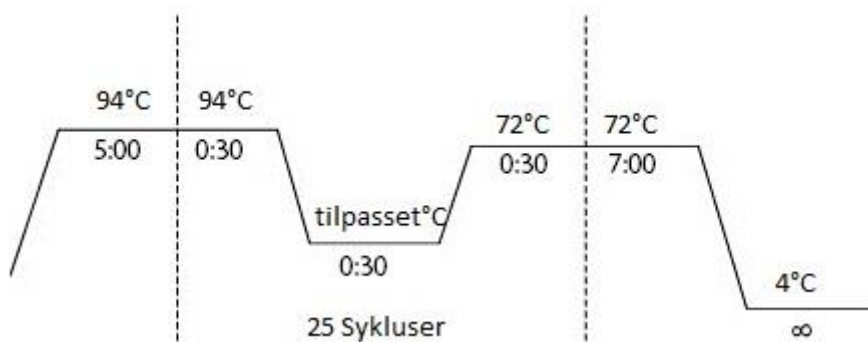
Det ble designet primere for å amplifisere delene av plasmidene som kodet for de fluorescerende proteinene og andre deler som var interessante å bruke videre. Dette ble gjort ved hjelp av programvaren PerlPrimer (Marshall 2004). Korrektheten ble sjekket *in silico* ved å simulere en PCR reaksjon med plasmidet i programvaren PlasmaDNA (Angers-Loustau, Rainy et al. 2007). Primere ble så bestilt fra Sigma-Aldrich life sciences (Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo, Norge). Liste over primere som er anvendt er vist i tabell 2.

Tabell 2: Liste over konstruerte og brukte primere som ble brukt i denne oppgaven. 5-prime overheng i små bokstaver og restriksjons seter i kursiv.

Primer navn	Annealing temp (°C)	sekvens (5'-3')
MC2F	66,5	ATGGTGAGCAAGGGCGAG
MC2R	50,7	TTACTTGTACAGCTCGT
aptamer forward	95-25	aatg <i>GAA</i> TTCCAGGGGACCGCGCCCCACATGTGAGTGAGG CCGAAACGTAGATTCGACAGGAGGCTCACAACGGATCC
aptamer reverse	95-25	gcgc <i>GGAT</i> CCGTTGTGAGCCTCCTGTCGAATCTACGTTTC GGCCTCACTCACATGTGGGGCGCGGTCCCCTGGAATTC
pTrcHis forward	65	TATGGCTAGCATGACTGGT
pTrcHis reverse	65	GATTTAATCTGTATCAGG
ACYCDuetUP1	65	GGATCTCGACGCTCTCCCT
DuetUP2	65	TTGTACACGGCCGCATAATC
DuetDOWN1	65	GATTATGCGGCCGTGTACAA
T7 Terminator	60	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pET Upstream	65	ATGCGTCCGGCGTAGA

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

For å konstruere de ønskede insertene, amplifiserte vi først DNA fragmentene ved hjelp av PCR. En viss mengde plasmid DNA (98 ng), 1 µl fwd primer (10 µM), 1 µl rev primer (10 µM), 1 µl dNTP mix, 1 µl Polymerase, 5 µl 10X buffer og MilliQ til et totalvolum på 50 µl. PCR ble kjørt på et generelt program, men temperatur for annealing ble tilpasset de forskjellige primerne (se tabell 1). Generelt oppsett av PCR-reaksjonene er vist i figur 13.



Figur 13: Generelt program for oppsett av en PCR kjøring inkludert temperaturer. Annealing temperaturen ble tilpasset de enkelte primerne som ble brukt i hver PCR, og som er referert i Tabell 1.

2.7 Gel-elektroforese

Produktet fra PCR ble kjørt på gel elektroforese for å se om DNA-fragmentene var amplifisert. Det ble benyttet 1 % agarose i 1x TAE-buffer, og tilsatt ethidiumbromid direkte til gelen for å synliggjøre DNA under UV-lys. Gelen ble støpt, og kjørt, i Liberty 4 gelkammer fra Biokey. 5 µl prøve ble blandet med 1µl 5X loading dye. Det ble brukt 1 µl av en 1 kb ladder (+4µl vann). Gel ble kjørt i 20 minutter ved konstant spenning på 200 volt. Sidekamre ble fylt med 1x TAE buffer, og gelkammeret med vann for å hindre opphetning. Bilder ble tatt av gelen ved hjelp av UV-lys i apparatet Syngene bio imaging system og programvaren gene snap.

2.8 Rensing av PCR-produkt

De resterende 46 µl med amplifisert PCR-produkt ble deretter rensert ved hjelp av QIAGEN kit i henhold til prosedyren fra forhandleren (QIAGEN 2008). Kort fortalt ble 5 deler av buffer PB tilsatt 1 del PCR-produkt og blandet. Blandingen ble overført til en QIAquick kolonne, plassert i et eppendorfrør. Dette ble sentrifugert i 60 s. Alt som gikk igjennom kolonnen ble kastet, og det ble tilsatt 0,75 ml buffer PE og sentrifugert i 60 s. Alt som gikk igjennom kolonnen ble kastet, og det ble sentrifugert i 60 nye sekunder. QIAquick kolonnen ble plassert i et nytt eppendorfrør, og 30 µl Buffer EB ble tilsatt for å eludere DNA. Kolonnen ble sentrifugert i 60 s. Gel elektroforese ble kjørt på produktet. Bestemmelse av konsentrasjon og renhet ble gjort ved hjelp av NanoDrop spektrofotometer.

2.9 Sekvensering

Prøvene ble sekvensert ved Sanger sekvensering for å se om de korrekte plasmidene var rensert. Sekvenseringsblandingen ble laget ved å blande 1 µl Big-Dye v3.1, 3 µl Big-Dye Sequencing buffer (Boutin, Wahl et al. 2000), 200 ng templat, 1 µl primer (3,2 pmol), tilsatt MilliQ-vann til et samlet volum på 20 µl. Blandingen ble kjørt på 96 °C i 5 min, 25 sykluser på 96 °C i 10 s, 50 °C i 5 s, 60 °C i 4 min. Prøvene ble deretter overlevert sekvenseringsplattformen ved institutt for medisinsk genetikkk ved fakultet for helsefag, for sekvensering. Data ble senere analysert ved hjelp av programvaren Bioedit (Hall 2011).

2.10 Ligering inn i vektor

PCR produkt mCherry mc2, ble ligert inn i vektoren pTrcHis2TOPO. Dette ble gjort ved å blande 1 µl PCR-produkt, 1 µl vektor og 3 µl sterilt vann. Det ble blandet forsiktig, og inkubert på romtemperatur i 5 minutter. 2 µl ble blandet med 50 µl BL21 kompetente celler, og inkubert på is i 30 min. Deretter ble cellene utsatt for 42 °C varmesjokk i 30 sekunder, og satt på is igjen. 250 µl romtemperert SOC medium ble tilsatt, og rørene ble satt på 37 °C med horisontal risting i 30 minutter. 50 µl av medium med bakterier, ble platet ut på LA-amp plater, og inkubert på 37 °C over natt. Enkeltkloner ble selektert, dyrket over natt i LB-medium med ampicillin, og plasmidet ble så isolert. Isolert plasmid ble analysert ved hjelp av sekvensering.

2.11 Konstruksjon av aptamerinsert

Aptamerinsertet ble laget ved å anneale to komplementære oligonukleotider. Oligonukleotidene for framstilling av aptamer-insert ble designet slik at 5'-overhangene passet til *BsaI* restriksjon av pASK-IBA 3plus luxCDABE og førte til en retningsbestemt integrasjon under ligering. Oligonukleotidene ble bestilt fra Sigma. Følgende reaksjonsblanding ble satt opp i et eppendorfrør for annealing: 5 µl aptamer forward primer (100 µM), 5 µl aptamer revers primer (100 µM), 5 µl 10X ligase buffer og 35 µl vann. Varmeblokken ble varmet opp til 95 °C. Deretter ble den skrudd av, og reaksjonsblandingen i eppendorfrøret satt på. Når varmekblokken hadde nådd romtemperatur ble eppendorfrøret overført til is. Dette ble utført for å kunne ligere aptamerinsertet inn i pASK-IBA3plus.

2.12 Åpning av plasmid med restriksjonsenzym

Plasmidet pASK-IBA3plus ble kuttet med restriksjonsenzymet *BsaI* (Roberts and Biolabs 1998), i følgende blandingsforhold: *BsaI* 2 µl, buffer, BSA 3 µl, plasmid 10 µl, H₂O 15 µl. Alle enzymer og buffere produsert av New England Biolabs. Blandingen ble inkubert i 37 °C varmeskap i 2 timer. Deretter ble det separert på 1 % agarosegel, og båndet som inneholdt plasmidet ble kuttet ut og videre analysert som omtalt i 2.13.

2.13 Rensing av bånd isolert fra agarosegel

De ønskede gelområdene som viste båndene ble kuttet fra gel ved hjelp av skalpell mens gelen ble gjennomlyst av UV-lys. Deretter ble gelbitene som inneholdt de fargede produktene rensert ved hjelp av QIAquick Gel Extraction fra Qiagen. Gelskiven ble veid i et eppendorfrør, og det ble tilsatt 3 deler buffer QG til et volum gel. Blandingen ble inkubert ved 50 °C i 10 minutter, og vortexet hvert 3. min. Etter at gelen var fullstendig oppløst ble det tilsatt et gelvolum av isopropanol (100) til prøven og blandet godt. Løsningen ble så overført til en QIAquick spin kolonne, og sentrifugert ved 13000 rpm i 1 min. Det ble tilsatt buffer QG (500 µl) til kolonnen og sentrifugert i 1 min, og deretter ble 750 µl buffer PE ble tilsatt til QIAquick kolonnen og sentrifugert i 1 min. QIAquick kolonnen ble sentrifugert i ytterligere 1 min for å fjerne rester av buffer og ble overført til et eppendorfrør og tilsatt 50 µl buffer EB. Etter henstand i 1 min, ble den sentrifugert i 1 min for å eluere DNA. All sentrifugering ble gjennomført ved 13000 rpm.

3. Resultat

3.1 Sammenligning av Fluorescens mCherry og dsRed i forskjellige stammer av *E. coli*

Aller først var det nødvendig å bestemme hva for kilde til fluorescens som skulle brukes i denne masteroppgaven. Derfor ble fluorescens av DsRed og mCherry sammenlignet for å se hvilken som var mest hensiktsmessig å bruke videre. De forskjellige plasmidene bruker forskjellige promoter-operator konstrukter som skal kunne induseres med enten arabinose (ParaBAD i pBAD*RFPEC2) eller IPTG (T7-promotor som krever induksjon av T7-polymerase som kan induseres vha. IPTG i BL21). I denne oppgaven var det viktig å teste om promotorene eventuelt kunne brukes i kombinasjon, derfor ble alle promotorer testet med både IPTG og arabinose, og i de tre forskjellige *E. coli*-stammene som ble brukt som biosensor tidligere. Det ble gjort målinger av uttrykk av proteinene i *E. coli* stammene DH5 α , HB101 og BL21 (tabell 3). Som vist i tabell 3, ga mCherry best signal da det ble uttrykt i stammen BL21. Uttrykket av mCherry i DH5 α var noe sterkere enn i HB101, og enn DsRed generelt. Totalt sett ble konklusjonen at mCherry virket mest lovende, og ble derfor besluttet å bli brukt videre i arbeidet.

