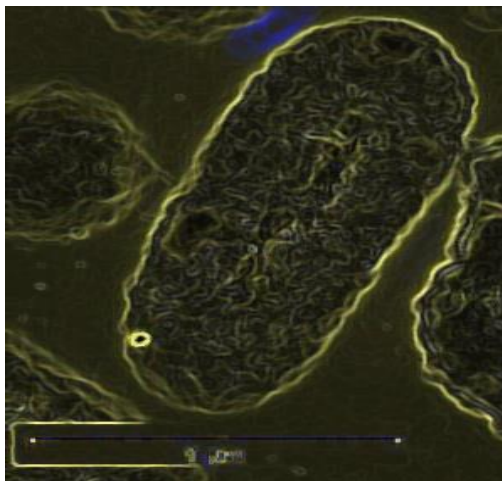




Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie



Rol van een ABC-transporter in de
zinkresistentie van *Cupriavidus
metallidurans*

Randy Vermeesen

Promotoren

Dr. Ir. Rob van Houdt

SCK•CEN

Ir. Ann Provoost

SCK•CEN

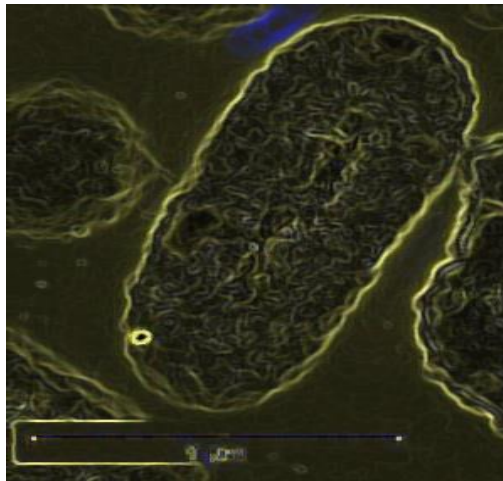
Ir. Evelyne Wirix

PXL-promotor





Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie



Rol van een ABC-transporter in de
zinkresistentie van *Cupriavidus
metallidurans*

Randy Vermeesen

Promotoren

Dr. Ir. Rob van Houdt

SCK•CEN

Ir. Ann Provoost

SCK•CEN

Ir. Evelyne Wirix

PXL-promotor



Voorwoord

De laatste fase in de opleiding Agro-en Biotechnologie aan de hogeschool PXL te Diepenbeek is het uitwerken van een bachelorproef gedurende een stageperiode van 64 dagen. Deze bachelorproef kadert binnen de specialisatie cel- en gentechnologie en heeft als onderzoekstopic “Onderzoek naar de metaalresistente bacterie *Cupriavidus metallidurans*” dat al meerdere jaren lopend is op SCK•CEN onder begeleiding van Dr. Ir. Rob van Houdt.

Vermits Joachim Vandecraen in zijn doctoraatsthesis “*Cupriavidus metallidurans* in response to environmental stressors” een zinkmutant CH34^{znR} ontdekt heeft, gaat deze thesis hierop verder. In dit werk zal dan ook getracht worden de rol van een ABC-transporter in de zinkresistentie van *Cupriavidus metallidurans* te achterhalen.

Door zelfstandig aan een project te mogen werken, heb ik ondervonden dat niet alles van de eerste keer lukt. Zo zijn de transformaties en conjugaties meerdere keren uitgevoerd om het gewenste resultaat te bekomen. Jammer genoeg is ook een deel van het beoogde werk hierdoor niet uitgevoerd wegens tijdgebrek. Toch heb ik uit deze moeilijker momenten veel bijgeleerd, zoals het zoeken naar oplossingen en het optimaliseren van bestaande protocollen.

Via deze weg zou ik dan ook graag mijn externe en interne promotoren: Dr. Ir. Rob Van Houdt, Ir. Ann Provoost en Ir. Evelyne Wirix willen bedanken voor alle geboden hulp. Zij stonden steeds klaar om hulp te bieden tijdens het verloop van de bachelorproef. Ook de toffe collega’s waarbij ik Tom Rogiers en Niels Belmans in het bijzonder wil bedanken, hebben bijgedragen aan het goede verloop van de bachelorproef.

Als laatste zou ik graag het SCK•CEN bedanken voor het ter beschikking stellen van hun laboratorium en het labomateriaal.

Samenvatting

Veel bodembacteriën hebben zich aangepast aan de aanwezigheid van toxische, zware metalen in de omgeving. De laatste dertig jaar is resistentie van bacteriën tegen zware metalen het onderwerp van vele, intensieve onderzoeken geweest. *Cupriavidus metallidurans*, meer bepaald stam CH34, is in 1976 geïsoleerd uit een decantatietank van een metaalverwerkend bedrijf. Sindsdien is het geëvolueerd naar een soort modelorganisme in dit werkveld omdat het resistent is tegen meer dan twintig verschillende zware metalen (millimolaire concentraties). *C. metallidurans* CH34 heeft zijn resistentie tegen zware metalen voornamelijk te danken aan determinanten gelegen op de twee megaplasmiden pMOL28 en pMOL30. Onderzoek naar de achterliggende mechanismen geven inzicht in de micro-adaptatie van bacteriën tegen zware metalen en in de toekomst is fytoremediatie van vervuilde bodems misschien een optie.

Een adaptief evolutie experiment heeft een mutant van *C. metallidurans* CH34 aan het licht gebracht. Deze mutant is nog beter bestand tegen zink als de parentale stam. Onderzoek wees uit dat de transcriptionele regulator van de ABC-transporter (=repressor) gelegen op chromosoom 1 verminderd tot expressie komt in deze mutant. Hierdoor gaat de aanliggende pomp verhoogd tot expressie komen en neemt de zinktolerantie toe. Homologie in de eiwitsequentie met *Rhizobium leguminosarum* leert ons dat de functie van de ABC-transporter het gebruik van glycerol als enige koolstofbron is.

In het eerste uitgevoerde experiment worden de parentele CH34, twee zinkmutanten en twee zelfgemaakte constructen: één met de pomp uitgeschakeld, de andere met een uitgeschakelde repressor opgekweekt in vloeibaar medium waarin ze zijn blootgesteld aan een toenemende zinkconcentratie. De twee mutanten vertonen de hoogste zinktolerantie, gevolgd door de stam met uitgeschakelde repressor. De stam waarin de pomp is uitgeschakeld vertoont duidelijk de laagste zinktolerantie. Dit bevestigt de hypothese dat een verminderde expressie van de repressor, waardoor de pomp een verhoogde expressie vertoont, zorgt voor een verhoogde zinkresistentie. Wel is nog duidelijk een verschil waarneembaar tussen de zinkmutant en de stam met uitgeschakelde repressor, dit kan duiden op het feit dat de ABC-transporter niet het enige element is dat voor verhoogde zinktolerantie zorgt in zinkmutant.

Om de exacte functie van de ABC-transporter bij groei op glycerol te bepalen, wordt het *glp locus* ingebracht in een *Rhizobium leguminosarum* stam, meer bepaald in LRS-C-D. Deze stam bezit de twee plasmiden die de parentale VF39 heeft niet. Op één van deze plasmiden is de ABC-transporter gelokaliseerd. Om te beginnen wordt een selectiemerker bepaald voor het inbrengen van het *glp locus* (zowel pomp als repressor). In dit experiment is aangetoond dat carbenicilline 400ng/µl een geschikte selectiemerker is omdat de parentale stam hier niet op kan groeien en het in te brengen plasmide een merker voor carbenicilline op zijn plasmide heeft liggen.

In het laatste experiment wordt een mutant gemaakt waarin de ABC-transporter op het chromosoom vervangen wordt door een tetracycline cassette. Door hierna een zelfgemaakt construct in te brengen waar een complementaire plasmidepomp op ligt, kan relatief eenvoudig achterhaald worden welke rol de specifieke genen van de pomp van de ABC-transporter hebben in de verhoogde zinkresistentie van CH34. Zowel door kolonie-PCR als door sequentie-analyse is bevestigd dat de twee zelfgemaakte constructen correct zijn en een vervolg experiment opgezet kan worden, waarin de complementaire pomp ingebracht wordt in een CH34 met een uitgeschakelde ABC-transporter om op die manier de exacte rol van de individuele genen te achterhalen.

Inhoudsopgave

Voorwoord	2
Samenvatting	3
Lijst met afkortingen	7
1 Inleiding.....	8
2 Literatuurstudie.....	9
2.1 <i>Cupriavidus metallidurans</i>	9
2.1.1 Beschrijving van de bacterie	9
2.1.2 Genoomstructuur.....	10
2.1.3 Zinkresistente mutant CH34 ^{ZnR}	11
2.2 ABC-type suiker transporter.....	14
2.2.1 Ontdekking ABC-transporter in CH34	14
2.2.2 Functie ABC-type suiker transporter.....	14
2.2.3 Glycerol als koolstofbron	15
2.3 Gebruikte methoden.....	16
2.3.1 Constructie van de knock-out stammen	16
2.3.2 Aanmaak mutant CH34 Δ Rmet_2229_2235::tet.....	16
2.3.3 Constructie complementaire plasmidepomp	18
2.4 Theoretische achtergrond van de gebruikte technieken.....	19
2.4.1 Genetische modificatie	19
2.4.2 Genetische transformatie	20
2.4.3 Natuurlijke competentie	20
2.4.4 Geïnduceerd competente cellen en chemische transformatie.....	21
2.4.5 Elektroporatie.....	22
2.4.6 Triparentale conjugatie	24
2.5 Screeningsmethoden	24
2.5.1 Optische dichtheid bij 600 nm	24
2.5.2 Blauw-wit screening	25
2.6 Overzicht bacteriële stammen	26
3 Materiaal en methoden	29
3.1 Invloed van de transcriptionele regulator op zinkresistentie.....	29
Materialen.....	30
3.1.1 Overzicht gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables	30
3.1.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables	30
3.1.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen	30
3.1.4 Overzicht stalen met oorsprong en identificatie	31

Methoden.....	31
3.1.5 Werkschema.....	31
3.1.6 OD600nm meting	32
3.2 Groei van <i>Rhizobium leguminosarum</i> op glycerol	33
Materialen.....	34
3.2.1 Overzicht gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables	34
3.2.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables	34
3.2.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen	34
3.2.4 Overzicht stalen met oorsprong en identificatie	35
Methoden.....	35
3.2.5 Werkschema.....	35
3.2.6 Elektrocompetente LRS-C-D	36
3.2.7 Elektroporatie.....	37
3.3 Invloed van de individuele genen van de pomp in zinkresistentie van CH34	38
Materialen.....	41
3.3.1 Overzicht gebruikte apparatuur	41
3.3.2 Overzicht van gebruikt glaswerk en disposables	41
3.3.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen	41
3.3.4 Overzicht stalen met oorsprong en identificatie	43
Methode.....	44
3.3.5 PCR	44
3.3.6 PCR-Clean up met Wizard Gel en PCR-clean up	45
3.3.7 Agarosegel elektroforese	45
3.3.8 Nanodrop	45
3.3.9 Miniprep pK18mob met Wizard plus SV Minipreps.....	46
3.3.10 Restrictie.....	46
3.3.11 Ligatie	46
3.3.12 Chemische Transformatie	46
3.3.13 Elektroporatie.....	47
3.3.14 Sequentie-analyse door Mix2Seq.....	47
3.3.15 Triparentale conjugatie	48
4 Resultaten	49
4.1 Invloed van de transcriptionele regulator bij zinkresistentie	49
4.1.1 OD _{600nm} metingen	49
4.1.2 Troebelheidsmeting na 96 uur	49
4.1.3 Troebelheidsmeting na 1 week.....	50