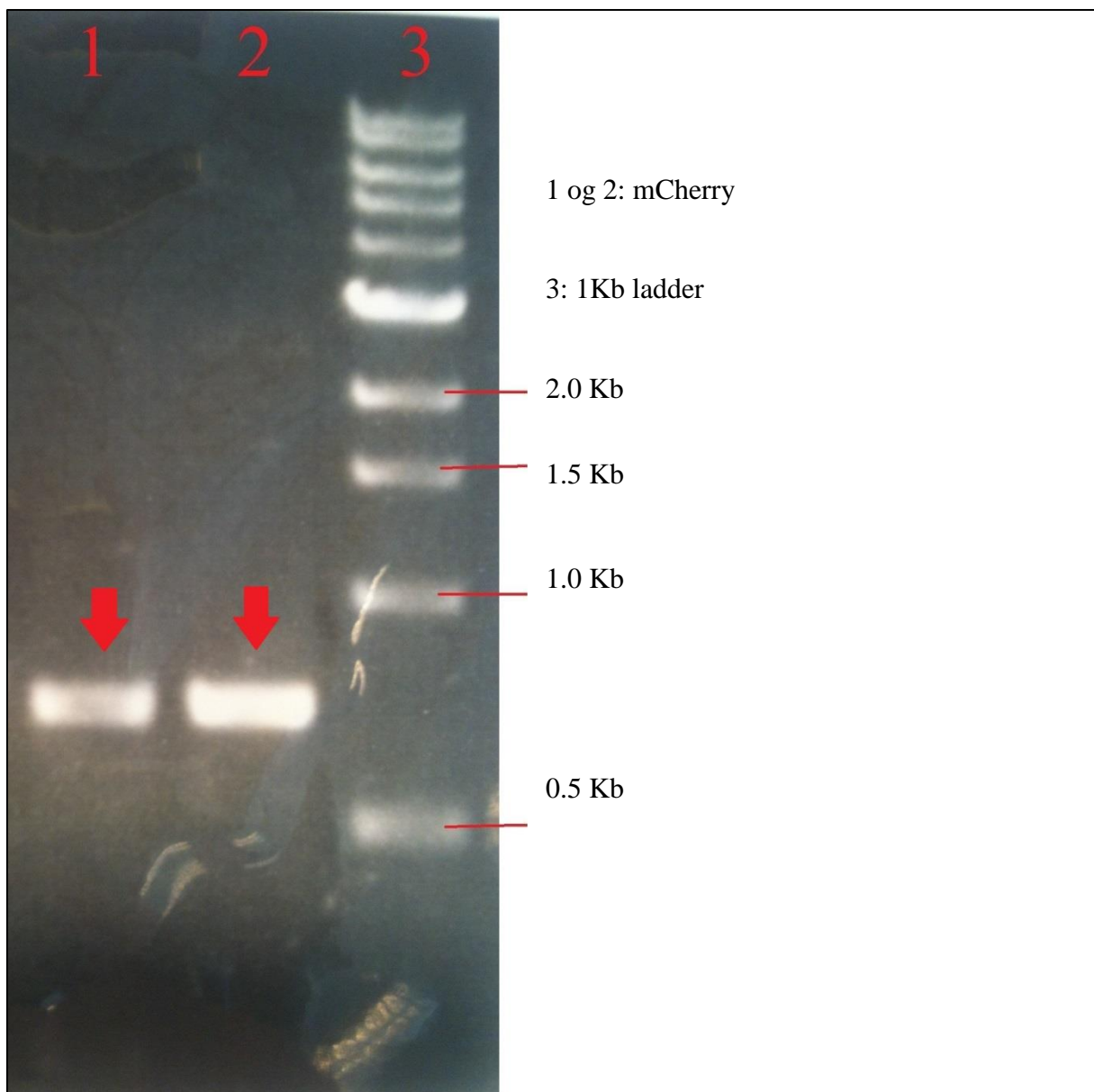
Tabell 3: Fluorescensmåling av DsRed og mCherry i DH5 α , HB101 og BL21. Målingene er gjort ved hjelp av Synergy HI-plateleser og tolket ved hjelp av programvaren Gen5. Det ble brukt 575nm, og 615nm til eksitasjon og emisjon. Målingene er gjort 9 timer etter induksjon. . Verdien oppgitt er forhold mellom vekst og fluorescens.

IPTG/Ara. Kons	DH5a DsRed	HB101 DsRed	BL21 DsRed	DH5a mCherry	HB101 mCherry	BL21 mCherry	DH5a DsRed	HB101 DsRed	BL21 DsRed	DH5a mCherry	HB101 mCherry	BL21 mCherry
5mM	427	1241	127	3913	201	20445	436	1074	571	3778	337	9048
2,5mM	330	1111	251	3820	167	16757	561	933	555	3748	263	8369
1,25mM	407	1010	173	3680	170	15656	341	959	681	3699	271	9317
0,625mM	264	1016	186	3724	119	15014	496	964	580	3584	276	9308
0,3125mM	291	987	284	3895	141	14993	461	933	547	3694	304	10264
0,1562mM	268	1055	148	3912	136	14694	380	898	458	3934	241	10344
0,0781mM	291	1079	228	3815	152	14968	399	1054	470	3897	212	10434
0mM	235	1065	169	3807	143	10606	383	1065	193	4082	205	10792
	IPTG						Arabinose					

3.2 Kloning av mCherry i pTrcHis2TOPO

3.2.2 PCR amplifisering av mCherry

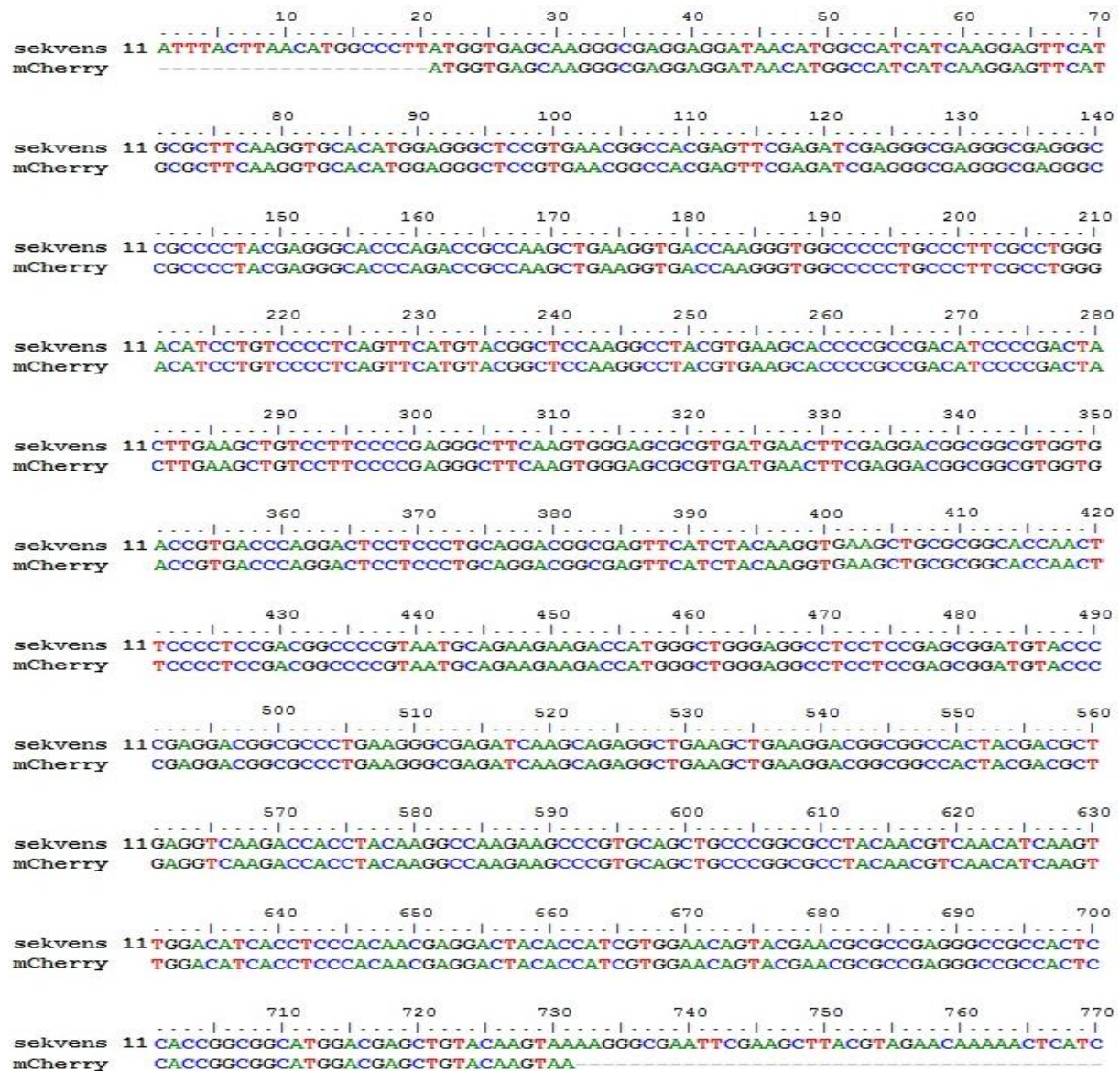
Det ble kjørt PCR på plasmidet pRSET-B mcherry med primerne mC2F og mC2R. Disse primerne amplifiserte delen av plasmidet som koder for det rødt fluorescerende proteinet mCherry. På figur 14 kan man se bånd i agarosegelen som viser PCR-produkt, og som ble benyttet for å analysere størrelsen av produktet. Den forventede størrelsen var 711 basepar. På bildet av gelen, kan man se at båndet plasserer seg midt mellom standardens bånd for 500 basepar og 1000 basepar, og ligger dermed i det forventede størrelsesområdet.



Figur 14: Bilde av 1 % agarosegel som viser båndene (brønn 1 og 2) av PCR-produkt av plasmid med mCherry amplifisert med henholdsvis primerne mC2R og mC2F. Båndene av det amplifiserte produktet ligger midt i mellom standardens bånd på 1.0 Kb og 0,5 Kb, og det er derfor mest sannsynlig det forventede konstruktet, som skal være 711 basepar. PCR-produktene er merket med piler.

3.2.5 Sekvens av pMB1

Siden reaksjonen ikke er retningsbestemt kunne PCR-produktet havne begge veier. Etter kloning ble derfor plasmidet renset, og sekvensert.



Figur 16: Resultat av sekvensering, etter ligering av mCherry inn i pTrcHis2TOPO. Sekvensering nr 11 var produsert av pTrcHis reverse og er derfor komplementær til mCherry-sekvensen.

Sekvensering var viktig for å bestemme hvilke som hadde rett orientering i forhold til promotoren. I alt ble 9 forskjellige prøver sekvensert. Prøve 11 var en av to uten noen mutasjoner som var orientert riktig i forhold til promotoren. Som man kan se av sekvenseringsresultatene i figur 16, ligeringen av mCherry i pTrcHis2TOPO vellykket. Sekvensen som er vist på bildet ble laget av pTrcHis reverse og er komplementær til mCherry. Det ser derfor ut som ligeringen, orienteringen og dermed produksjonen av pMB1, var vellykket.

3.2.6 Fluorescensmåling av pMB1

Det ble gjort en enkelt avmåling av fluorescensen fra pMB1 med de samme konsentrasjonene av IPTG som før ligeringen i pTrcHis2TOPO. Fremdeles viser den dobbelt så høy fluorescering fra induerte som ikke induerte prøver. Alle verdier er forhold mellom vekst og fluorescens (tabell 4).

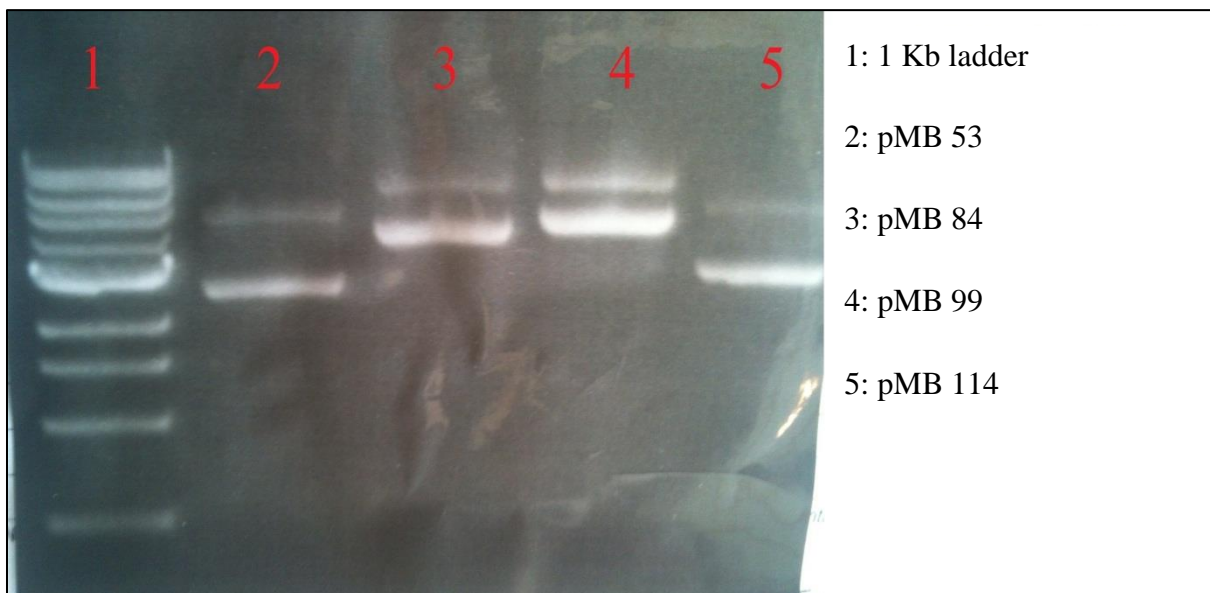
Tabell 4: Det ble gjort en enkelt avmåling av fluorescensen fra pMB1 med de samme konsentrasjonene av IPTG som før ligeringen i pTrcHis2TOPO. Fremdeles viser den dobbelt så høy fluorescering fra induerte som ikke induerte prøver. Alle verdier er forhold mellom vekst og fluorescens.