4.2	Groei van <i>Rhizobium leguminosarum</i> op glycerol	51
4.2.1	Antibioticamerker	51
4.3	Invloed van de individuele genen van de pomp in zinkresistentie van CH34	52
4.3.1	Constructie Rmet_2229-Rmet_2235	52
4.3.2	Aanmaak complementaire plasmidepomp	58
5	Discussie	61
5.1	Invloed van de transcriptionele regulator bij zinkresistentie	61
5.2	Groei van <i>Rhizobium leguminosarum</i> op glycerol	61
5.3	Invloed van de individuele genen van de pomp in zinkresistentie van CH34	61
6	Conclusie	63
	Literatuurlijst	64
	Figurenlijst	66
	Tabellenlijst	67
	Bijlagen	68
	Bijlage 1: media	69
	LB-medium	69
	TY-medium	69
	Robertson minimaal media	69
	284 medium	70
	Bijlage 2 Metalen toevoegen aan medium	73
	Bijlage 3 :Antibiotica toevoegen aan medium	74
	Bijlage 4: <i>glp</i> locus en <i>in silico</i> 's	76
	Glp locus	76
	In silico's	79
	Bijlage 5: kolonie PCR pK18mob_Rmet_2229_2235	81
	Bijlage 6: <i>sequentie-analyse</i>	82
	Rmet_2229_2235::tet (pomp + repressor vervangen door tetracycline cassette)	82
	pBBRMCS2_2229_2234	82

Lijst met afkortingen

<u>Afkorting</u>	<u>Betekenis</u>
ABC-transporter	ATP-bindende-cassette transporters
AMP	ampicilline
ATP	adenosinetriphosfaat
Cb	carbenicilline
CH34	stam van <i>Cupriavidus metallidurans</i>
CHR1	Chromosoom 1
CHR2	Chromosoom 2
DNA	desoxyribonucleïnezuur
gDNA	genomisch DNA
<i>glpD</i>	glycerol 3-fosfaat dehydrogenase
<i>glpK</i>	glycerol kinase
<i>glpR</i>	transcriptionele regulator (= repressor)
Km	kanamycine
MCS	multiple cloning site
MIC	minimale inhibitorische concentratie
OD _{600nm}	optische densiteit (bij 600 nm)
PCR	polymerasekettingreactie
RMM	Roberston minimal medium
Tc	tetracycline
UV	ultraviolet
V	vaste stof
VI	vloeistof

1 Inleiding

Cupriavidus metallidurans is een bacterie die behoort tot de *Burkholderiaceae* familie en gekenmerkt wordt door resistentie tegen verschillende soorten zware metalen. Daarnaast heeft deze bacterie een groot arsenaal aan mobiele genetische elementen die verschillende determinanten bevatten. Dit zorgt ervoor dat deze bacterie zich specifiek kan aanpassen aan de omgeving. Verontreinigde bodems zijn al jaren voer voor onderzoek omdat ze een probleem vormen voor het milieu en zelfs de gezondheid van de mens. Een voorbeeld hiervan is de aanwezigheid van cadmium in Noord-Limburg, te wijten aan de zinkfabriek in Overpelt. Bacteriën zoals *Cupriavidus metallidurans* kunnen mogelijkheden bieden om verontreinigingen in bodems te reduceren. Om dit proces zo optimaal mogelijk te kunnen stimuleren is er de noodzaak om de microadaptatie van zware metalen bij dit soort bacteriën te onderzoeken en voornamelijk te begrijpen.

Daarom wordt gekeken naar *C. metallidurans* CH34, deze stam draagt verschillende determinanten voor metaalresistentie op de megaplasmiden pMOL28 en pMOL30. Onderzoek heeft uitgewezen dat een ABC-type suiker transporter gelinkt kan worden aan een verhoogde zinktolerantie. Deze transporter is vermoedelijk ook gelinkt aan het gebruik van glycerol als enige koolstofbron. Door een mutant CH34^{Zn^R} te gaan vergelijken met een parentale stam is gebleken dat bij het uitschakelen van de transcriptionele regulator *glpR* (de repressor) gelinkt aan deze ABC-transporter, de mutant beter bestand is tegen verhoogde zinkconcentraties.

In dit project wordt onderzocht hoe deze ABC-transporter, gelegen op het eerste chromosoom van CH34, bijdraagt aan de verhoogde zinktolerantie. Door het isoleren van deze ABC-transporter uit CH34 en in te brengen in specifieke andere organismen, kan afgeleid worden of deze ABC-transporter ook daadwerkelijk een functie heeft in glycerolopname. Er kan ook afgeleid worden of een verhoogde zinkresistentie wordt waargenomen. De waarnemingen van dit project geven meer inzicht in de rol van de ABC-transporter, de rol van glycerolopname in het inhiberen van de repressor *GlpR* en het adaptieve vermogen van *Cupriavidus metallidurans* om te overleven in een met metaal vervuilde omgeving.

2 Literatuurstudie

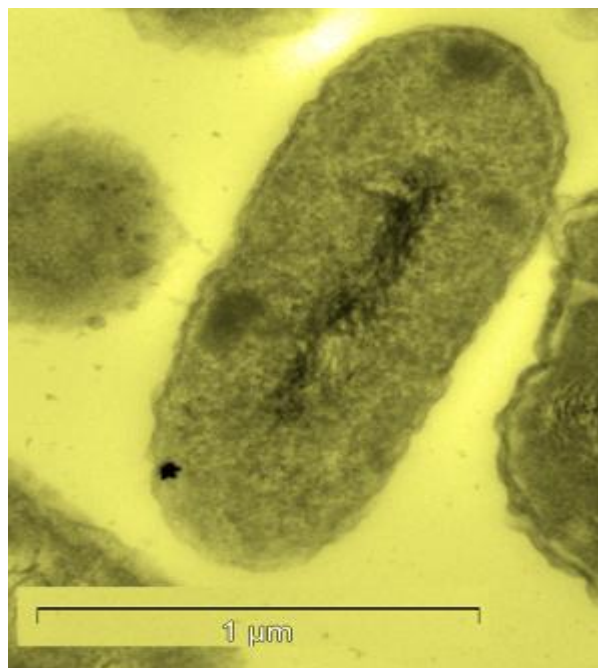
2.1 *Cupriavidus metallidurans*

2.1.1 Beschrijving van de bacterie

Verschillende bacteriën hebben zich in hun leefmilieu aangepast aan de aanwezigheid van zware metalen. De laatste dertig jaar is deze zware metaaltolerantie het onderwerp geweest van verschillende, intensieve onderzoeken. De bacterie *Cupriavidus metallidurans* wordt aanzien als een modelorganisme in dit werkveld omdat het kan overleven in de aanwezigheid van meer dan twintig verschillende zware metalen aan millimolaire concentraties [1].

De letterlijke betekenis van *metallidurans* is dan ook “*metal-enduring*” dat vertaald kan worden als metaal tolererend. In dit project wordt verder gewerkt met één specifieke stam namelijk *Cupriavidus metallidurans* CH34 [2].

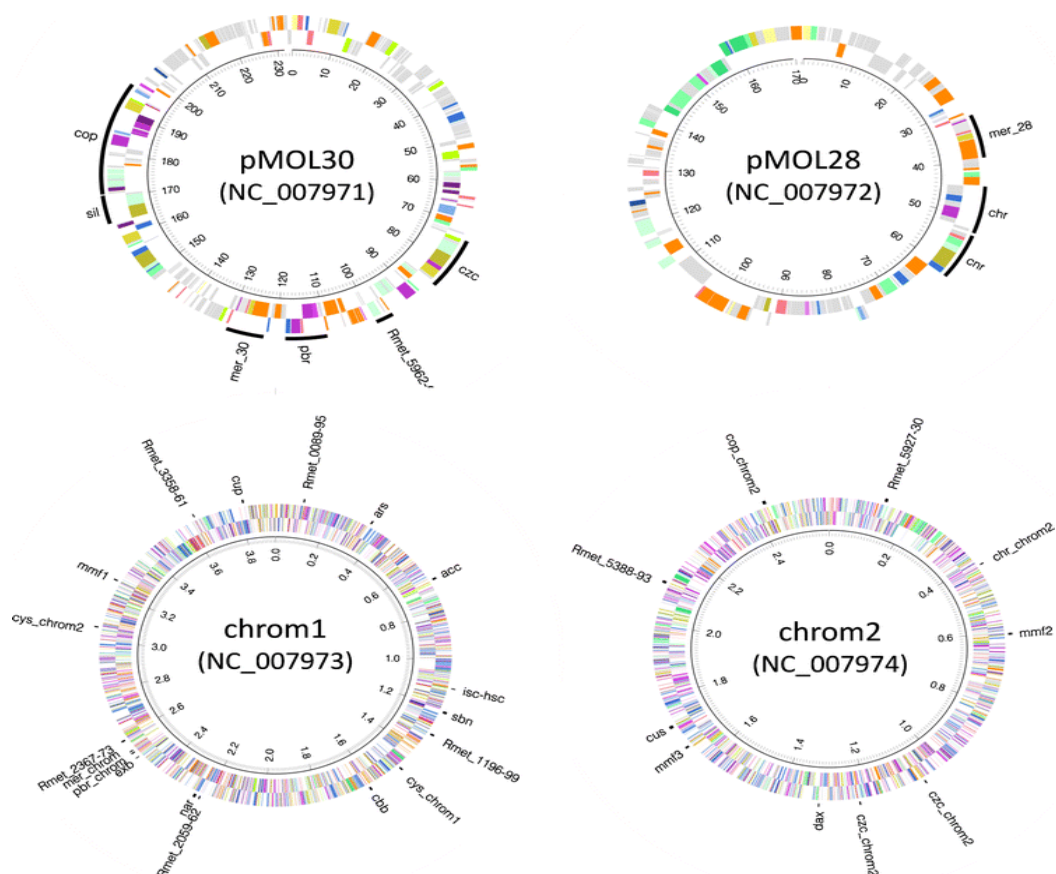
C. metallidurans wordt vaak geïsoleerd uit industriële sites, zoals in de mijn-, metaal en chemische industrie. Het is een Betaproteo-, Gram-negatieve, niet sporenvormende bacterie, dat toebehoort tot de Burkholderiaceae familie. De bacterie is facultatief anaeroob en kan dus zowel in de aanwezigheid als afwezigheid van zuurstof overleven. Aangezien CH34 niet beschikt over een efficiënt glucose opnamesysteem kan het niet groeien op glucose, fructose of galactose. De nodige energie verkrijgt de bacterie door suikerzuur derivaten op te nemen. Na het doorlopen van een keten van verschillende pathways, zal het uiteindelijk twee moleculen pyruvaat produceren. Deze twee moleculen kunnen dan als startmateriaal naar de citroenzuurcyclus of andere gerelateerde cycli. Daarom wordt in het laboratorium gebruik gemaakt van een voedingsbodem met gluconaat als koolstofbron. Het is een mesofiele bacterie dus de groeicondities liggen tussen de 20-37°C, met een optimale groeitemperatuur van 30 °C. Figuur 1 geeft een *C. metallidurans* bacterie weer [2].



Figuur 1: Foto gemaakt met scanning elektronen microscoop (SEM), *Cupriavidus metallidurans* [2].

2.1.2 Genoomstructuur

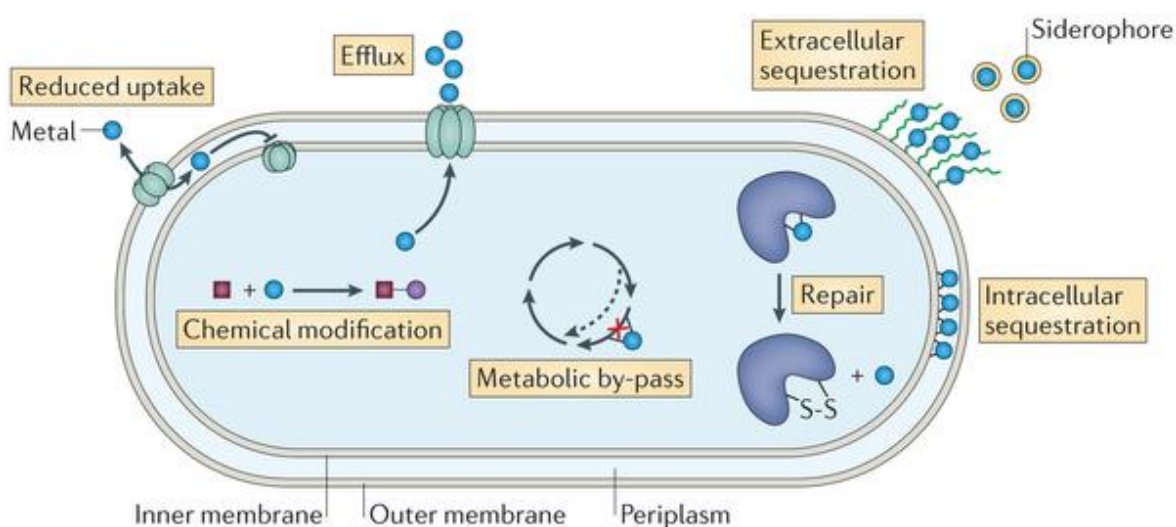
Het totale genoom van *C. metallidurans* CH34, dat 6 913 352 basenparen (bp) lang is, bestaat uit vier circulaire replicons: namelijk Chromosoom 1 (CHR1) (3 928 089 bp), chromosoom 2 (CHR2) (2 580 084 bp) en twee extra megaplasmide namelijk pMOL28 (171 459 bp) en pMOL30 (233,720 bp). Figuur 2 geeft hier een overzicht van [1].



Figuur 2: overzicht genoom *C. metallidurans* CH34 [1].

CHR1 bevat het grootste deel van de huishoudgenen, en is dus naar alle waarschijnlijkheid het originele replicon. CHR2 is in de bacterie gekomen als plasmide en doorheen de evolutie van *C. metallidurans* getransformeerd naar een tweede chromosoom via genetische uitwisseling met CHR1 of andere organismen [1].

Toch is de resistentie tegen zware metalen van CH34 voornamelijk afkomstig van determinanten gelegen op de twee megaplasmiden. Genetische elementen die zich onafhankelijk van het chromosoom kunnen vermenigvuldigen. pMOL28 bevat een 34kb regio waarop genen liggen die zorgen voor resistentie tegen Co^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} en Ni^{2+} [3]. Plasmide pMOL30 bezit twee regio's waarop genen liggen die een rol spelen in de zware metaalresistentie, deze zijn in totaal 132 kb en spelen een rol voor resistentie tegen Ag^{1+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} en Zn^{2+} [3]. Bacteriën maken gebruik van verschillende mechanismen om resistentie tegen zware metalen te bekomen. Deze mechanismen zijn complex en verschillend bij bacteriën en worden daarom in verschillende categorieën ingedeeld naarmate hun specifieke functie. Figuur 3 geeft hier een overzicht van [4].



Nature Reviews | Microbiology

Figuur 3: overzicht van de resistentie mechanismen van bacteriën tegen (zware) metalen [4].

Efflux mechanismen en verminderde opname van zware metalen spelen hierbij een heel belangrijke rol. De regulatie, expressie en activiteit van proteïnen in metaalopname (ook bij efflux) is cruciaal voor metaalresistentie. Doorheen de evolutie hebben bacteriën strikt gereguleerde mechanismen verworven die de activiteit van membraantransporters die zware metalen opnemen reguleren. Sommige van deze transporters worden gecontroleerd door regulators die metaalionen kunnen binden met hoge affiniteit. Veel van de metaalresistentie determinanten op de chromosomen en mobiele genetische elementen coderen voor een groot arsenaal aan membraantransporters. Deze transporters gaan specifiek bepaalde toxische (zware) metalen uit de cel pompen. De expressie van deze systemen wordt bepaald door zeer gevoelige regulatoren die metalen met hoge affiniteit gaan binden. Hun activiteit is gerelateerd aan ATP hydrolyse, zoals bijvoorbeeld de ABC-transporter [4].

2.1.3 Zinkresistente mutant CH34^{ZnR}

Een adaptief evolutie experiment werd uitgevoerd om mutanten van CH34 te verkrijgen, die kunnen groeien in de aanwezigheid van zinkconcentraties boven de minimale inhibitorische concentratie (MIC) van 12 mM Zn^{2+} . De MIC is gedefinieerd als de laagste concentratie van een antimicrobieel agens dat de visuele groei van een micro-organisme inhibeert [5].

Als eerste werd *C. metallidurans* CH34 opgekweekt in MM284 medium op 30°C tot het de stationaire fase bereikt had. Hierna werd de cultuur 1:100 verdund in MM284 met een zinkconcentratie van 12 mM. Na vier dagen groeien op 30°C werden de cellen in de exponentiële fase (10^9 cellen) overgeënt in een tienvoudige, seriële verdunning op platen met een eindconcentratie zink van 24 mM. Op deze manier werd de mutant CH34^{Zn^R} verkregen die een MIC heeft van 24 mM.Zn²⁺ [6].

Genetische bepaling van CH34^{Zn^R}, die een hogere resistentie vertoonde tegen zink, maar ook tegen cadmium, geeft blijk van zeven mutaties t.o.v. de parentale stam CH34. Alle mutaties zijn veroorzaakt door transpositie van insertiesequenties (*ISRme5*, *ISRme15* of *IS1088*). Een overzicht van deze mutaties zijn zichtbaar in tabel 1. Insertie sequenties zijn kleine stukjes DNA-sequentie die van één plaats op het genoom kunnen verspringen naar andere plaatsen [7] en zodoende genen inactiveren. Twee mutaties springen meteen in het oog, allereerst de inactivatie van de transcriptionele regulator Rmet_2235 (*glpR*) van de ABC-type transporter en ten tweede de inactivatie van Rmet_4521. Aangezien beide genen coderen voor een transcriptionele regulator, kan de inactivatie hiervan leiden tot significante fenotypische consequenties. Daarnaast toont het genoom expressie profiel van CH34^{Zn^R} 61 open leesramen die significant anders tot expressie komen in vergelijking met de parentale CH34. Zo werd er bij 21 genen een verhoogde expressie waargenomen en bij 40 genen een verlaagde expressie. De ABC-type suiker transporter (Rmet_2229_34) vertoonde samen met het structurele proteïne van de flagellen (FliC2) de grootste verhoging in expressie. Verder viel op dat nog andere genen die coderen voor componenten van de flagellen verhoogd tot expressie kwamen. Dit is bewezen door een toenemende bewegelijkheid van CH34^{Zn^R} t.o.v. de parentale stam. Het constitutieve expressie profiel van CH34^{Zn^R} wijst op een essentiële rol van de ABC-type suiker transporter bij verhoogde zink en cadmium resistentie. Tabel 2 op onderstaande pagina geeft de relatieve verandering weer van de belangrijkste genen in vergelijking met de parentale CH34.

Concluderend kan dus, door het vergelijken van de genoomsequentie en de expressie data, worden gesteld dat inactivatie van Rmet_2235 waarschijnlijk resulteert in een verhoogde transcriptie van de aangrenzende coderende ABC-type suiker transporter.

Tabel 1: Mutaties in CH34^{Zn^R} [6]

Insertie	Gen	Proteïne
IS1088	Rmet_2146	ABC superfamilie transporter subunit
ISRme15	Rmet_2171	Geconserveerde proteïne
IS1088	Rmet_2235	DNA-bindend transcriptionele repressor
IS1088	Rmet_4452	Respons regulator
ISRme5	Rmet_4521	Transcriptionele regulator
IS1088	Rmet_4574	Acyl-COA dehydrogenase proteïne
IS1088	Rmet_5200	Dihydroxy-bifenyldioxygenase

Tabel 2: Differentiële gen expressie van CH34^{ZnR} [6]

Gen	Proteïne	relatieve verandering t.o.v. de parentale stam CH34
Uppereguleerd		
Rmet_2229	ABC-type suiker transporter, periplasmatisch component, waarschijnlijke suiker bindende precursor	8.81
Rmet_2231	ABC-type suiker transporter, permease component	4.92
Rmet_2232	ABC-type suiker transport systeem, permease component	4.37
Rmet_2234	ABC-type suiker transporter ATPase component	4.31
Rmet 5252 (<i>fliC2</i>)	flagellin	7.43

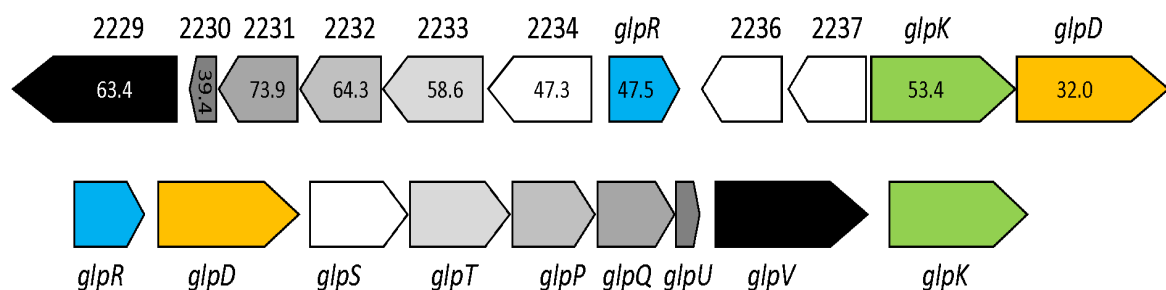
2.2 ABC-type suiker transporter

2.2.1 Ontdekking ABC-transporter in CH34

Een gelijkaardig operon zoals de ABC-type suiker transporter van CH34, dat ook een glycerol kinase (*glpK*) en glycerol 3-fosfaat dehydrogenase (*glpD*) bevat, is al waargenomen in meerdere alphaproteobacteria. De functie van deze pomp is het gebruik van glycerol als enige koolstofbron. De cluster in CH34 is zelfs gelijkaardig aan een locus gevonden op het plasmide pR1eVF39c van *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* VF39, dat in deze bacterie zorgt voor glycerolopname. Figuur 4 geeft een overzicht van de overeenkomsten tussen de twee bacteriën. Pijlen in dezelfde kleur zijn homologe genen en de nummer in de pijlen geeft een grafische voorstelling weer tussen de percentuele gelijkheid van de eiwitsequentie tussen CH34 en *R. leguminosarum* [8].