IPTG kons.	pMB1
5mM	6990,783
4mM	6507,647
3mM	6664,314
2mM	6570,277
1mM	6681,721
0,5mM	6746,219
0,2mM	8509,005
0mM	2611,705

3.3 Resultat av funksjonstest Split-GFP

3.3.1 Transformasjon av DH5 α og rensing av plasmider

Plasmidene pMB53, pMB84, pMB99 og pMB115 ble bestilt fra Natalie Broude i Boston (Borogovac and Broude 2011). Disse ble brukt for å transformere *E. coli* DH5 α for amplifisering, slik at man hadde større mengder til resten av oppgaven. Etter transformering ble det laget overnattekulturer, som det så ble rensset plasmider fra. På figur 17 kan man se gelbilde av de rensede plasmidene. Når plasmider kjøres på gel vil de vanligvis gi tre bånd, med plasmidet i forskjellige tilstander, supercoiled, nicked og lineært.



Figur 17: *E. coli* DH5 α ble transformert av plasmidene. Dette for å amplifisere større mengder. Etter transformasjon ble det laget overnattekulturer, som det så ble rensset plasmider fra. De rensede plasmidene ble så kjørt på en 1 % agarosegel, for å se om riktige plasmider var blitt rensset.

3.3.2 Fluorescensmåling av pMB53/84/99/114

Tabell 5 viser fluorescensmåling av pMB53, pMB99, pMB99 og pMB114 uttrykket i BL21. Disse målingene er gjort i bakterier dyrket i LB-medium over natt på 37 °C, og fortynnet til OD600=0,1. Prøvene ble indusert med forskjellige konsentrasjoner av IPTG, og målingene i tabell 5 er etter 5 timer. Resultatene viser liten forskjell mellom de forskjellige prøvene, og de som kun inneholder plasmidet pMB53, og ikke skal fluorescere like mye, har samme fluorescens som bakteriene med begge plasmidene. Rent LB-medium som fluorescerer mest av alle prøvene. For å se om dette skyldtes dyrkning ble det forsøkt å dyrke bakterien på romtemperatur, men dette ga samme resultater. Det ble også forsøkt å dyrke bakteriene i M9-medium, men det ga dårlig eller ingen vekst. Det ble også gjort målinger etter først å ha vasket bakteriene i buffer, men dette ga lignende resultater.

Tabell 5: Fluorescensmåling av pMB53 alene og i kombinasjon med pMB84, pMB99 og pMB114. Alle i BL21 etter dyrkning ved 37 °C over natt, og fortynnet til OD600=0,1. Målingene er gjort ved hjelp av Synergy H1, og programvaren Gen5.

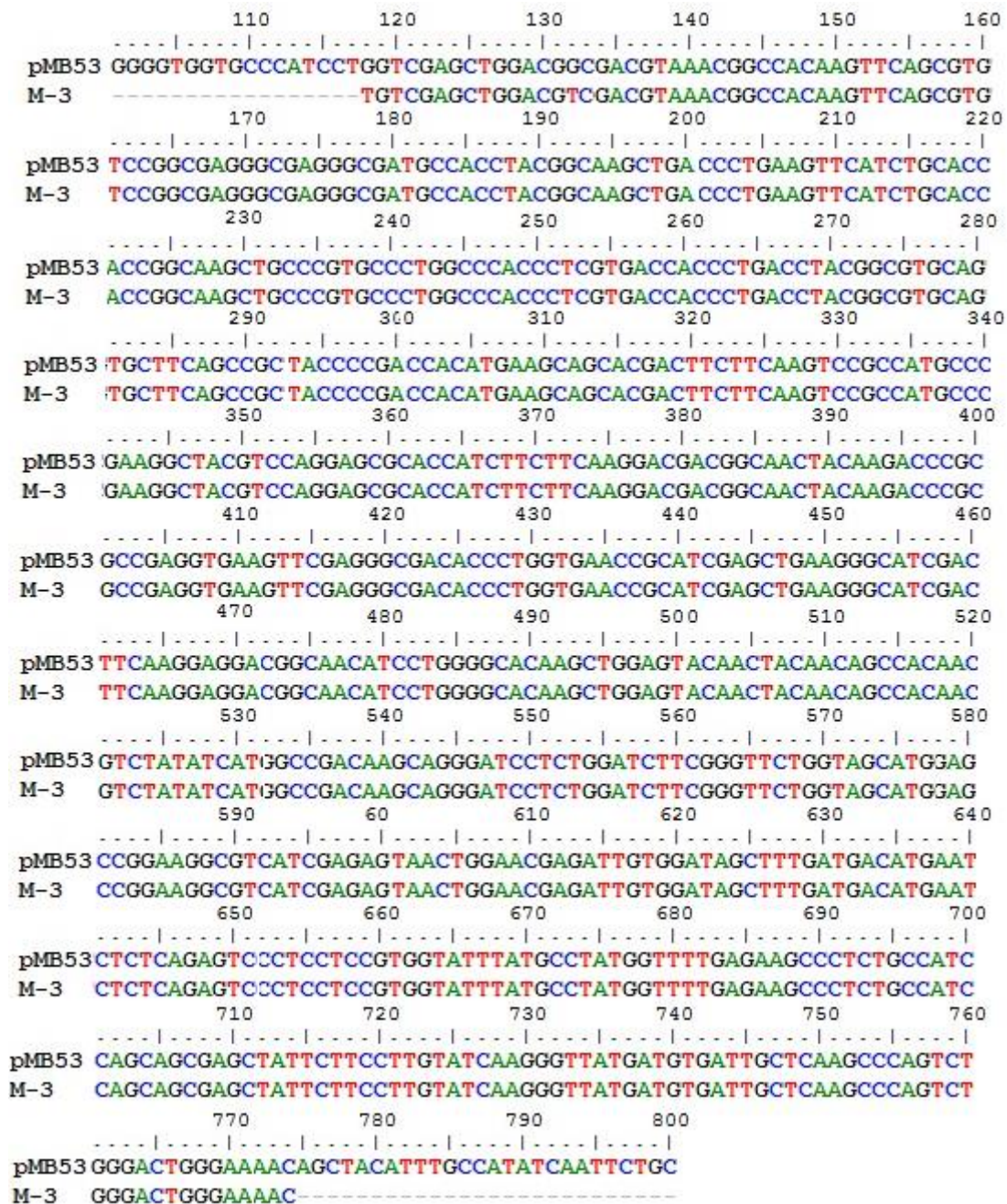
IPTG Kons.	BL21 pMB53	BL21 pMB53	BL21 pMB53	BL21 pMB53/ pMB84	BL21 pMB53/ pMB84	BL21 pMB53/ pMB84	BL21 pMB53/ pMB114	BL21 pMB53/ pMB114	BL21 pMB53/ pMB114	LB
5mM	2137	2262	2144	2314	2336	2325	2509	2589	2377	3313
4mM	2264	2116	2147	2252	2184	2178	2422	2468	2283	-
3mM	2172	2194	2167	2307	2335	2417	2556	2463	2377	-
2mM	2137	2123	1789	2297	2291	2270	2474	2377	2331	-
1mM	2266	1971	2210	2236	2368	2242	2491	2141	2400	-
0,5mM	2118	2000	2060	2287	2380	2323	2544	2449	2217	-
0,2mM	2161	2059	2200	2254	2200	2330	2466	2297	2318	-
0mM	2297	2055	2034	2327	2354	2338	2309	2501	2251	-

3.3.3 Sekvens av pMB53/84/99/114

Forventningen var at det skulle være forskjell mellom bakterier med bare pMB53, og de med kombinasjoner av pMB53 + pMB84/99/114, men disse kunne ikke detekteres. Hypotesen var da at noe ikke stemte med plasmidene, mest sannsynlig pMB53, fordi ingen av kombinasjonene stemte med det som er publisert (Valencia-Burton, McCullough et al. 2007). Det ble sjekket ved sekvensering om det kunne være feil i plasmidene, og at dyrkning og fluorescensmålinger ikke var gjort feil. Etter sekvensering ble det funnet feil i plasmidet pMB53. Sekvenseringsresultatene viste at pMB84/99/114 var riktig levert. pMB53 viste deg derimot å inneholde feil, flere baser stemte ikke overens med den opprinnelige sekvensen for pMB53, og dette var gjennomgående. Sannsynligvis ble det levert plasmid med feil på i utgangspunktet. Det fullstendige sekvenseringsresultatet ligger i appendix. Dette var sannsynligvis grunnen til at fluorescensmålingene ikke gikk som forventet. Det ble derfor bestilt nye pMB53 plasmider fra produsenten.

3.3.4 Sekvens av ny pMB53

For ikke å bruke mer tid på fluorescensmåling av bakterier uten fluorescens, ble det besluttet å sekvensere det nye plasmidet før videre arbeid ble satt i gang. På figur 18 kan man se resultatet av denne sekvenseringen. Resultatene viste at man hadde det riktige plasmidet, som det kunne jobbes videre med.



Figur 18: Sekvenseringsresultat av det nye plasmidet pMB53. Resultatene viser at plasmidet er riktig, og man kan derfor gå videre i arbeidet med sensoren.

3.3.5 Ny Fluorescensmåling av pMB53/84/99/114

Tabell 6 viser ny fluorescensmåling av pMB53, pMB99, pMB84 og pMB114 uttrykket i BL21. Disse målingene er gjort i bakterier dyrket i LB-medium over natt på 37 °C, og fortynnet til OD₆₀₀=0,4. Prøvene ble induisert med forskjellige konsentrasjoner av IPTG. Resultatene viser forskjell mellom de forskjellige prøvene, og de som kun inneholder plasmidet pMB53 har jevnt lavere fluorescens enn de med kombinasjon av pMB53 og pMB84/99/114. Det ser også ut for at forskjellige konsentrasjoner av IPTG har liten innvirkning på fluorescensen. Tabell 6 viser veksten på prøvene tatt underveis i fluorescensmålingene. Der kan man se at veksten på bakteriene med kun pMB53, er høyere enn bakteriene med kombinasjonsplasmidene, og forskjellen skyldes derfor ikke vekst.

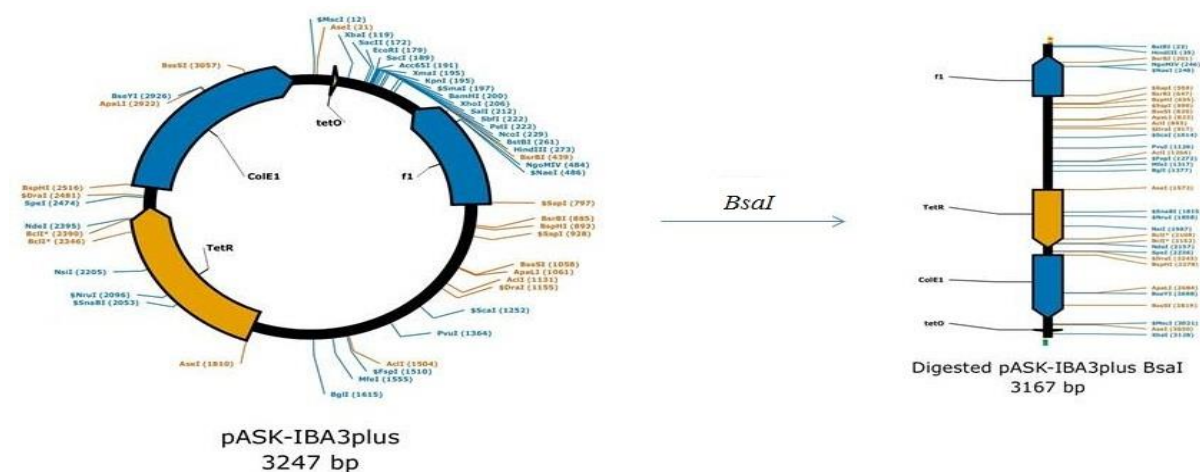
Tabell 6: Fluorescensmåling av nybestilt pMB53 alene og i kombinasjon med pMB84, pMB99 og pMB114. Alle i BL21. Målingene er gjort ved hjelp av Synergy H1, og programvaren Gen5. Man kan se en tydelig forskjell mellom bakteriene med kun pMB53, og de med kombinasjon av pMB53 og pMB84/99/114. Verdiene er fluorescensstyrke i forhold til vekst.