Het gebruik van glycerol als enige koolstofbron zorgt wel voor een verlengde lag-fase. Zo is de groei van CH34 in glycerol erg traag (0.02 h^{-1}) ter vergelijking met de groei in gluconaat (0.2 h^{-1}) [9].

Cupriavidus metallidurans CH34



Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* VF39SM plasmid pR1eVF39c

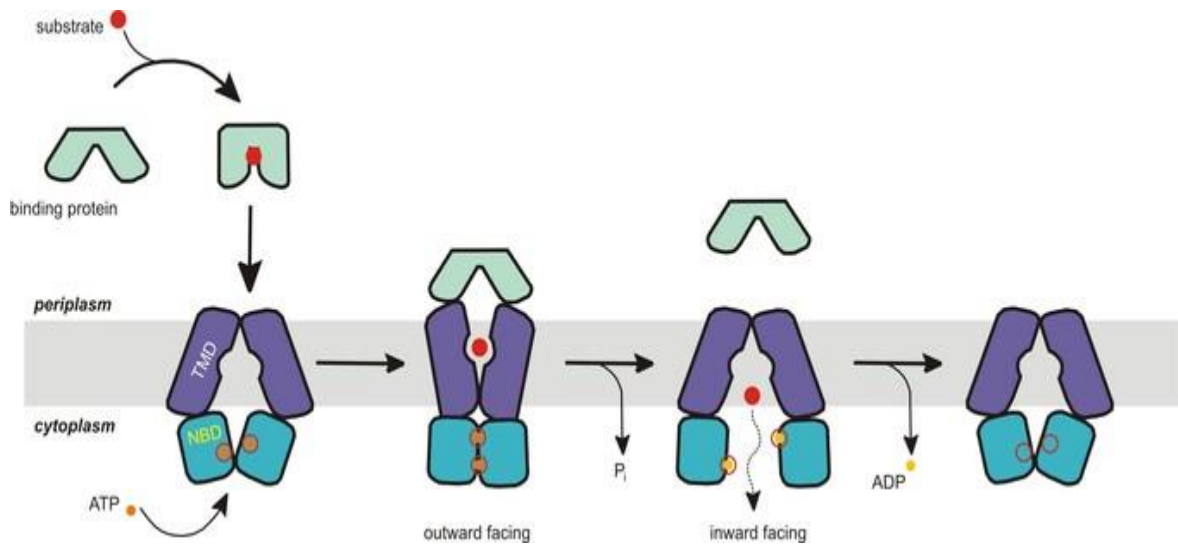
Figuur 4 genomische regio van *glpR* in CH34 met daaronder de vergelijking met de locus voor glycerol gebruik als koolstofbron in plasmide pR1eVF39c in *R.leguminosarum* bv *viciae* VF39 [6].

2.2.2 Functie ABC-type suiker transporter

ATP-bindende cassette transporters (ABC-transporters) behoren tot de transmembranen proteïnen (TM) superfamilie, één van de oudste en grootste families die voorkomen in alle bestaande soorten gaande van prokaryoten tot *Homo sapiens*. Bacteriële ABC-transporters zijn essentieel in celviabiliteit, virulentie en pathogeniciteit [10].

Deze transmembraan proteïnen gebruiken adenosinetriphosfaat (ATP) om verschillende biologische processen uit te voeren, waaronder translocatie van verschillende substraten doorheen de extra- en intracellulaire membranen zoals metabolische producten, lipiden en sterolen. Maar ook processen niet gerelateerd aan transport zoals translatie van RNA of DNA herstel worden uitgevoerd door ABC-transporters [10].

In Gram-negatieve bacteriën, transporteert het vetten en polysachariden van het cytoplasma van de cel naar het periplasma. De transporter functioneert ook als pomp door toxines uit de cel te pompen. Het mechanisme van de pomp is weergegeven op figuur 5 waarin duidelijk wordt dat de transporter door energie onder de vorm van ATP een substraat opneemt en daarna afgeeft in het cytoplasma van de Gram-negatieve bacterie [10].



Figuur 5: mechanisme van actief transport door ABC-transporter om substraten in de cel te brengen [10].

2.2.3 Glycerol als koolstofbron

Theoretisch gezien kan CH34 door aanwezigheid van de ABC-transporter groeien in een medium met glycerol als enige koolstofbron. Aangezien CH34 nog beschikt over één extra chromosoom en twee megaplasmide zoals in 2.1.2 reeds werd aangehaald, is er ook de mogelijkheid dat een samenwerking van deze transporter met andere factoren zorgen voor de groei op glycerol. Om dit te testen wordt het *glp* locus ingebracht in *Rhizobium leguminosarum*. Door de wildtype die zoals in puntje 2.3.1 vermeld kan groeien op glycerol, een *Rhizobium* construct met *glpR* knockout en een *Rhizobium* construct met pomp knockout op te groeien in glycerol kan de noodzakelijkheid en de exacte functie van de pomp bepaald worden. Ook kan er op die manier vastgesteld worden of er een verhoogde zinkresistentie wordt waargenomen bij de *glpR* knockout. Deze constructen zijn reeds gemaakt en dienen uitgetest te worden [6].

2.3 Gebruikte methoden

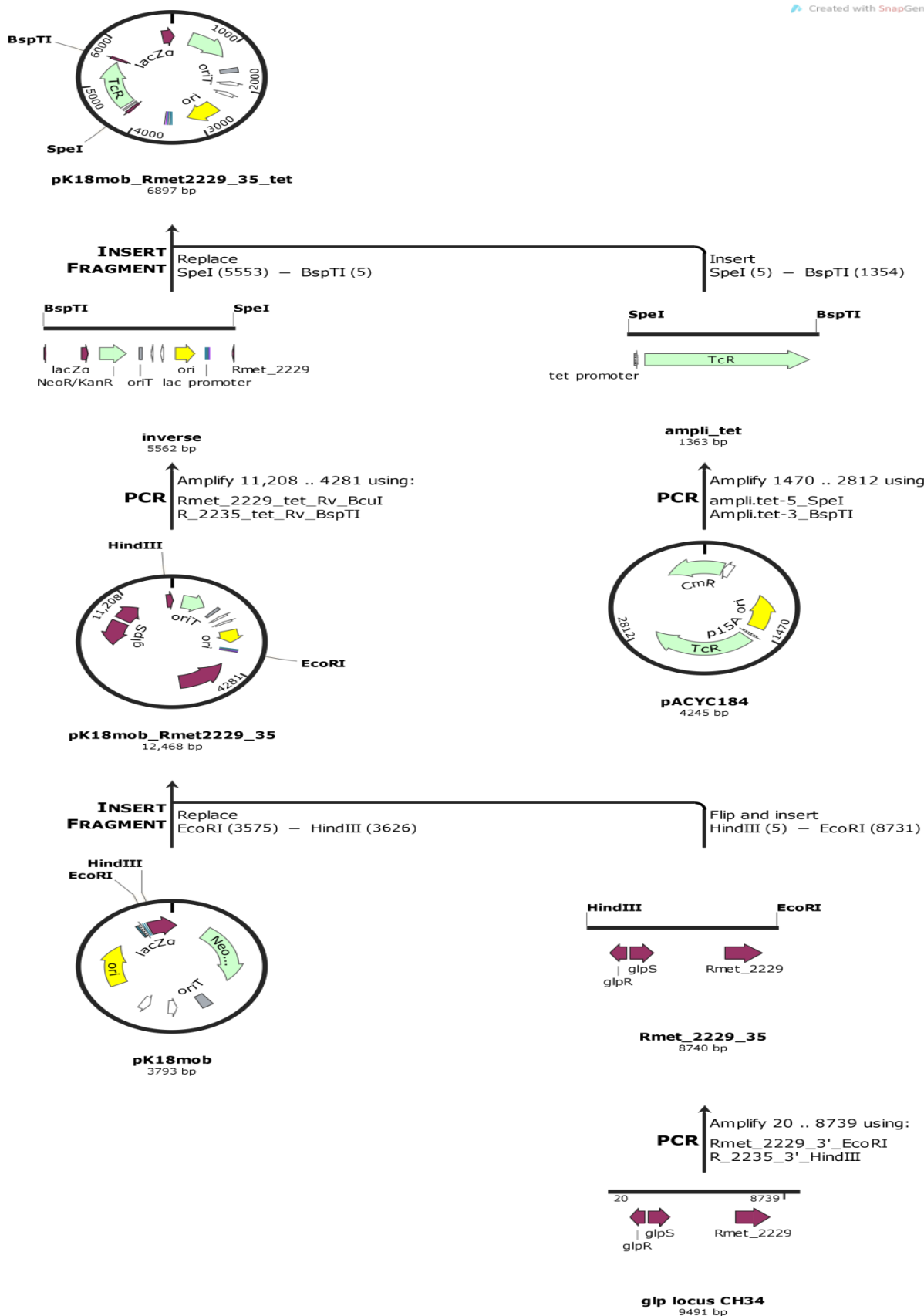
In deze bachelorproef wordt gebruik gemaakt van verschillende constructen. De knock-out stammen (2.3.1) waren al gemaakt en de mutant (2.3.2) en complementaire plasmidepomp (2.3.3) zijn zelf geconstrueerd. Hieronder volgt een overzicht van hoe deze tot stand zijn gekomen.

2.3.1 Constructie van de knock-out stammen

Het *glpR* gen (Rmet_2235) en de ABC-type suiker transporter (Rmet_2229_2234) werden via PCR geamplificeerd uit CH34 met primerparen die een *HindIII/EcoRI* herkenningsplaats hebben, Rmet_2235_Fw-Rv en Rmet_2229_Fw-Rmet_2234_Rv. Hierna werden deze PCR-producten geligeerd in de vector pK18mob. De resulterende *pglpR* en pRmet_2229_34 plasmiden werden via chemische transformatie ingebracht in *E.coli* DG1 competente cellen en opgekweekt op LB platen met 50 µg/ml kanamycine als selectiemerker. Als extra controle is een sequentieanalyse uitgevoerd. Vervolgens werd er een inverse PCR uitgevoerd met primers die een *BcuI/XbaI* herkenningsplaats hebben. Gelijktijdig werd het tetracycline gen uit pACYC184 geamplificeerd. Hierna werd de tetracycline cassette als *BcuI/XbaI* gekloneerd in het PCR-product van de inverse PCR. De resulterende *pgI::tet* en pRmet_2229_34::*tet* plasmiden werden getransformeerd naar *E. coli* DG1 competente cellen en opgekweekt op LB Tc²⁰Km⁵⁰platen. De juiste kolonies werden opnieuw bevestigd met een sequentieanalyse en als laatste stap werd een triparentale conjugatie uitgevoerd met *E.coli* HB101 pRK600 als helpercel en CH34 of CH34^{znr}. De resulterende transformanten werden geselecteerd op MM284 Tc²⁰ en een identiek kopie ervan op MM284 Km¹⁵⁰⁰, want CH34 Δ*glpR::tet* en CH34 ΔRmet_2229_34::*tet* zijn indien er een dubbele recombinatie heeft plaats gevonden tetracycline resistent en kanamycine gevoelig.

2.3.2 Aanmaak mutant CH34 ΔRmet_2229_2235::*tet*

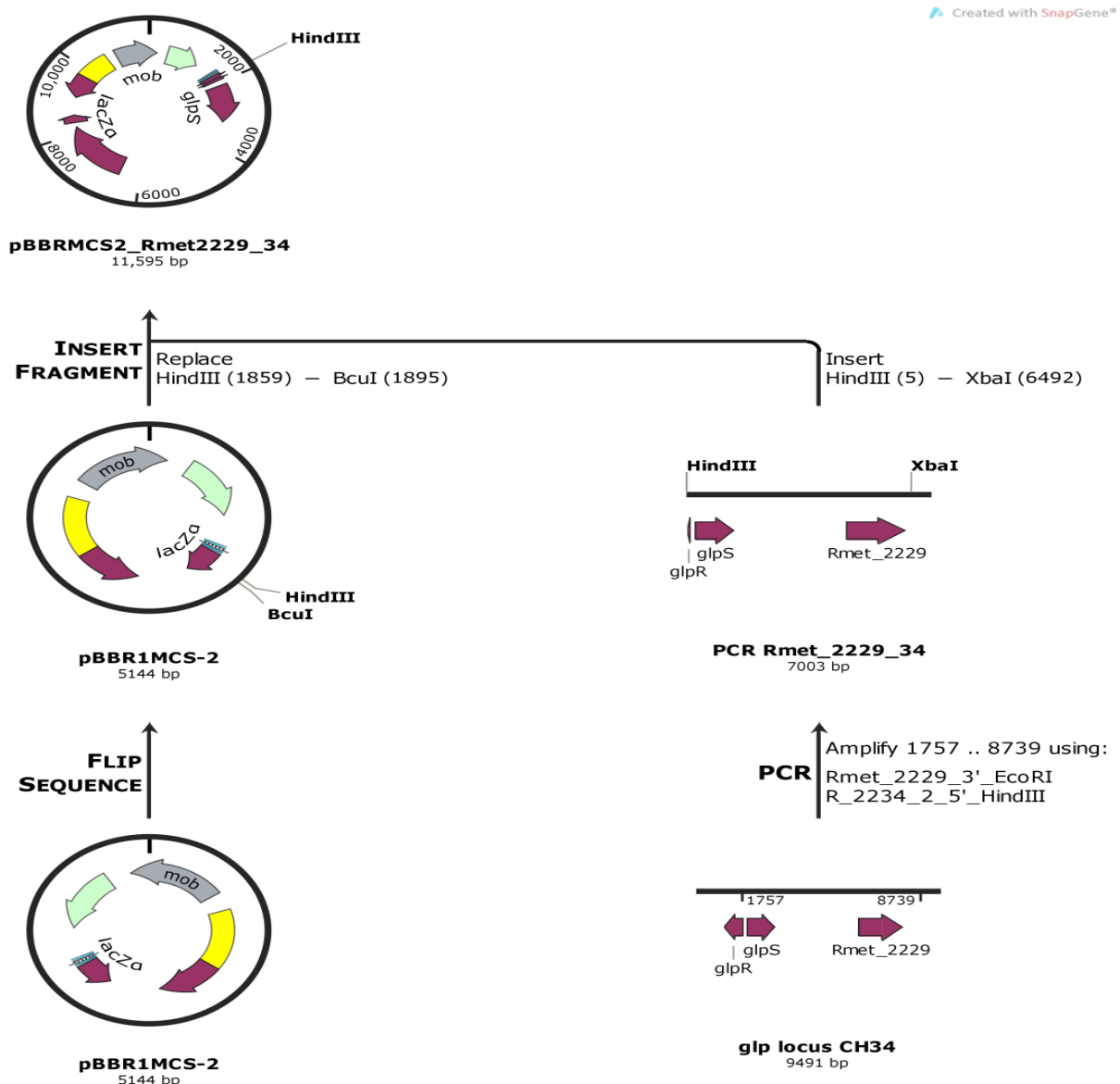
Deze mutant werd aangemaakt om de ABC-type transporter en transcriptionele regulator op het chromosoom van CH34 uit te schakelen en te vervangen met een tetracycline cassette. De ABC-transporter en aanliggende transcriptionele regulator werden via PCR geamplificeerd met primerpaar Rmet_2229_3'EcoRI en R_2235_3'_HindIII, met in de naam van de primers meteen ook de herkenningsplaatsen van de restrictie-enzymen. Hierna werd dit PCR-product geligeerd in de vector pK18mob. Het resulterende pK18mob_2229_2235 plasmide werd via chemische transformatie ingebracht in *E.coli* DG1 competente cellen en daarna uitgestreken op LB Km 50 platen met x-gal en IPTG voor een blauw-wit screening. Hierna is het plasmide geëxtraheerd via minprep, om mee verder te werken in de volgende stappen. Figuur 6 geeft een visueel overzicht weer van de verschillende stappen die zijn uitgevoerd. In een volgende stap werd op de resulterende pK18mob_2229_2235 een inverse PCR uitgevoerd met primerparen Rmet_2229_tet_Rv_BcuI en R_2235_tet_Rv_BspTI. Gelijktijdig werd ook een PCR uitgevoerd op pACYC184 met een ampli.tet Spel/BspTI primerpaar om de tetracycline cassette te amplificeren. Deze beide constructen werden geligeerd, getransformeerd naar DG1 en selectie vond plaats op LB Tc 20 platen. Als laatste werd er een triparentale conjugatie uitgevoerd. *E. coli* pK18mob waarin Rmet_2229-Rmet_2235 vervangen zijn door een tetracycline cassette werd samen met een helperstam *E. coli* pRK600 en een CH34 stam samengevoegd zodat er DNA-uitwisseling kon plaatsvinden. De resulterende transformanten werden geselecteerd op MM284 Tc²⁰ en een identiek kopie ervan op MM284 Km¹⁵⁰⁰, want CH34ΔRmet_2229_35::*tet* is indien er een dubbele recombinatie heeft plaats gevonden tetracycline resistent en kanamycine gevoelig.



Figuur 6: schematische weergave van construct $\Delta Rmet_{2229-2235}::tet$ gemaakt met snapgene

2.3.3 Constructie complementaire plasmidepomp

Een plasmide met pomp werd aangemaakt om in te brengen in CH34ΔRmet_2229_35::tet. Zo heeft deze stam terug een functionele ABC-transporter. Omdat de transporter nu op een plasmide ligt is het makkelijker om de individuele rol van de genen te onderzoeken. De pomp werd geamplificeerd via PCR met primerparen Rmet_2229_3'_EcoRI en R_2234_2_5'_HindIII. Daarna werd het PCR-product geknipt met HindIII en XbaI (de knipplaats in de primer is niet EcoRI, maar XbaI). Hierna is het PCR-product geplakt in de vector pBBRMCS2 en de resulterende PBBRMCS_2229_2234 is via chemische transformatie ingebracht in *E. coli* DG1 competente cellen en daarna uitgestreken op LB Km50 platen met x-gal en IPTG voor een blauw-wit screening. Omdat pBBRMCS2 gevoelig is voor dammethylering werd deze vector geknipt met HindIII en BcuI. Figuur 7 geeft een overzicht weer van de verschillende stappen die zijn uitgevoerd.



Figuur 7: overzicht van de aanmaak van een complementaire pomp gemaakt door snapgene

2.4 Theoretische achtergrond van de gebruikte technieken

2.4.1 Genetische modificatie

In deze bachelorproef wordt dus meermaals gebruik gemaakt van genetische modificatie. Bij genetische modificatie wordt een stukje DNA (insert) ingebracht in een plasmide of chromosoom waardoor er gerichte genetische wijzigingen optreden. Doorgaans wordt om DNA van bacteriën zoals bijvoorbeeld CH34 te wijzigen, gebruik gemaakt van plasmiden. Het plasmide kan door commercieel ontwikkelde kits geëxtraheerd worden uit een bacterie. Een andere mogelijkheid is een totale DNA-extractie te doen, waardoor er een mengsel van chromosomaal en plasmide DNA bekomen wordt. Omdat de twee soorten DNA in dichtheid van elkaar verschillen kunnen ze van elkaar gescheiden worden door het DNA te centrifugeren in een suikergradiënt. Zo kan er zuiver plasmide DNA bekomen worden. Het proces verloopt meestal aan de hand van de volgende stappen [11].

1. Het isoleren van het gewenste insert DNA uit een organisme.
2. Het knippen van het DNA door gebruik te maken van restrictie-enzymen zie figuur 9.
3. Het juiste restrictiefragment selecteren door middel van controle op een agarose gel.
4. Het gekozen restrictiefragment uit de gel snijden.
5. Het DNA in een microcentrifugebuisje samenvoegen met het plasmide dat geknipt is met dezelfde restrictie-enzymen.
6. Een ligase-enzym toevoegen zodat het insert in de bacteriële plasmide (vector) geplakt wordt.
7. Het plasmide aan een oplossing bacteriën toevoegen waarvan het membraan poreus is gemaakt zodat het plasmide DNA wordt opgenomen zie puntje 2.4.4.
8. Selectie correct construct van bacterie en opgenomen plasmide door bijvoorbeeld groei op selectief medium.



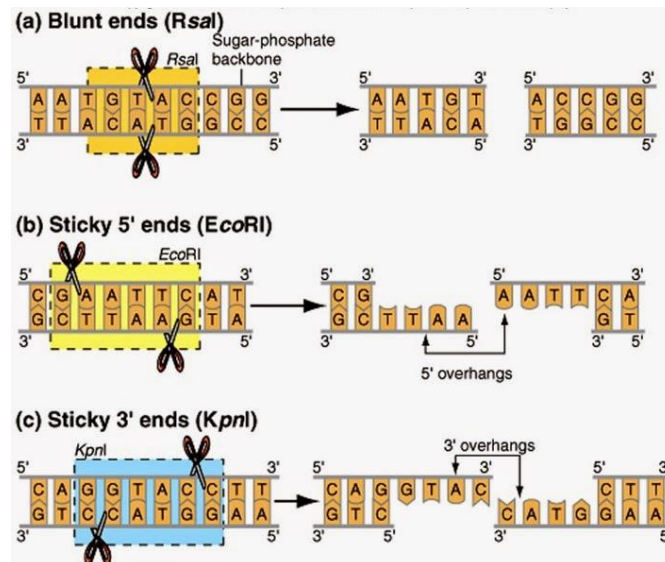
Figuur 8: genetische modificatie van plasmide [11].