IPTG Kons	pMB53	pMB53/84	pMB53/99	pMB53/114
5mM	74694	157675	152814	154302
2,5mM	74436	157396	150729	156814
1,25mM	70245	144559	146718	161865
0,625mM	72505	152881	143047	156345
0,3125mM	75872	154382	157534	158477
0,1562mM	73231	144267	161780	155520
0mM	70276	113015	143422	125243

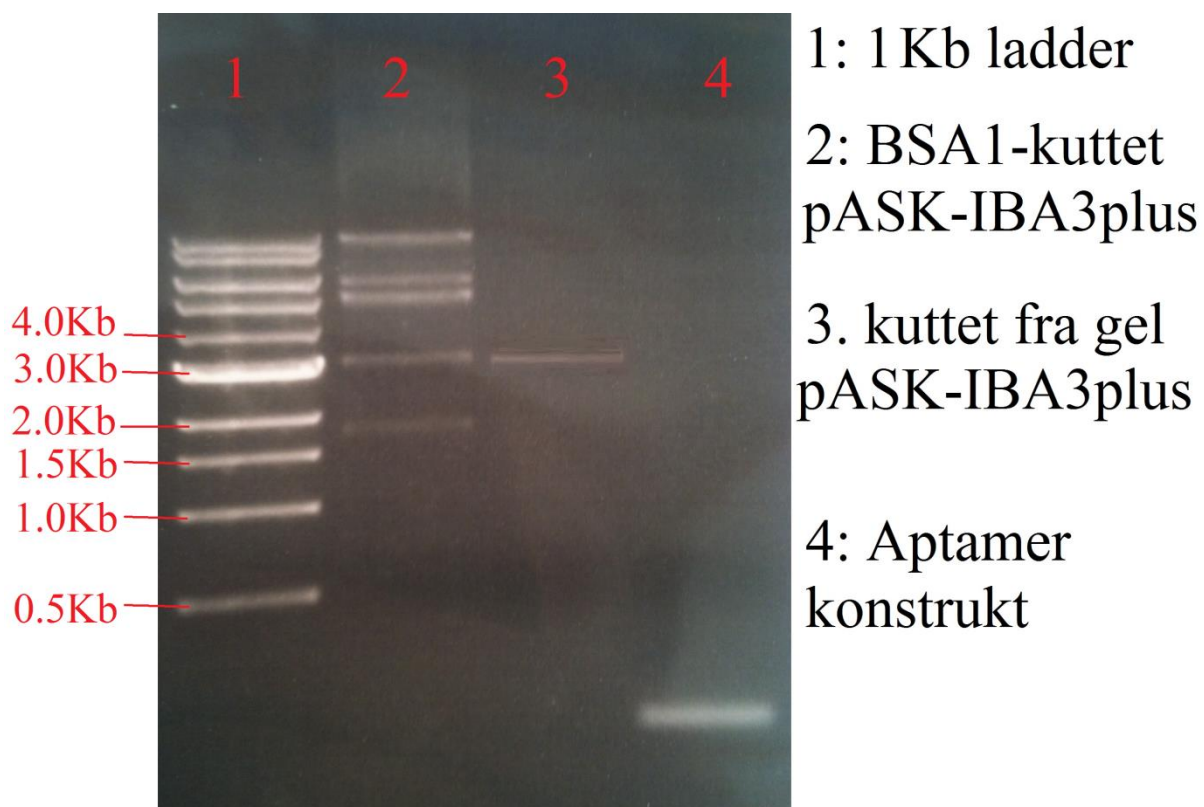
3.4 Kloning av transkripsjonssensor

3.4.1 Konstruksjon av insert og åpning av pASK-IBA3plus

I utgangspunktet skulle det kommersielle plasmidet pASK-IBA3plus fra IBA brukes. Tidligere erfaring med *BsaI* i kombinasjon med pASK-IBA3plus resulterte alltid i ufullstendig kutting av plasmidet. Dette førte til høy bakgrunn pga. religasjon og ukuttede plasmider under kloning. Derfor ble det brukt et *luxCDABE* konstrukt, som hadde pASK-IBA3plus som utgangspunkt. Dette var for lettere å kunne se de ønskede båndene på gelen. Plasmidet hadde *lux*-cassetten ligert inn i EcoRI kuttsetet som da ble fjernet ved fullstendig kutting med *BsaI*, og dermed ble det ingen ufullstendig kuttete plasmid med i ligasjonen, noe som ville gitt stor bakgrunn. Åpning av pASK-IBA3plus ble gjort ved å kutte plasmidet med *BsaI*, kjøre det kuttete plasmidet på en 1 % agarosegel og kutte det lineariserte plasmidet fra gelen. *BsaI* tilhører restriksjonenzymklasse II, som betyr at gjenkjennelsesekvensen til *BsaI* (GGTCTC) er adskilt fra kuttsetet med et basepar (den er ikke palindromisk). Hvis regionene rundt kuttsetet er forskjellig vil kloningen være retningsbestemt. Det ble også tilsatt BSA, slik at *BsaI* fungerte ved 37 °C. Kutting og dermed linearisering av plasmidet er illustrert på figur 19, ved hjelp av PlasmaDNA. Det kuttete plasmidet kan ses som nummer 2 i figur 20. Det ønskede båndet ligger på 3.0 Kb. Dette ble kuttet og renset kan sees som nummer 3 i figur 20, det er forsterket på figuren for å gjøre det mer tydelig. Aptameret ble konstruert ved hjelp av ferdig bestilte oligonukleotider som ble annealet til hverandre og kan ses som nummer 4 i figur 20. Aptamersekvensen til oligonukleotidbestilling er hentet fra publikasjonen (Valencia-Burton, McCullough et al. 2007).



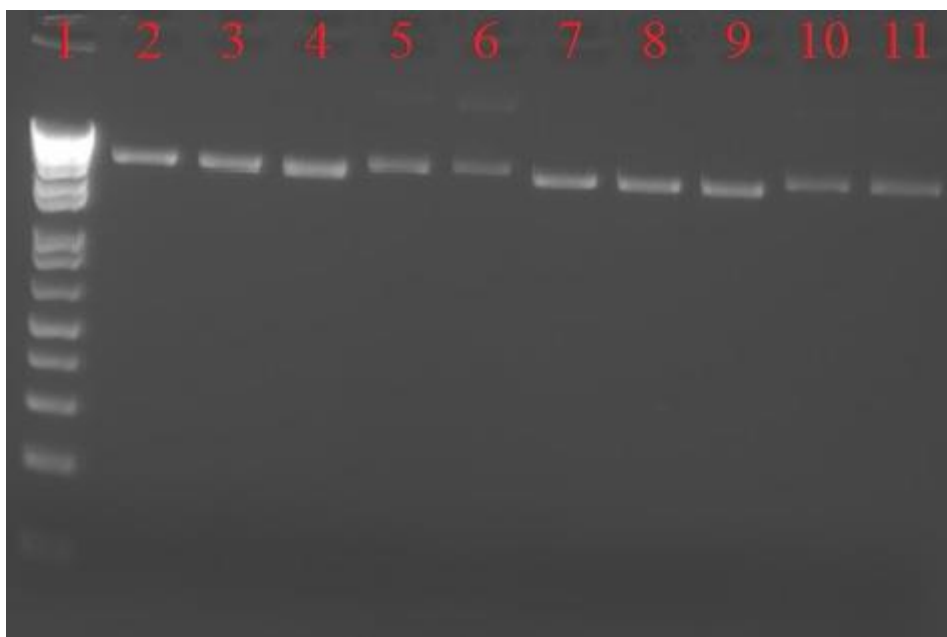
Figur 19: Linearisering av pASK-IBA3plus. Plasmidet ble linearisert ved hjelp av *BsaI* som har kuttsetet rett foran TetO som gjør at insertet kan plasseres rett foran promotoren (*luxCDABE* sekvensen blir ikke vist her).



Figur 20: Gel-bilde av *BsaI*-kuttet pASK-IBA3plus som nummer 2, her kan man se 2 deler av *luxcdabe*-kassetten som har 1 *BsaI* kuttsete, det lineariserte plasmidet med *luxCDABE*, bare *luxCDABE* og de to delene av *luxCDABE* som er mindre og større enn *pask-iba3plus* alene. Nummer 3 er plasmid-båndet som ble kuttet og nummer 4 som er aptamer konstruktet laget av primere. Bånd 3 er forsterket på bildet, for å gjøre det mer tydelig, da det var veldig svakt.

3.4.3 Restriksjonssetetest

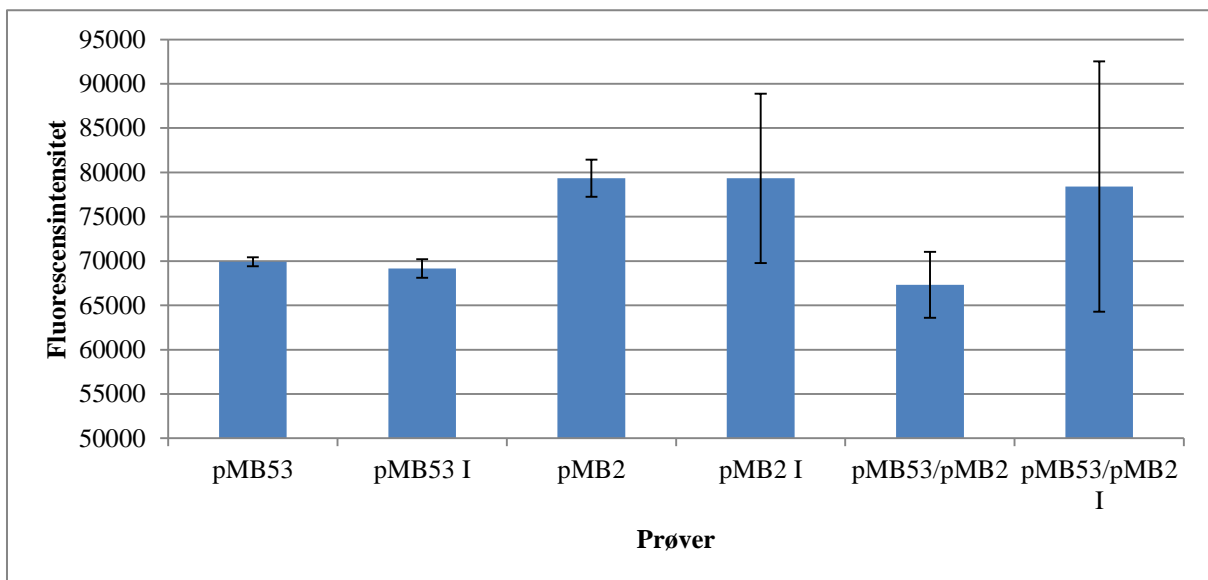
For å se om aptamerinsertet var ligert inn i plasmidet, ble det gjort en restriksjonssetetest med to uavhengige kloner (figur 22). Testen baseres på at ved kloning av aptamerfragmentet tilfører også *Bam*HI og *Eco*RI seter, som fører til linearisering av plasmidet ved restriksjon (se primer liste tabell 2). Samtidig mister plasmidet *Bsa*I setet under kloning, siden gjenkjenningssekvensene av de to *Bsa*I restriksjonssetene sitter på fragmentet som kuttes ut av plasmidet ved restriksjon. Figur 22 viser at plasmidet ble linearisert med både *Bam*HI (2, 7), *Eco*RI(3,8) og en kombinasjon av begge to (4,9). Etter *Bsa*I behandling (5,10) derimot forblir plasmidet sirkulært lik ubehandlet plasmid (11).