Om het insert DNA op de juiste plaats te laten ligeren met het stukje plasmide DNA dient dit eerst opengeknipt te worden met restrictie-enzymen of restrictie-endonucleasen. Dit is een eiwit geproduceerd door bacteriën en knipt het DNA in kleinere fragmenten. Kenmerkend aan restrictie-enzymen is dat het één specifieke palindromische DNA sequentie herkent en alleen op deze specifieke plaats in het DNA de fosfodiësterbindingen tussen de nucleotidenbindingen gaat hydrolyseren [12].

Een bacteriestam gebruikt specifieke restrictie-enzymen als verdedigingsmechanisme tegen indringers. Het restrictie-endonuclease gaat vermeerdering van vreemd DNA beletten door het DNA van de indringer in verschillende stukken te knippen. Het eigen DNA van de cel wordt

beschermd tegen afbraak door methylering, (enzymatische modificatie) van de specifieke herkenningsplaats van het restrictie-enzym. Per bacteriestam moet er dus gekozen worden voor restrictie-enzymen van bacteriofagen van dezelfde stam, om aan de methylering te ontkomen. Anders herkent het restrictie-enzym de specifieke herkenningsplaats niet en zal de restrictie niet kunnen plaatsvinden [12].

Sommige restrictie-enzymen knippen beide DNA-strengen door op dezelfde plaats (blunt end), andere knippen op enkele basen van elkaar verwijderd zodat de strengen schuin zijn doorgeknipt (sticky end). Dit is zichtbaar op figuur 6 hieronder.



Figuur 9: Sticky ends en blunt ends verkregen door restrictie-enzymen [12].

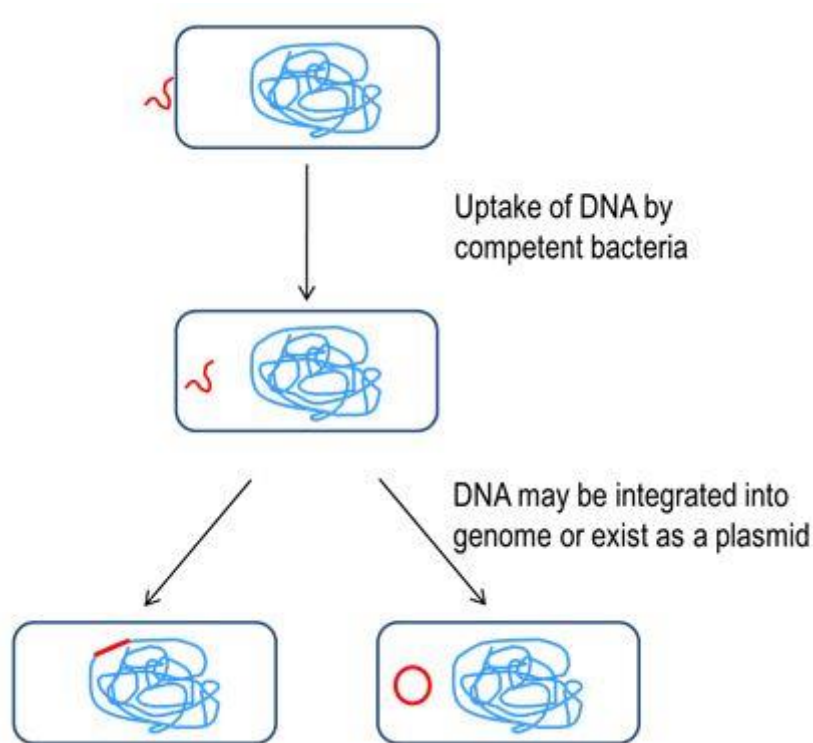
2.4.2 Genetische transformatie

Transformatie is een proces van horizontale gentransfer waarin bacteriën vreemd genetisch materiaal (naakt DNA) opnemen vanuit de omgeving. Bij dit proces van gentransfer is het niet noodzakelijk om een levende donorcel te hebben. Maar de aanwezigheid van celwanden bij bacteriën, schimmels en planten vormt een fysieke barrière. Daarom dienen deze cellen competent te zijn zodat ze dit vreemd DNA kunnen opnemen [13].

2.4.3 Natuurlijke competentie

Het fenomeen van natuurlijke transformatie zorgt ervoor dat de fluctuatie in de populatie van bacteriën stabiel blijft ook tijdens extreme omgevingsveranderingen. Tijdens die extreme condities gaan sommige bacteriënsoorten spontaan DNA vrijzetten in hun omgeving, vrij om opgenomen te worden door competente cellen. Deze cellen gaan dan op hun beurt reageren op de veranderingen in de omgeving door het niveau van verkregen genen te regelen aan de hand van een natuurlijk transformatieproces. Figuur 10 geeft weer hoe naakt DNA kan opgenomen worden door een competente bacterie. [13] Natuurlijke bacteriële competente cellen komen voor in bepaalde specifieke stammen zoals bijvoorbeeld de proteobacteria *Pasteurellaceae* en *Neisseriaceae*. Het gemeenschappelijke aan deze stammen is dat ze allemaal type IV pili filamenten hebben. Dit zijn fibrillen aanwezig op het celoppervlak. Eenmaal het vreemd DNA op het celoppervlak gebonden is, gaan deze fibrillen het DNA van het buitenmembraan via poriën in het endoplasma of periplasma brengen. Bij Gram-negatieve bacteriën is er nog een tweede stap vereist waarin DNA translocase het vreemd DNA door het binnenmembraan in het endoplasma brengt. De bacteriën die dit

mechanisme bevatten kunnen zowel in de natuur als onder laboratoriumomstandigheden vreemd DNA opnemen [14].



Figuur 10: schematische weergaven van transformaties in bacteriën [14].

2.4.4 Geïnduceerd competente cellen en chemische transformatie

Geïnduceerde competente cellen zijn tijdelijk permeabel gemaakt in het laboratorium. Om competentie te induceren moeten de cellen in de exponentiële groeifase zitten. Bacteriën die zich in dit stadium bevinden zijn actiever en bijgevolg efficiënter om DNA-beschadigingen te herstellen. De voorwaarde om cellen te transformeren zijn hetzelfde als bij natuurlijke competente cellen, er is nood aan vreemd DNA dat opgenomen kan worden door de competente cellen, andere vereisten zijn een transformatie medium, en eventueel een selectiemerker. Een transformatie medium is een medium waar de geïnduceerde competente cellen goed in kunnen groeien, meestal is dit een heel rijk medium zoals SOB of SOC. Een selectiemerker komt van pas om na de transformatie een screeningsmethode te hebben. Op die manier worden de cellen met het juiste insert geselecteerd [13] [15].

De cellen worden tijdelijk permeabel gemaakt door ze na incubatie te resuspenderen in een ijskoude oplossing. Belangrijk hierbij is dat de oplossing tweewaardige kationen bevat ($MnCl_2$, $CaCl_2$,...). Hierdoor gaat de celwand van de bacterie opzwellen. De factoren die nodig zijn voor instroom van vreemd DNA gaan binden aan het plasmamembraan van de bacteriecel. Hierna kan er chemische transformatie plaatsvinden [15].

Wanneer de bacteriën na incubatie met ijskoud water zonder kationen, om elektrische doorslag te voorkomen, behandeld worden kan in de volgende stap elektroporatie plaatsvinden. De ionen die

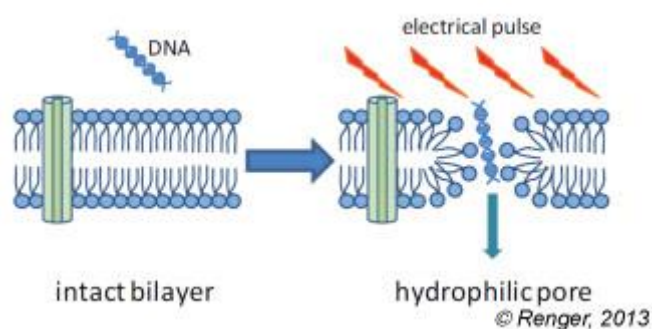
in het medium zitten worden op deze manier van de celwand verwijderd. Zie 2.4.5 voor meer informatie [15].

Om de cellen chemisch te transformeren wordt het vreemd DNA bij de competente cellen geresuspendeerd bij 0°C. De cellen bevinden zich in een CaCl₂ oplossing, waardoor de positieve Ca²⁺ ionen zorgen voor opening van de poriën in het membraan van de bacterie. Verder helpen deze positieve ionen het negatief geladen DNA aan de celmembraan te binden. Hierdoor valt de netto-positieve lading van het DNA weg, en zal de doorgang door het hydrofobe celmembraan vergemakkelijkt worden. Deze doorgang van het DNA wordt gemanipuleerd door de cellen een korte hitteshock te geven van 42°C. Hierdoor ontstaat er een thermische geleiding dat het DNA in de cellen zal doen migreren [15] [16].