Figur 22: For å se om aptamerinsertet var ligert inn i plasmidet, ble det gjort en restriksjonssetetest. Forsøk på kutting med *Bam*HI, *Eco*RI og kombinasjon av de to lineariserte plasmidet fordi aptamer insertet som bærer disse restriksjonssetene er til stede. Derimot kan *Bsa*I behandling ikke linearisere plasmidet fordi gjenkjenningssekvensen kuttes ut under kloning. 1 =Invitrogen 1Kb ladder, 2 = *Bam*HI, 3 = *Eco*RI, 4 = *Bam*HI/*Eco*RI, 5 = *Bsa*I, 6 = ubehandlet pMB2 uten restriksjonszymer. 7 til 11 er samme oppsett av en annen klon.

3.4.4 Fluorescens i pMB53 og pMB2

Resultat av fluorescensmåling på pMB2 og pMB53 i BL21 kan ses på figur 23. Verdiene i tabellen er forholdene mellom vekst og fluorescens. De to første rekkene inneholder kun enkeltplasmidene, mens de fire siste inneholder kombinasjoner. Det er en mindre forskjell enn forventet i fluorescens, i de induserte og ikke-induserte som inneholder begge plasmidene. Standardavviket på de induserte bakteriene med kombinasjon av begge plasmider er høyt.



Figur 23: Resultat av fluorescensmåling på pMB2 og pMB53 i BL21. Verdiene i grafen er gjennomsnitt av ratio mellom vekst og fluorescens, med standardavvik.

3.4.5 Effekt av rifampicin og kanamycin på fluorescens i *E. coli* BL21 med pMB53 og pMB2

Selv om sensoren ikke virket å være funksjonell, ble den likevel testet i nærvær av antibiotika som påvirker transkripsjonen. Slik ble det sett hvordan den reagerte på Rifampicin, som inhiberer RNA syntese ved å inhibere RNA polymerase. Bakteriene ble tilsatt første, deretter Rifampicin/Kanamycin, så ble det ventet i 5 minutter før tilsetning av Tetracyclin. Tetracyclin er tilsatt til en sluttkonsentrasjon av 100µg/ml (tabell 7).

Tabell 7: pMB2 og pMB53 ble testet i nærvær av antibiotika som påvirker transkripsjonen. pMB53 og pMB2 ble testet alene og i kombinasjon. Det ble kjørt forskjellige konsentrasjoner av antibiotika, og rekker som var induserte med tetracyclin, og rekker som ikke var induserte. Rekkene som er merket med minus (-) inneholder ikke Tetracyclin/Rifampicin/Kanamycin, mens de med pluss (+) er indusert og/eller inkubert med antibiotika. Tetracyclin er tilsatt til en sluttkonsentrasjon av 100µg/ml

	pMB53			pMB2			pMB2/pMB53		
	TetO	AB	Rif. 500µg/ml	TetO	AB	Rif. 500µg/ml	TetO	AB	Rif. 500µg/ml
	.	.	58259	.	.	62174	.	.	62174
	.	+	1981	.	+	4640	.	+	4640
	+	.	61255	+	.	57136	+	.	57136
	+	+	1831	+	+	3574	+	+	3574
	.	.	62487	.	.	63753	.	.	63753
	.	+	2048	.	+	5296	.	+	5296
	+	.	65012	+	.	62193	+	.	62193
	+	+	1836	+	+	4667	+	+	4667
	.	.	54920	.	.	54010	.	.	54010
	.	+	2411	.	+	4900	.	+	4900
	+	.	56688	+	.	55234	+	.	55234
	.	.	56688	.	.	56377	.	.	56377
	.	+	2411	.	+	4900	.	+	4900
	.	.	54920	.	.	56051	.	.	56051
	.	+	2411	.	+	4900	.	+	4900
	+	.	56688	+	.	51777	+	.	51777
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	5268	+	.	5268
	.	.	1589	.	.	13287	.	.	13287
	.	+	1981	.	+	43836	.	+	43836
	+	.	61255	+	.	58960	+	.	58960
	+	+	1831	+	+	42290	+	+	42290
	.	.	62487	.	.	61780	.	.	61780
	.	+	2048	.	+	49190	.	+	49190
	+	.	65012	+	.	60092	+	.	60092
	+	+	1836	+	+	53126	+	+	53126
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	51364	+	.	51364
	.	.	1589	.	.	89957	.	.	89957
	.	+	1981	.	+	72128	.	+	72128
	+	.	61255	+	.	55852	+	.	55852
	+	+	1831	+	+	69265	+	+	69265
	.	.	62487	.	.	64485	.	.	64485
	.	+	2048	.	+	75895	.	+	75895
	+	.	65012	+	.	60092	+	.	60092
	+	+	1836	+	+	82791	+	+	82791
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	51364	+	.	51364
	.	.	1589	.	.	89957	.	.	89957
	.	+	1981	.	+	72128	.	+	72128
	+	.	61255	+	.	55852	+	.	55852
	+	+	1831	+	+	69265	+	+	69265
	.	.	62487	.	.	64485	.	.	64485
	.	+	2048	.	+	75895	.	+	75895
	+	.	65012	+	.	60092	+	.	60092
	+	+	1836	+	+	82791	+	+	82791
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	51364	+	.	51364
	.	.	1589	.	.	89957	.	.	89957
	.	+	1981	.	+	72128	.	+	72128
	+	.	61255	+	.	55852	+	.	55852
	+	+	1831	+	+	69265	+	+	69265
	.	.	62487	.	.	64485	.	.	64485
	.	+	2048	.	+	75895	.	+	75895
	+	.	65012	+	.	60092	+	.	60092
	+	+	1836	+	+	82791	+	+	82791
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	51364	+	.	51364
	.	.	1589	.	.	89957	.	.	89957
	.	+	1981	.	+	72128	.	+	72128
	+	.	61255	+	.	55852	+	.	55852
	+	+	1831	+	+	69265	+	+	69265
	.	.	62487	.	.	64485	.	.	64485
	.	+	2048	.	+	75895	.	+	75895
	+	.	65012	+	.	60092	+	.	60092
	+	+	1836	+	+	82791	+	+	82791
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	51364	+	.	51364
	.	.	1589	.	.	89957	.	.	89957
	.	+	1981	.	+	72128	.	+	72128
	+	.	61255	+	.	55852	+	.	55852
	+	+	1831	+	+	69265	+	+	69265
	.	.	62487	.	.	64485	.	.	64485
	.	+	2048	.	+	75895	.	+	75895
	+	.	65012	+	.	60092	+	.	60092
	+	+	1836	+	+	82791	+	+	82791
	.	.	54920	.	.	56551	.	.	56551
	.	+	2411	.	+	42648	.	+	42648
	+	.	56688	+	.	55200	+	.	55200
	.	.	54920	.	.	57435	.	.	57435
	.	+	2411	.	+	67659	.	+	67659
	+	.	56688	+	.	55674	+	.	55674
	.	.	54920	.	.	55520	.	.	55520
	.	+	2411	.	+	60281	.	+	60281
	+	.	56688	+	.	53643	+	.	53643
	.	.	54920	.	.	52673	.	.	52673
	.	+	2411	.	+	50432	.	+	50432
	+	.	1589	+	.	51364	+	.	51364
	.	.	1589	.	.	89957	.	.	89957
	.	+	1981	.	+	72128	.	+	72128
	+	.	61255	+	.	55852	+	.	55852
	+	+	1831	+	+	69265	+	+	69265
	.	.	62487	.	.	64485	.	.	64485

3.4.5.2 Sammenligning av Metanol og Rifampicin.

For å sjekke at forskjellene i fluorescens mellom prøvene med Rifampicin, og de uten ikke skyldtes metanolen i rifampicin, ble det kjørt et forsøk der de to ble sammenlignet. Det ble brukt BL21(DE3) med plasmidet pMB53. I tabell 8 kan det ses at det er rifampicinen i seg selv, og ikke metanolen den er løst i som hemmer fluorescensen.

Tabell 8: Sammenligning av metanol og rifampicin. Metanol er tilsatt i samme mengde som rifampicin er tilsatt i de parallelle prøvene. Det kan det ses at det er rifampicinen i seg selv, og ikke metanolen den er løst i som hemmer fluorescensen. Det ble brukt BL21(DE3) med plasmidet pMB53.

	Kun bakterier	Metanol	Rifampicin
Rif. 500µg/ml	215891	224566	11294
Rif. 250 µg/ml	217120	221813	15335
Rif. 125µg/ml	217568	217741	21357
Rif. 62,5µg/ml	222576	226616	29969
Rif. 31µg/ml	223452	230901	74865
Rif. 15µg/ml	219795	213283	212961

4. Diskusjon

I dette prosjektet var hovedmålet å designe og lage en cellebasert assay som kunne avdekke intracellulære virkningsmåter i bakterier, som var behandlet av antibiotiske forbindelser av sekundære metabolitter eller av protein eller peptid natur. I denne sammenhengen var det viktig å evaluere hvilke reporter gener som vil være best egnet til biosensorer basert på *E. coli*.

4.1 Rødt fluorescerende proteiner til bruk i biosensorer basert på *E. coli*

Starten på masteroppgaven innebar å velge rett stamme av *E. coli* som uttrykte fluorescerende farge med høyest mulig intensitet etter induksjon. Dette ble gjort ved at fluorescensen til mCherry og dsRed ble sammenlignet i tre forskjellige stammer av *E. coli*; DH5 α , HB101 og BL21. Den sistnevnte stammen ble valgt for å kunne uttrykke mCherry konstruktet som var basert på uttrykk ved hjelp av T7 polymerase som ikke finnes i de to andre *E. coli* stammene som ble brukt. Generelt sett ble det funnet relativt stor forskjell i fluorescensen til mCherry og dsRed, men jevnt over viste mCherry den høyeste fluorescensintensitet i alle stammene. Unntak var stammen HB101 hvor dsRed fluorescerte mest.

Tidligere studier som sammenlignet fluorescensen til de samme fluorescerende proteinene viser at DsRed har en sterkere fluorescens enn mCherry, og fluorescerer nesten 4 ganger så kraftig ved full modning av proteinet (Shaner, Campbell et al. 2004). Den store fordelene med mCherry er derimot at det er en veldig stabil monomer hvor 50 % av modningen skjer innenfor 15 minutt, mens det tar 10 timer i DsRed. DsRed brukt i denne oppgaven er en litt forbedret versjon som heter DsRed Express, som skal modne forttere. Det er utviklet flere varianter av DsRed for hurtigere modning (Bevis and Glick 2002), likevel er modningstiden flere timer.

I denne oppgaven ble det funnet forskjeller fra 44 (ikke induert) til 125 ganger forskjell i fluorescens mellom de to. Men i dette tilfellet var det mCherry som fluorescerte sterkere enn DsRed. Dette kan komme av flere ting. For det første kan vekstbetingelser som temperatur og oksygentilførsel påvirke modningstiden til dsRed og ville dermed fremme fluorescensen til den hurtigere modnende mCherry. I tillegg har de to fluorescerende proteinene forskjellige eksisjons og emisjonspekter og er dermed ikke direkte sammenlignbare. Et viktig poeng er også at de to plasmidene som proteinene uttrykkes fra, bruker forskjellige promotor-operator konstrukter som regulerer uttrykket av proteinene, dermed vil også uttrykket av proteinene

varierte. Uavhengig av variablene som påvirker fluorescensen viste det seg at mCherry er bedre egnet til bruk under de forholdene som biosensoren skal brukes.

Videre er det BL21 som ser ut til å ha uttrykt mCherry best, selv om de andre stammene er i stand til å amplifisere plasmidene i store mengder, mangler de T7 polymerasen til å transkribere dem. I BL21 var fluorescensen bare litt høyere med større konsentrasjoner av IPTG, mens Arabinose ikke økte ekspresjonsnivået. Dette indikerer derfor at det ville være mulig å bruke arabinose-basert og IPTG-basert induksjon samtidig for å styre uavhengige uttrykk av to forskjellige biosensorer i en bakteriecelle. Kombinasjoner av *lac* operator og araBAD promotorer har også blitt brukt tidligere for å kunne styre to prosesser uavhengig av hverandre, f. eks til å finjustere arabinosebasert regulering (Khlebnikov, Risa et al. 2000).