2.4.5 Elektroporatie

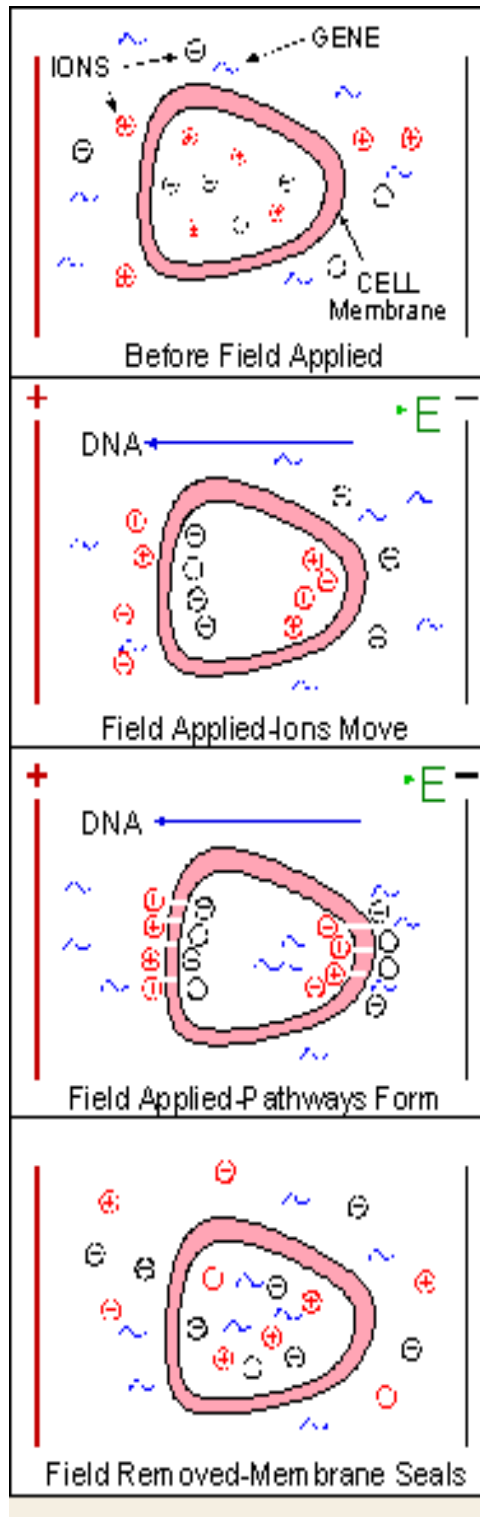
Een andere manier om vreemd DNA in cellen te krijgen is door vorm van elektroporatie. Door het induceren van een elektrisch veld worden smalle poriën in het membraan van cellen gevormd. Hierdoor kunnen stoffen zoals bijvoorbeeld antibiotica of in dit geval vreemd DNA in de cel binnenstromen doorheen de gevormde poriën. Het proces is ingewikkelder en duurder dan chemische transformatie want de elektrische pulsen moeten gecontroleerd en kortstondig plaatsvinden. Daarom is er nood aan speciaal ontwikkelde apparatuur in de vorm van een elektroporator en dient transformatie plaats te vinden in een speciaal elektroporatiecuvette om een elektrisch veld aan te leggen tussen de positieve en negatieve elektrodes [16] [17].

Dit meerstapsproces start met een korte elektrische puls van 12.5KV/cm van ongeveer 5 milliseconde. Hierdoor vindt er een structurele verandering plaats in de fosfolipiden dubbellaag. De dipolen van de lipedemoleculen en de tijdelijke permeabiliteit die verkregen wordt bij de dubbellaag aan ionen, zorgen voor een versterkt effect bij de elektroporatie. Door tijdelijke verandering van conformaties in de twee lagen van de lipide moleculen gaat deze bilag verzwakken. Dit kan doordat de bestaande hydrofobe poriën eerst uitgebreid worden en er ook structurele stabielere hydrofiele poriën ontstaan. Figuur 11 geeft weer hoe onder vorm van een korte elektrische impuls deze poriën ontstaan [16] [17].



Figuur 11: ontstaan van hydrofiele poriën [16].

Nadat de hydrofiele poriën ontstaan zijn, gaan onder invloed van het elektrisch veld, gevormd door de positieve en negatieve elektrode de ionen migreren volgens hun lading. Dit proces vindt zowel intra- als extracellulair plaats en de ionen verplaatsen zich volgens hun lading naar de juiste zijde van de bacterie. Door deze verplaatsing zal het membraanpotentialaal veranderen waardoor het vreemd DNA de cel kan binnen migreren. Door het opheffen van het elektrisch veld, gaan de poriën in het membraan zichzelf herstellen en valt deze influx van vreemd DNA terug weg. Op figuur 12 van de volgende pagina worden de verschillende processen die zich afspelen weergegeven [17].



Figuur 12: Elektroporatieproces waarbij er een spanningsveld gecreëerd wordt door de positieve en negatieve elektrode [18].

2.4.6 Triparentale conjugatie

Triparentale mating is een vorm van bacteriële conjugatie waarbij een plasmide dat aanwezig is in de helperstam (*E.coli* pRK600) helpt in het overbrengen van een mobiliseerbaar plasmide (DG1/pK18mob met de ABC-transporter en regulator vervangen door een tetracycline cassette) in een andere bacterie (CH34) om homologe recombinatie te introduceren.

Zoals reeds vermeld in 2.3.2 worden de juiste transformanten geselecteerd op 284 gluconaat Tc20. Ter controle worden deze stammen uitgeplaat op 284 gluconaat Tc20 en 284 gluconaat Km1500. Aangezien de correcte transconjuganten Km gevoelig zijn en Tc resistent [19].

2.5 Screeningsmethoden

2.5.1 Optische densiteit bij 600 nm

Om te achterhalen of bacteriën in bepaalde omstandigheden kunnen groeien en om deze groeisnelheid te bepalen wordt de toename van bacteriën in een populatie bepaald door de optische densiteit bij 600nm (OD_{600nm}) te meten. De OD wordt gemeten door een (spectro)fotometer. Het onderliggende principe is gebaseerd op lichtverstrooiing door de cellen, dat hierdoor de foto-elektrische cel niet meer bereikt. Dus het elektrisch signaal is zwakker dan bij een bacteriecel vrije cuvette [20].

De OD van een bacteriële suspensie is dus geen absorbantie meting want de meeste bacteriecellen zijn kleurloos en licht absorptie is dus te verwaarlozen. De correcte term is turbiditeit of troebelheidsmeting. Alleen sterk gepigmenteerde cellen in bacteriën kunnen een significante hoeveelheid licht absorberen bovenop de licht weerkaatsing [20].

Om te voorkomen dat er te veel bacteriecellen sterven, wordt bij UV-spectroscopie gekozen voor een golflengte van 600nm [20].

De verschillende stammen worden opgekweekt in vloeibaar medium met verschillende zinkconcentraties. De bekomen OD_{600nm} waarden worden hierna uitgezet in een grafiek om een grafische voorstelling te verkrijgen van de resistentie van de stammen tegen zink.

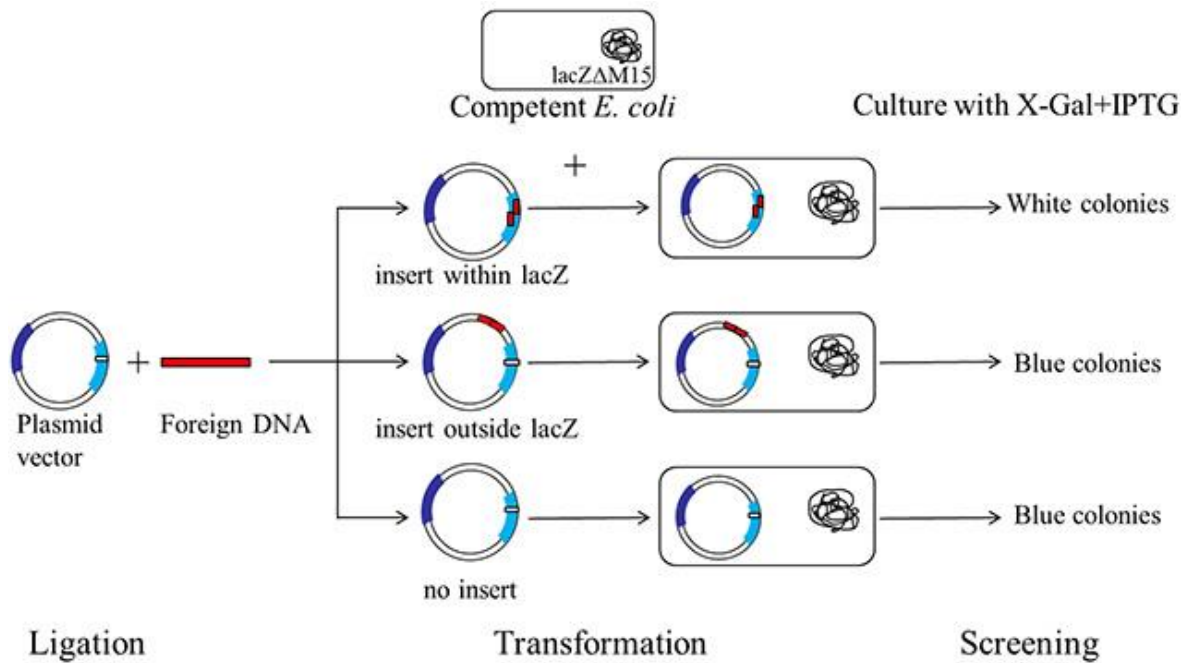
2.5.2 Blauw-wit screening

Een van de gebruikte electiemerkers bij kloneringen is een blauw-wit screening. De aanwezigheid van lactose in de omgeving activeert het *lacZ* operon in *E. coli*. De activatie van het *lacZ* operon zorgt ervoor dat de bacterie het enzym β -galactosidase gaat produceren. Dit enzym gaat lactose metaboliseren. De meeste plasmide vectors dragen een kort segment van het *lacZ* gen (*lacZ* α) dat coderende informatie bevat voor de eerste 146 aminozuren van β -galactosidase. De competente *E. coli* stam dragen een *lacZ* Δ M15 mutatie. Wanneer de plasmide vector wordt opgenomen door deze cellen vindt er een α -complementatie plaats waardoor er een functioneel β -galactosidase geproduceerd wordt [21].

De gebruikte plasmide vectoren worden zo gemanipuleerd dat dit α -complementatie proces kan gebruikt worden als merker bij kloneringen waarbij een multiple cloning site (MCS) aanwezig is in de *lacZ* sequentie van de plasmide vector. Deze plaats kan geknipt worden door restrictie-enzymen, waarna er vreemd DNA ingebracht kan worden. Wanneer een plasmide vector met DNA insert wordt opgenomen door een competente *E. coli*, zal de α -complementatie niet plaatsvinden. Er wordt dus geen functioneel β -galactosidase gevormd. Wanneer het vreemd DNA niet wordt opgenomen in de vector, of opgenomen op een andere plaats dan de MCS, zal het *LacZ* gen in de plasmide vector de *lacZ* mutatie in de competente cel complementeren waardoor er een functioneel enzym gevormd worden [21].

Om te screenen wordt gebruikt gemaakt van een substraat dat X-gal noemt. Dit substraat wordt toegevoegd aan de agarplaat. Als β -galactosidase geproduceerd wordt zal X-gal hydrolyseren tot 5-bromo-4-chloro-indoxyl, dat spontaan een onoplosbaar blauw pigment gaat vormen 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo. De niet-recombinante kolonies zullen daarom blauw worden en de recombinante blijven wit. Hierna kunnen de gewenste kolonies makkelijk opgezuiverd worden [21].

Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) wordt samen met X-gal gebruikt voor blauw-wit screening. IPTG is een niet-metaboliseerbaar analoog van galactose dat de expressie van het *lacZ* gen gaat induceren. Het is geen substraat voor β -galactosidase, voor visuele selectie is X-gal vereist. Figuur 13 geeft een schematisch overzicht van een blauw-wit screening [21].



Figuur 13: schematisch overzicht van een blauw-wit screening [21].