Modningstiden til dsRed er mellom 24 og 48 timer (Pfleger, Fawzi et al. 2005), dette kan forklare hvorfor forskjellen ble enda større, siden målingene i denne oppgaven ble gjort kun ni timer etter indusering. Plasmidet med dsRed inneholder en operator som induseres med arabinose (ParaBAD i pBAD*RFPEC2), mens plasmidet med mCherry induseres med IPTG (T7-promotor som krever T7-polymerase og en *lac* operator som kan induseres vha. IPTG i BL21). I tidligere forsøk har dsRed i pBAD*RFPEC2 vært uttrykt i *E. coli* DH10B som har en araD139 Δ (ara leu) genotype. Dette betyr at stammen ikke kan bryte ned Arabinose og dermed vil opprettholde induksjonen over lengre tid (Pfleger, Fawzi et al. 2005), noe som muligens ville gitt et bedre uttrykk. BL21 inneholder T7-polymerase og er nødvendig for å indusere T7-promotoren som ligger på plasmidet med mCherry, derfor var det forventet at uttrykket av mCherry ville være best i BL21. Det var også forventet at det derfor skulle være bedre uttrykk av mCherry i de BL21-stammene som ble indusert med IPTG, men det var nesten ingen relativ induksjon fra vann til IPTG tilsetning. Dette kan skyldes T7 promotorkonstruktet som ikke virker til å være tett. Forskjellen i fluorescens mellom IPTG og arabinose indusert mCherry i BL21 var noe liten på de lavere konsentrasjonene, dette kan tyde på at promotorene ikke er tett under de betingelser som er benyttet for dyrkning, siden promotoren på plasmidet med mCherry ikke skal kunne induseres med arabinose.

I denne oppgaven ble det benyttet *E. coli* BL21(DE3) som inneholder T7 RNA polymerase, og dermed kan uttrykke genene fra plasmidet med mCherry (Studier and Moffatt 1986). Et slikt system vil aldri være helt tett, og dette kan føre til at man får en høyere bakgrunn på prøvene som ikke er indusert. En mulighet for å hindre bakgrunns-uttrykkingen er å benytte stammer med T7-lysozym som inaktiverer T7-promotoren og hindrer uttrykk av proteinet når

den ikke er indusert, et eksempel på en slik stamme er *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Studier 1991).

På bakgrunn av resultatene var det naturlig å bruke mCherry videre i oppgaven, siden den ga best fluorescens, og var lettest å indusere. Den ble derfor amplifisert og ligert inn i pTrcHis2TOPO. Bakgrunnen for å ligere konstruktet inn i dette plasmidet, er at det er uavhengig av T7 polymerase.

Amplifiseringen av mCherry ved PCR var vellykket, og dette kan ses på figur 13 ved at et bånd som samsvarer med forventet størrelse av mCherry ble detektert. Det ble gjort flere kjøringar av PCR, før den ble vellykket. Grunnen til dette var sannsynligvis at polymerasene som ble benyttet ikke fungerte slik de skulle, men amplifisering fungerte da det ble benyttet nye enzymer. Resultatet av amplifiseringen, som kan ses på gelbildet, kan ikke være andre konstrukt enn mCherry, siden det kun ble brukt primere designet kun for denne, og størrelsen i tillegg stemmer overens med det som var forventet.

Kloningen av mCherry i pTrcHis2TOPO var relativt enkel å gjennomføre siden vektoren var levert lineær med 3-prime thymidine overheng og allerede aktivert med topoisomerase. En ulempe med dette kan imidlertid være at insertet kan havne i feil orientering i forhold til promotoren, men sekvensering bekreftet at dette ble riktig. Sekvenseringresultatene som er vist i figur 16 viser at denne klonen er den ønskede orientering uten mutasjoner i sekvensen. Det var totalt 16 kloningsprøver, og det var kun nummer 11 som var vellykket. Dette illustrerer at det er svært viktig at flere paralleller gjennomføres ved slike kloninger, slik at arbeidet unngås å måtte gjøres om igjen.

DH5 α og BL21 ble transformert med det nye plasmidet pMB1, og det ble observert at koloniene på agarplater var rød. Dermed kan det konkluderes med at det nye plasmidet kan brukes til å uttrykke mcherry. Det kan være hensiktsmessig å kombinere pMB1 med en biosensorer som har andre deteksjonsegenskaper. En måte å gjøre dette på kan være en kromosomal integrasjon av promotor – mCherry konstruktet fra pMB1. Ved å ligere mCherry inn i pTrcHis2TOPO, ble den plassert mellom *lacI* og *lacZ*. Disse er også tilstedet i kromosomet til *E. coli*, og teorien var at det kunne inkorporeres mellom disse genene. Det ble også bestilt primere til dette formålet, men de ble aldri benyttet da forsøkene med split-GFP viste seg å være tidkrevende. Tidligere forsøk har integrert PCR-produkter i kromosomet til *E. coli* ved å bruke oligonukleotider homolog til sekvensen hvor de skal integreres (Datsenko and Wanner 2000).

Reportergener som koder for rødt fluorescerende proteiner, ser ut til å egne seg godt til bruk i biosensorer i komplekse medier med bakgrunnsfluorescens slik som LB og MH-medium.

4.2 Split-GFP i biosensorer

Plasmidene som var bestilt fra Natalie Broude i Boston (Borogovac and Broude 2011), ble testet for fluorescens etter mottak. Det var forventet at disse skulle fluorescere dersom aptameret ble uttrykket samtidig med split proteinene. Dette viste seg derimot ikke å være så enkelt som forutsett, og endte opp med å være den mest tidkrevende prosessen under hele denne oppgaven. I utgangspunktet ble det forsøkt å benytte de samme dyrkningsbetingelsene (20 °C over natt) som var brukt i Borovac og Broude sin artikkel (2011). Fluorescensmålingene etter denne dyrkningen ga imidlertid ingen forskjell i fluorescens mellom kontroll og sensorstammen. Det ble derfor forsøkt å bruke varmeskap på 37 °C, som er mest vanlig å bruke i dyrkningen av *E. coli*, men fremdeles var det ikke mer fluorescens i prøvene med plasmider, enn i de negative kontrollene. Det ble mistenkt at dette kunne skyldes autofluorescensen til LB-mediet som gjemmer signalet, og derfor ble dyrkningen vasket i 1x PBS buffer for å vaske denne bort, før målingene, dessverre ga ikke dette heller andre resultater. Det ble også forsøkt med M9-medium, men det var vanskelig å få stammene til i det hele tatt å vokse med dette mediet, noe som muligens kan skyldes manglende thiamin (vitamin B1) i mediet. Etter at alle forsøk å få fluorescens fra konstruktet mislyktes ble plasmidet sekvensert, for å sjekke om det faktisk var de riktige plasmidene som ble brukt.

Det viste seg at sekvensen til pMB53 manglet de aptamerbindende halvdelene eIF4A som binder til aptameret. Samtidig viste dette at manglende fluorescens ikke ble forårsaket av vekstbetingelsene. Mest sannsynlig skjedde det en forveksling i labben til Broude under alikvotering. Plasmidet som ble sendt virket å være et kontrollkonstrukt til å evaluere fluorescens til GFP halvdelene uten de aptamerbindende halvdelene. Målingene med dette feilaktige konstruktet viste at GFP halvdelene ikke binder til hverandre spontant og kan dermed være egnet til å detektere interaksjon av andre proteinhalvdeler de er koblet til. Etter denne hendelsen ble alle mottatte plasmider sekvensert for å unngå problemer senere i arbeidet.

Etter at Broude verifiserte sekvensfeilen i plasmidsamlingen sin, sendte de et nytt plasmid som også ble sekvensert en gang til med det samme den ankom NFH. Som det kan sees på sammenligningen i figur 18, stemte sekvensen denne gang og det var mulig å gå videre til testingen av fluorescens.

Målingene med den nye utgaven av pMB53 viste seg å stemme bedre overens med det som var forventet. Det var nå omtrent dobbelt så sterk fluorescens fra bakteriene som inneholdt begge plasmider i forhold til bakteriene med negativ kontroll. Dette gjaldt målingene hvor pMB53 var i kombinasjon med pMB84, pMB99 og pMB114. De siste nevnte plasmidene kodet for aptamer-merket RNA, men med forskjellige operatører/promotører. pMB114 inneholdt T7-promotoren. Hensikt var ikke å bruke disse promotorene, men å koble transkripsjonen av aptameret til et isolert signalmolekyl og ikke til IPTG som driver ekspresjon av reporterkonstruktet.

Fremdeles var bakgrunnen veldig stor. Dette kan skyldes at bakteriene selv fluorescerer rundt de samme bølglengdene som GFP og at autofluorescens fra LB-mediet også er tilstedet (Knight and Billinton 2001), dette kan blant annet ses i tabell 5 hvor LB mediet alene fluorescerer relativt sterkt. Ideelt burde bakgrunnen være mye mindre enn halvparten, for at en eventuell assay skal være lett og enkel å bruke. Dette kan muligens løses ved å benytte andre medier eller ved å erstatte GFP halvdelene med fluorescerende proteiner av en annen farge. Alternativt kunne det brukes luciferase som da vil unngå problemet med autofluorescens fullstendig siden bakteriene i assayen vil kunne produsere lys kun hvis luciferase halvdelene binder til hverandre (Villalobos, Naik et al. 2010). Slike split-luciferaser eksisterer til og med i forskjellige farger og ville muliggjøre konstruksjon av like avanserte biosensorer som fluorescerende proteiner uten å være begrenset av modningstid. Likevel har også luciferaser ulemper. En ulempe er at lysproduksjonen varierer ikke bare med uttrykk, men også med metabolsk aktivitet av bakteriene de uttrykkes i (Galluzzi and Karp 2007).

Det var ingen forskjell i uttrykk mellom de forskjellige konsentrasjonene med IPTG, og det var også nesten like høy fluorescens i de prøvene som ikke var induisert. Dette kan tyde på at promotorene ikke er tett under de betingelser som er benyttet for dyrkning. I denne oppgaven ble det benyttet *E. coli* BL21(DE3) som inneholder T7 RNA polymerase, slik som i pMB1 med mCherry (Studier and Moffatt 1986). Dette vil imidlertid kun gi bedre uttrykk under innledende uttesting av sensoren. For at sensoren skal kunne brukes til testing av nyoppdagede antimikrobielle peptider, må den inkorporeres i villtyper av *E. coli* som ikke er like degenererte som laboratoriestammer. Dermed må man benytte seg av andre systemer for induksjon av RNA og protein produksjon. I dette tilfellet var det ønskelig å kombinere denne sensoren med en annen som induseres av IPTG, og det var derfor ønskelig at denne kunne induseres på annen måte, og muligens også med en tettere operator.

4.3 Utkobling av aptamertranskripsjon

Aptamersekvensen ble hentet fra Valencia-Burton (2007) og konstruert ved hjelp av ferdig bestilte oligonukleotider som ble annelet til hverandre og kan ses som nummer 4 i figur 20 (Valencia-Burton, McCullough et al. 2007). Disse ble amplifisert og deretter ligert inn i plasmidet pASK-IBA3plus. Dette plasmidet inneholder en promotor/operator som kan induseres med tetracyclin. På figur 19 og 20 kan man se resultatet av dette. Plasmidet ble kuttet med *BsaI*, og dermed var ligasjonen retningsbestemt siden *BsaI* tilhører restriksjonenzymklasse II, som betyr at gjenkjennelsessekvensen til *BsaI* (GGTCTC) er adskilt fra kuttasetet med et basepar (den er ikke palindromisk). Hvis regionene rundt kuttasetet er forskjellig vil kloningen være retningsbestemt. Det var sannsynlig at ligeringen var vellykket, da det var 200 ganger så mange kloner fra ligasjonen som fra kun plasmidet. Ved hjelp av restriksjonsanalyser ble korrekt integrasjon av aptameret verifisert. Kuttasetet som ble introdusert av ligasjonen ble påvist, mens *BsaI* setene ikke lenger var til stede.

Resultatet fra fluorescensmålingene av pMB2 og pMB53 kan sees i figur 23. Denne viser at indusering av bakteriene med en kombinasjon av plasmidene har noe effekt, men det er like høy fluorescens fra pMB2. Imidlertid ble det kun kjørt 16 paralleller av kombinasjonen pMB2 og pMB53, og stammene med kun enkeltplasmider ble kun kjørt i fire paralleller. Siden det var så få paralleller, men stor spredning ble standardavviket veldig høyt, og resultatene kan derfor ikke anses som statistisk relevant.

Dette er til dels samsvarende med målingene som ble gjort med den nye utgaven av pMB53 og pMB114. Det er sterkere fluorescens fra bakteriene som inneholdt begge plasmider i forhold til bakteriene med negativ kontroll. Fremdeles var bakgrunnen veldig stor. Dette er nok fremdeles på grunn av at bakteriene selv fluorescerer rundt de samme bølgelengdene som GFP og at autofluorescens fra LB-mediet også er tilstedet. For at assayet skal være enkelt å lese resultater fra, burde bakgrunnen være mye mindre enn halvparten (Billinton and Knight 2001).

Dette kan muligens løses ved å benytte andre medier, som har mindre autofluorescens. Tidligere forsøk har også vist at LB medium egner seg dårlig når det skal måles fluorescens fra GFP, på grunn av høy og variabel bakgrunnsfluorescens (Billinton and Knight 2001; Knight and Billinton 2001; Lissimore, Bayes et al. 2009). MH-medium er i bruk i MIC-assayet som kjøres ved instituttet, og kan være et alternativ til LB-medium. MH-medium er i liket med LB-medium, et kompleks medium og det er trolig at det vil gi samme bakgrunnsfluorescens. Dersom man får *E. coli* stammene til å vokse i M9-medium kan det

være et godt alternativ da det er blankt. Dette kan sannsynligvis gjøres ved tilsetning av tiamin (vitamin b1). Det er ønskelig å kjøre denne assayen i MH-medium, slik at den kan kombineres med MIC-assayen som allerede er i bruk ved instituttet. Bruk av andre medier som for eksempel M9-medium, vil gi andre vekstbetingelser og forutsetninger og dermed forårsake andre resultater.

I publikasjonen til Valencia-Burton, McCullough et al. 2007 ble det også brukt LB-medium til dyrkningen av bakteriene. Det nevnes ikke problemer med bakgrunnsfluorescens i publikasjonen. Grunnen til dette er at de brukte et flowcytometer som måler fluorescensen fra hver enkelt celle, og ikke hele løsningen (Borogovac and Broude 2011). Det var tenkt å bruke et flowcytometeret i denne oppgaven også, men apparatet var enda ikke installert ved instituttet før oppgaven ble avsluttet. Sannsynligvis vil det være mulig å øke fluorescensen ved å kjøre alle deler av eksperimentet på romtemperatur, slik som det ble gjort av Valencia-Burton (2007).

Et annet alternativ kan være å erstatte de to GFP halvdelene med fluorescerende proteiner av en annen opprinnelse, slik at de ikke havner i samme spekter som mediet. Det finnes mange forskjellige luciferaser, og insektluciferaser kan splittes og brukes i blant annet protein-protein interaksjoner (Ozawa, Kaihara et al. 2001). Det ble i utgangspunktet bestilt primere for å erstatte GFP med luciferaser, men da plasmidene ikke så ut til å fungere i utgangspunktet ble det fokusert på å få det eksisterende systemet til å fungere. Split luciferaser er allerede tatt i bruk i flere forsøk, og burde også kunne kombineres i denne sensoren (Huang, Choi et al. 2010; Deng, Wang et al. 2011; Ataei, Torkzadeh-Mahani et al. 2013).

4.3.6 Virkning av Rifampicin på fluorescens i *E. coli*

Selv om sensoren ikke virket å være funksjonell, ble den likevel testet i nærvær av antibiotika som påvirker transkripsjonen. Slik ble det sett hvordan den reagerte på rifampicin, som inhiberer RNA syntese ved å inhibere RNA polymerase. Bakteriene ble tilsatt første, deretter rifampicin/kanamycin, så ble det ventet i 5 minutter før tilsetning av Tetracyclin. Dette kan ses i tabell 6.

Det ser ut som at Rifampicin hadde stor effekt på samtlige prøver, og både de med kombinasjon av pMB2 og pMB53, og de stammen med kun enkle plasmider ble inhibert på alle konsentrasjoner, mens kanamycin tilsynelatende ikke hadde noen effekt. For å være sikker på at inhiberingen ikke skyldtes metanolen som Rifampicin er løst i, ble det kjørt en test for å utelukke dette. Testen viste at Metanol ikke hadde noen effekt på egenhånd, i samme konsentrasjoner som det rifampicin var løst i. Hva slags effekt Rifampicin har på fluorescensen og autofluorescensen til prøvene er dermed uklart. En forklaring kunne likevel være fluorescens quenching, en prosess der en substans reduserer fluorescensen til en annen substans. Det er beskrevet at rifampicin quencher fluorescensen til “CdTe/ZnS QD”, en prosess som kan brukes for å analysere rifampicin konsentrasjoner (Liu, Yin et al. 2012). Muligens foregår en lignende prosess når Rifampicin tilsettes *E. coli* celler i LB-medium. Dette ville kunne forklare hvorfor både autofluorescensen og GFP fluorescensen reduseres sterkt etter tilsetning av Rifampicin, avhengig av hvilken konsentrasjon som tilsettes.

Oppsummering og videre arbeid

Hovedhensikten med masteroppgaven var å lage nye tester som kan karakterisere virkningsmekanismen til antibakterielle peptider eller andre antibiotiske forbindelser.

Dette skulle oppnås ved å designe en biosensor som kan detektere påvirkning av transkripsjon, en biosensor som kan detektere påvirkning av translasjonen, og forsøke å kombinere de to i en og samme sensor.

Målene ble kun delvis nådd, og det gjenstår enda en del arbeid for ferdigstilling av biosensorene.

7. Referanser

Alanis, A. J. (2005). "Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?" Archives of Medical Research **36**(6): 697-705.

Angers-Loustau, A., J. Rainy, et al. (2007). "PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories." BMC molecular biology **8**(1): 77.

Ataei, F., M. Torkzadeh-Mahani, et al. (2013). "A novel luminescent biosensor for rapid monitoring of IP3 by split-luciferase complementary assay." Biosensors and Bioelectronics **41**(0): 642-648.

Batista, T. M. and J. T. Marques (2011). "RNAi pathways in parasitic protists and worms." J Proteomics **74**(9): 1504-1514.

Becker, W. M., L. J. Kleinsmith, et al. (2006). The world of the cell. San Francisco, CA, Benjamin Cummings.

Bevis, B. J. and B. S. Glick (2002). "Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)." Nat Biotechnol **20**(1): 83-87.

Billinton, N. and A. W. Knight (2001). "Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence." Anal Biochem **291**(2): 175-197.

Binkowski, B., F. Fan, et al. (2009). "Engineered luciferases for molecular sensing in living cells." Current Opinion in Biotechnology **20**(1): 14-18.

Borogovac, A. and N. E. Broude (2011). Visualization of Induced RNA in Single Bacterial Cells. RNA Detection and Visualization, Springer: 189-199.

Boucher, H. W., G. H. Talbot, et al. (2009). "Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America." Clinical Infectious Diseases **48**(1): 1-12.

Boutin, P., C. Wahl, et al. (2000). "Big Dye™ terminator cycle sequencing chemistry: Accuracy of the dilution process and application for screening mutations in the TCF1 and GCK genes." Hum Mutat **15**(2): 201-203.

Capelastegui, A., P. P. España, et al. (2010). "Study of community-acquired pneumonia: Incidence, patterns of care, and outcomes in primary and hospital care." Journal of Infection **61**(5): 364-371.

Carroll, P., D. N. Muttucumaru, et al. (2005). "Use of a tetracycline-inducible system for conditional expression in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*." Appl Environ Microbiol **71**(6): 3077-3084.

Cars, O., L. D. Hogberg, et al. (2008). "Meeting the challenge of antibiotic resistance." British Medical Journal **337**(7672).

Chain, E., H. W. Florey, et al. (1940). "PENICILLIN AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT." The Lancet **236**(6104): 226-228.

Cockburn, J. and S. Pit (1997). "Prescribing behaviour in clinical practice: patients' expectations and doctors' perceptions of patients' expectations--a questionnaire study." BMJ: British Medical Journal **315**(7107): 520.

Colombo, T. E., M. M. C. N. Soares, et al. (2012). "Identification of fungal diseases at necropsy." Pathology - Research and Practice **208**(9): 549-552.

commons, w. Retrieved 15.05, 2013, from http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biosensor_System.jpg.

D'Souza, S. F. (2001). "Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications." Appl Biochem Biotechnol **96**(1-3): 225-238.

Daber, R., S. Stayrook, et al. (2007). "Structural Analysis of Lac Repressor Bound to Allosteric Effectors." J Mol Biol **370**(4): 609-619.

Dale, J. W., Park, Simon F. (2004). Molecular genetics of bacteria.

Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(12): 6640-6645.

Deng, Q., D. Wang, et al. (2011). "Application of a split luciferase complementation assay for the detection of viral protein–protein interactions." J Virol Methods **176**(1–2): 108-111.

ECDC/EMA (2009). "ECDC/EMA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react." Retrieved 19.02, 2013, from http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=44.

Freire-Moran, L., B. Aronsson, et al. (2011). "Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—Time to react is now." Drug Resistance Updates **14**(2): 118-124.

Furman, J. L., A. H. Badran, et al. (2009). "Systematic evaluation of split-fluorescent proteins for the direct detection of native and methylated DNA." Bioorg Med Chem Lett **19**(14): 3748-3751.

Galluzzi, L. and M. Karp (2007). "Intracellular redox equilibrium and growth phase affect the performance of luciferase-based biosensors." J Biotechnol **127**(2): 188-198.

Griffiths, A. J. F., Wessler, Susan R., Lewontin, Richard C., Carroll, Sean B. (2008). Introduction to genetic analysis.

Guillemot, D. (1999). "Antibiotic use in humans and bacterial resistance." Curr Opin Microbiol **2**(5): 494-498.

Hall, T. (2011). Bioedit v7. 1.3.

Hancock, R. E. W. and G. Diamond (2000). "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences." Trends in Microbiology **8**(9): 402-410.

Hancock, R. E. W. and R. Lehrer (1998). "Cationic peptides: a new source of antibiotics." Trends in Biotechnology **16**(2): 82-88.

handelsdepartementet, N.-o. (2008). "St.meld. nr. 7 (2008-2009) Et nyskape og bærekraftig Norge." Retrieved 23.02, 2013, from <http://www.regjeringen.no/nb/dep/nhd/dok/regpubl/stmeld/2008-2009/stmeld-nr-7-2008-2009-.html?id=538010>.

Haug, T., A. K. Kjuul, et al. (2002). "Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea)." Journal of Invertebrate Pathology **81**(2): 94-102.

Heinemann, J. A., R. G. Ankenbauer, et al. (2000). "Do antibiotics maintain antibiotic resistance?" Drug Discovery Today **5**(5): 195-204.

Huang, H., S.-Y. Choi, et al. (2010). "A quantitative assay for mitochondrial fusion using *Renilla luciferase* complementation." Mitochondrion **10**(5): 559-566.

Ivnitski, D., I. Abdel-Hamid, et al. (1999). "Biosensors for detection of pathogenic bacteria." Biosensors and Bioelectronics **14**(7): 599-624.

Jiang, Y., X. Fang, et al. (2004). "Signaling aptamer/protein binding by a molecular light switch complex." Anal Chem **76**(17): 5230-5235.

Khlebnikov, A., Ø. Risa, et al. (2000). "Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture." J Bacteriol **182**(24): 7029-7034.

Kindrachuk, J., A. Nijnik, et al. (2010). 5.07 - Host Defense Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. Comprehensive Natural Products II. M. Editors-in-Chief: Lew and L. Hung-Wen. Oxford, Elsevier: 175-216.

Knight, A. W. and N. Billinton (2001). "Distinguishing GFP from cellular autofluorescence." Biophotonics International **8**(7): 42-51.

Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nat Rev Microbiol **8**(6): 423-435.

Lepape, A., D. L. Monnet, et al. (2009). "Experience of European Intensive Care Physicians with Infections Due to Antibiotic-Resistant Bacteria, 2009." Eurosurveillance **14**(45): 4-6.

Li, C., H.-M. Blencke, et al. (2010). "Two recombinant peptides, SpStrongylocins 1 and 2, from *Strongylocentrotus purpuratus*, show antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria." Developmental & Comparative Immunology **34**(3): 286-292.

Ligon, B. L. (2004). "Penicillin: its discovery and early development." Seminars in Pediatric Infectious Diseases **15**(1): 52-57.

Lissemore, J. L., J. Bayes, et al. (2009). "Green fluorescent protein is superior to blue fluorescent protein as a quantitative reporter of promoter activity in *E. coli*." Molecular biology reports **36**(5): 1107-1112.

Liu, Z., P. Yin, et al. (2012). "Determination of rifampicin based on fluorescence quenching of GSH capped CdTe/ZnS QDs." Journal of Luminescence.

Liverani, M. and R. Coker (2012). "Protecting Europe from Diseases: From the International Sanitary Conferences to the ECDC." Journal of Health Politics Policy and Law **37**(6): 915-934.

Macfarlane, J., W. Holmes, et al. (1997). "Influence of patients' expectations on antibiotic management of acute lower respiratory tract illness in general practice: questionnaire study." BMJ: British Medical Journal **315**(7117): 1211.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2009). Brock biology of microorganisms.

Marshall, O. J. (2004). "PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR." Bioinformatics **20**(15): 2471-2472.

Mishra, B., G. D. Leishangthem, et al. (2013). "A novel antimicrobial peptide derived from modified N-terminal domain of bovine lactoferrin: Design, synthesis, activity against multidrug-resistant bacteria and Candida." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1828**(2): 677-686.

Monaghan, R. L. and J. F. Barrett (2006). "Antibacterial drug discovery—Then, now and the genomics future." Biochemical Pharmacology **71**(7): 901-909.

Morens, D. M., G. K. Folkers, et al. (2010). "The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases (vol 430, pg 242, 2004)." Nature **463**(7277): 122-122.

Nathanson, N., K. A. McGann, et al. (1993). "The evolution of virus diseases: their emergence, epidemicity, and control." Virus Research **29**(1): 3-20.

Nelson, D. L. and M. M. Cox (2005). Lehninger Principles of Biochemistry

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2012). "Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." Journal of Natural Products **75**(3): 311-335.

Niederman, M. S. (2006). PNEUMONIA | Community Acquired Pneumonia, Bacterial and Other Common Pathogens. Encyclopedia of Respiratory Medicine. J. L. Geoffrey and D. S. Steven. Oxford, Academic Press: 417-431.

Nordmann, P., G. Cuzon, et al. (2009). "The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria." Lancet Infectious Diseases **9**(4): 228-236.

NTNU (2003). "Recombinant DNA technology." Retrieved 15th february, 2013, from <http://boneslab.bio.ntnu.no/Bi211/Bi211Kap8-03.html>.

Ozawa, T., A. Kaihara, et al. (2001). "Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing." Anal Chem **73**(11): 2516-2521.

Paulsen, V. S., H.-M. Blencke, et al. (2013). "Structure-Activity Relationships of the Antimicrobial Peptide Arasin 1—And Mode of Action Studies of the N-Terminal, Proline-Rich Region." PLoS One **8**(1): e53326.

Pfleger, B. F., N. J. Fawzi, et al. (2005). "Optimization of DsRed production in Escherichia coli: effect of ribosome binding site sequestration on translation efficiency." Biotechnol Bioeng **92**(5): 553-558.

QIAGEN (2008). "MiniElute Handbook." Retrieved 09.05, 2013, from <http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={FA2ED17D-A5E8-4843-80C1-3D0EA6C2287D}&lang=en&ver=1>.

QIAGEN (2012). "qiaPREP Miniprep Handbook." Retrieved 09.05, 2013, from <http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={89BFA021-7310-4C0F-90E0-6A9C84F66CEE}&lang=en&ver=1>.

Roberts, R. J. and N. E. Biolabs (1998). Rebase: the restriction enzyme database, New England Biolabs.

Shaner, N. C., R. E. Campbell, et al. (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein." Nat Biotechnol **22**(12): 1567-1572.

Shaner, N. C., P. A. Steinbach, et al. (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nat Methods **2**(12): 905-909.

Shea, K. M., C. o. E. Health, et al. (2004). "Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics." Pediatrics **114**(3): 862-868.

Singh, V. and S. Aneja (2011). "Pneumonia - management in the developing world." Paediatr Respir Rev **12**(1): 52-59.

Sperstad, S. V., T. Haug, et al. (2009). "Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*." Developmental & Comparative Immunology **33**(4): 583-591.

Studier, F. W. (1991). "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system." J Mol Biol **219**(1): 37-44.

Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.

Svenson, J. (2012). "MabCent: Arctic marine bioprospecting in Norway." Phytochemistry Reviews: 1-12.

Tadesse, M., B. Gulliksen, et al. (2008). "Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway." Journal of Invertebrate Pathology **99**(3): 286-293.

Teutsch, S. (2009). "Reforming Disease Prevention and Health Promotion: Population Health." Retrieved 12th February, 2013, from <http://www.ahrq.gov/about/annualconf09/teutsch.htm>.

Torkzadeh-Mahani, M., F. Ataei, et al. (2012). "Design and development of a whole-cell luminescent biosensor for detection of early-stage of apoptosis." Biosensors and Bioelectronics **38**(1): 362-368.

Trincone, A. (2010). "Potential biocatalysts originating from sea environments." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **66**(3-4): 241-256.

Urban, A., S. Eckermann, et al. (2007). "Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery." Appl Environ Microbiol **73**(20): 6436-6443.

Valencia-Burton, M., R. M. McCullough, et al. (2007). "RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation." Nat Methods **4**(5): 421-427.

Villalobos, V., S. Naik, et al. (2010). "Dual-color click beetle luciferase heteroprotein fragment complementation assays." Chem Biol **17**(9): 1018-1029.

Weber, C. C., N. Link, et al. (2005). "Broad-spectrum protein biosensors for class-specific detection of antibiotics." Biotechnol Bioeng **89**(1): 9-17.

WHO (2004). "THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE."

WHO (2004). "The world health report 2004 - changing history." from <http://www.who.int/whr/2004/en/>.

Wilson, K., Walker, John. (2000). Practical Biochemistry: Principles and Techniques. Cambridge, Cambridge University press.

Wise, R. and E. J. Soulsby (2002). "Antibiotic resistance--an evolving problem." Vet Rec **151**(13): 371-372.

Appendix

Appendix 1: Fullstendig sekvens av pMB53

Help

Related Applications

Pairwise Sequence Alignment

Multiple Sequence Alignment

EBI Tools Pairwise Sequence Alignment EMBOSS Needle

EMBOSS Needle - Alignment

Alignment

Submission Details

Submit Another Job

Alignment

View Alignment File

```
# Program: needle
```

```
# Rundate: Fri 15 Feb 2013 09:25:27
```

```
# Commandline: needle
```

```
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_needle-I20130215-092514-0171-31361377-pg.asequence
# -bsequence emboss_needle-I20130215-092514-0171-31361377-pg.bsequence
# -datafile EDNAFULL
# -gapopen 10.0
# -gapextend 0.5
# -endopen 10.0
# -endextend 0.5
# -aformat3 pair
# -snucleotide1
# -snucleotide2
```

```
# Align_format: pair
```

```
# Report_file: stdout
```

```
#=====
```

```
#
```

```
# Aligned_sequences: 2
```

```
# 1: pMB33
```

```
# 2: pMB"53"
```


pMB"53" 400	351	GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
pMB33 450	401	GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
pMB"53" 450	401	GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
pMB33 500	451	CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA
pMB"53" 500	451	CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA
pMB33 550	501	TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
pMB"53" 550	501	TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
pMB33 600	551	AAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
pMB"53" 600	551	AAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
pMB33 650	601	GCAGGGATCCTCTGGATCTTCGGGTTCTGGTAGCATGGAGCCGGAAGGCG
pMB"53" 635	601	GCAGGGATCCTCTGGATCTTCGGGTTCTGGTAGCA-----
pMB33 700	651	TCATCGAGAGTAACTGGAACGAGATTGTGGATAGCTTTGATGACATGAAT
pMB"53" 635	636	-----
pMB33 750	701	CTCTCAGAGTCCCTCCTCCGTGGTATTTATGCCTATGGTTTTGAGAAGCC
pMB"53" 635	636	-----
pMB33 800	751	CTCTGCCATCCAGCAGCGAGCTATTCTTCCTTGTATCAAGGGTTATGATG
pMB"53" 635	636	-----
pMB33 850	801	TGATTGCTCAAGCCCAGTCTGGGACTGGGAAAACAGCTACATTTGCCATA
pMB"53" 653	636	----TGCCCAAGACCCGTC--GGA-----
pMB33 900	851	TCAATTCTGCAGCAGATTGAATTAGATCTAAAGGCCACTCAGGCTTTGGT
pMB"53" 653	654	-----
pMB33 950	901	TCTGGCACCCACACGTGAATTGGCTCAGCAGATACAAAAGGTGGTTATGG
pMB"53" 665	654	-----GGCCCCGCCGAT-----

pMB33 1000 pMB"53" 665	951	CATTAGGAGACTACATGGGTGCCTCTTGTGCATGCCTGCATTGGGGGCACC
	666	-----
pMB33 1050 pMB"53" 665	1001	AATGTGCGTGCTGAGGTGCAGAAGCTGCAGATGGAAGCTCCCCATATCAT
	666	-----
pMB33 1100 pMB"53" 665	1051	CGTGGGTACCCCTGGCCGGGTGTTTGACATGCTTAACCGGAGATACCTGT
	666	-----
pMB33 1150 pMB"53" 675	1101	CCCCAAATACATCAAGATGTTTCGTA
	666	-----
		-----GAAA-----
pMB33 1200 pMB"53" 675	1151	AGCCGAGGGTTCAAGGATCAGATCTATGACATATTCAGAAGCTCAACAG
	676	-----
pMB33 1250 pMB"53" 675	1201	CAACACACAGGTAGTTTTGTGTCTGCTACAATGCCTTCTGATGTCCTTG
	676	-----
pMB33 1300 pMB"53" 703	1251	AGGTGACCAAGAAATTTATGAGAGACCCTTGAGCGGCCGCATAATGCTTA
	676	-----
		-----AAGA-----
		.
		-----CCATGAGCGGCCGCATAATGCTTA
pMB33 1350 pMB"53" 753	1301	AGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAAT TAA
	704	AGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAAT TAA
pMB33 1400 pMB"53" 803	1351	TACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCATCTTAG
	754	TACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCATCTTAG
pMB33 1436 pMB"53" 853	1401	TATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACAT ATC-----
	804	TATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGGATGCACAAACACG
pMB33 1436 pMB"53" 903	1437	-----
	854	CCGCCGCGAACGTCGCGCAGAGAAACAGGCTCAATGGAAAGCAGCAAATG
pMB33 1457	1437	-----
		AAGAACGGCATCAAGGTGAAC

pMB33 2044 pMB"53" 1212	1995	ATTACCACTGACCTGTTGGCCAGAGGCATTGATGTGCAGCAGGTCTCCTT
pMB33 2094 pMB"53" 1212	2045	AGTCATCAACTATGACCTTCCCACCAACAGGGAAAACACTACATCCACAGAA
pMB33 2144 pMB"53" 1212	2095	TCGGTCGAGGTGGTCGGTTTGGTCGTAAGGGTGTGGCTATTAACATGGTG
pMB33 2194 pMB"53" 1212	2145	ACCGAAGAAGACAAGAGGACTCTTCGAGACATTGAGACTTTCTACAACAC
pMB33 2244 pMB"53" 1212	2195	CTCCATTGAAGAGATGCCCTCAACGTTGCTGACCTCATTTGACTCGAGT
pMB33 2294 pMB"53" 1212	2245	CTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCG
pMB33 2344 pMB"53" 1212	2295	TCTACTAGCGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
pMB33 2350	2345	ACTAGC
pMB"53"	1213 ----- 1212	

GFP

elf4A

glycine linker

T7 promoters/ Lac Operators

pACYC-Duet sequence outside T7(1)- last Stop codon