2.6 Overzicht bacteriële stammen

Om de exacte rol van de ABC-transporter in CH34 te onderzoeken wordt gebruik gemaakt van verschillende constructen en verschillende merkers om de juiste constructen te selecteren. Zo bestaat de ABC-type suiker transporter uit een pomp gecodeerd door Rmet_2229 tot en met Rmet_2234 (zie figuur 4) en een transcriptionele regulator GlpR (Rmet_2235). In het **eerste experiment** van de bachelorproef worden de verschillende stammen opgekweekt en hun zinkresistentie bepaald. Het **tweede experiment** van de bachelorproef is zoals vermeld in puntje 2.2.3 het kweken van verschillende *Rhizobium* stammen om te bepalen of de ABC-transporter de enige essentiële factor is in het gebruik van glycerol als koolstofbron en of er verhoogde zinkresistentie waarneembaar is bij de *glpR*-knockout. **Als derde en laatste experiment** wordt de invloed van de individuele genen van de pomp bij verhoogde zinkresistentie van CH34 onderzocht. Aangezien de coderende sequentie van de ABC-transporter op chromosoom 1 ligt, en dit moeilijker te manipuleren is, wordt er eerste een construct gemaakt waarin de pomp en de repressor zijn uitgeschakeld. Daarna wordt een plasmide ingebracht die de pomp bevat. Nu kan het plasmide eenvoudig aangepast worden door bijvoorbeeld een gen van de pomp uit te schakelen en te kijken of dit een effect heeft op de complementatie en groei op zink.

In tabel 3 wordt een overzicht gegeven van de gebruikte bacteriën en plasmiden. Het experiment waarin deze stammen gebruikt worden staan in de overeenkomstige kleur, sommige stammen worden in meerdere experimenten gebruikt en zijn daarom **grijs gemarkeerd**. In tabel 4 is een overzicht van de gebruikte primers met herkenningsplaats voor de restrictie-enzymen [6].

Tabel 3: Overzicht gebruikte bacteriestammen en plasmiden [6].

Bacterie of plasmide	Genotype hoofdkenmerken	en	Antibioticaresistentie
<i>C. metallidurans</i>			

Bacterie of plasmide	Genotype hoofdkenmerken	en	Antibioticaresistentie
CH34	pMOL28 en pMOL30	Zn ^R	/
CH34 ^{Zn^R}	pMOL28 en pMOL30	Zn ^R	/
CH34 Δ glpR::tet	glpR vervangen door tetracycline cassette		Tc ^R
CH34 Δ Rmet_2229_34::tet	Rmet_2229 tot Rmet_2234 vervangen door tetracycline cassette		Tc ^R
CH34 Δ Rmet_2229_35::tet	Pomp en transcriptionele regulator vervangen door tetracycline cassette		Tc ^R
AE104	Δ pMOL28 en pMOL30		
E. coli			
DG1	<i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> , modification-, restriction-) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>		/
HB101	F ⁻ <i>mcrB</i> <i>mrr</i> <i>hsdS20</i> (<i>rB</i> - <i>mB</i> -) <i>recA13</i> <i>leuB6</i> <i>ara-14</i> <i>proA2</i> <i>lacY1</i> <i>galK2</i> <i>xyl-5</i> <i>mtl-1</i> <i>rpsL20</i> <i>glnV44</i> λ -		
<i>E. coli</i> pK18mob Rmet_2229-2234::tet	Rmet_2229 tot Rmet_2234 vervangen door tetracycline cassette		Tc ^R
<i>E. coli</i> pk18mob Rmet_2229-2235	<i>E. coli</i> met ABC-transporter en transcriptionele regulator		Tc ^R
<i>E. coli</i> pk18mob Rmet_2229_2235::tet	<i>E. coli</i> met ABC-transporter en transcriptionele regulator vervangen door tetracycline cassette		Tc ^R Km ^R
Rhizobium leguminosarum			
VF39SM	wildtype		
LRS3934 01 -C-D	Stam zonder plasmide C en D		
VFSM <i>glpR</i>	<i>glpR</i> -knockout		
Plasmide			
pRK600	Helper plasmide;		Cm ^R
pBBR1MCS-2	<i>lacZ</i> α <i>ori</i> pBBR1 <i>oriT</i>		Km ^R
pACYC184	p15A <i>ori</i>		Cm ^R Tc ^R
pK18mob	<i>lacZ</i> α <i>oriT</i> <i>oriV</i>		Km ^R
<i>pglpR</i>	<i>glpR</i> in pK18mob,		Km ^R
pRmet_2229_34	Rmet_2229_34 in pK18mob,		Km ^R
<i>pglpR</i> ::tet	<i>glpR</i> ::tet in pK18mob,		Tc ^R Km ^R
pRmet_2229_34::tet	Rmet_2229_34::tet in pK18mob,		Tc ^R Km ^R
pK18mob_2229_2235	Plasmide met ABC transporter		Km ^R
pK18mob_2229_2235::			Tc ^R Km ^R
pBBRMCS2::_2229_2234	Plasmide met complementaire pomp		Tc ^R Km ^R

^S= gevoelig en ^R= resistent

Tabel 4: overzicht gebruikte primerparen [6].

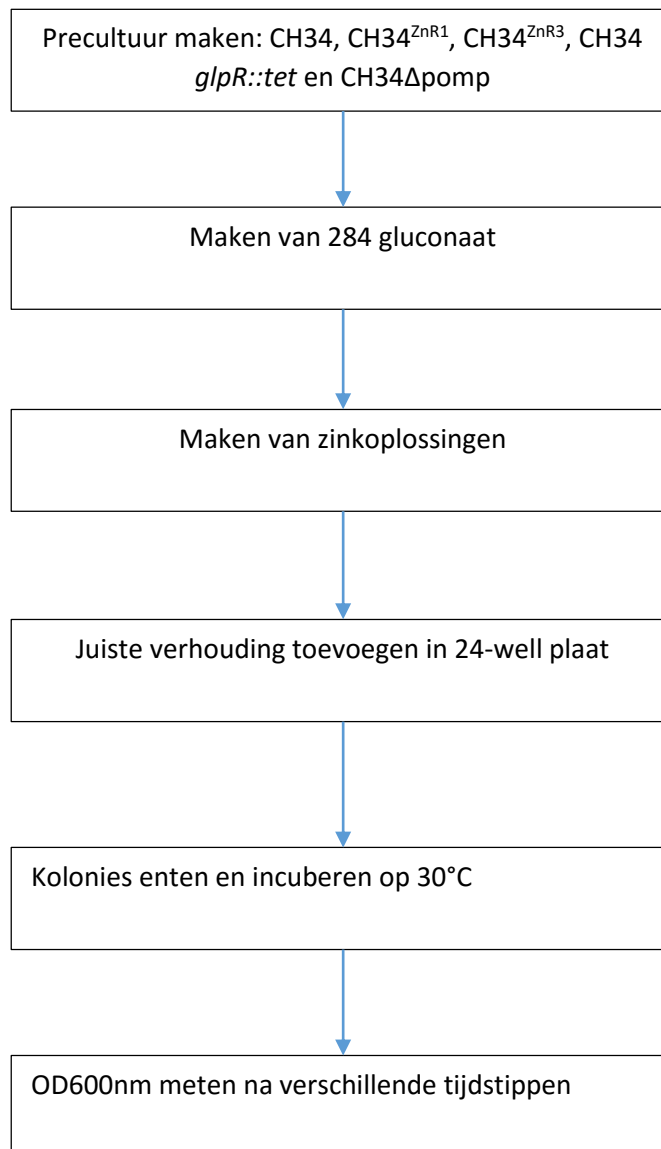
Primerpaar	Restrictie-enzym	5'-3'-Sequentie
Rmet_2235_Fw	<i>HindIII</i>	GATCAAGCTTCGGCATCGGGATGGAAATGT
Rmet_2235_Rv	<i>EcoRI</i>	GATCGAATTCACCGGATTTATCCTCACGCT
Rmet_2235_tet_Fw	<i>SpeI</i>	GTTGACTAGTGTTTCGTCGATAGAGGCAAAGC
Rmet_2235_tet_Rv	<i>XbaI</i>	ACCATCTAGAGACACGATGCTGCAGGAAAGC
Tet_Fw	<i>SpeI</i>	GATCACTAGTTCAGCCCCATACGATATAAG
Tet_Rv	<i>XbaI</i>	GTACTCTAGATGGAGTGGTGAATCCGTTAG
Rmet_2229_Fw	<i>EcoRI</i>	GATCGAATTCATGCATTGCTGAGCTTCG
Rmet_2234_Rv	<i>HindIII</i>	GATCAAGCTTCCACCTTGAAGTCCGGATA
Rmet_2229_tet_Fw	<i>SpeI</i>	CAACACTAGTCGAAACCATCGCCTATGACAAGC
Rmet_2234_tet_Rv	<i>XbaI</i>	ACCATCTAGAAGACCATCGACACGTTGCGTTC
Rmet_2229_3'_EcoRI	<i>EcoRI</i>	GATCGAATTCATGCATTGCTGAGCTTCG
R_2235_3'_HindIII	<i>HindIII</i>	GATCAAGCTTACCGGATTTATCCTCACGCT
Rmet_2229_tet_Rv_BcuI	<i>BcuI</i>	CAACACTAGTCGAAACCATCGCCTATGACAAGC
R_2235_tet_Rv_BspTI	<i>BspTI</i>	ACCACTTAAGGACACGATGCTGCAGGAAAGC
Ampli.tet_5	<i>SpeI</i>	GATCACTAGTTCAGCCCCATACGATATAAG
Ampli.tet_3_BspTI	<i>BspTI</i>	TTATCTTAAGTGGAGTGGTGAATCCGTTAG
R_2234_2_5'_HindIII	<i>HindIII</i>	GTTGAAGCTTGTTCGTCGATAGAGGCAAAGC

Herkenningsplaats van restrictie-enzymen zijn onderstreept

3 Materiaal en methoden

3.1 Invloed van de transcriptionele regulator op zinkresistentie.

In dit experiment wordt de rol van de ABC-transporter bij verhoogde zinkresistentie geëvalueerd. Er wordt gebruik gemaakt van de parentale CH34 stam, twee mutanten namelijk CH34^{ZnR1} en CH34^{ZnR3} en van twee zelfgemaakte constructen: eentje waar de repressor is uitgeschakeld CH34 *glpR::tet* en eentje waar de pomp is uitgeschakeld CH34Δpomp. De kolonies worden van een precultuur overgeënt in media met een verschillende zinkconcentratie op een 24-well plaat. Hierbij wordt om de 12 à 24 uur de OD_{600nm} gemeten.



Materialen

3.1.1 Overzicht gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables

hardware	Merk en type	doel
Vortex	/	Oplossingen homogeniseren
micropipet	Gilson	Kleine vloeistofvolumes pipeteren
Bunzenbrander	/	Steriel werken
Spectrofotometer	Clariostar	OD _{600nm} meten
Incubator 30°C	IMV	Ideale groeitemperatuur instellen

3.1.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

hardware	doel
Pipettips	Kleine hoeveelheden vloeistof overbrengen
Handschoenen	Contaminatie vermijden
Rekjes voor microtubes	Houder voor microtubes
Papieren zakdoekjes	Labobench schoonmaken
Stift	Merken van microtubes
24 well plaat	Plaat met 24 wellen om bacteriën in op te kweken
entoog	Bacteriën oppikken
Petriplaten	voedingsbodems

3.1.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	MW samenstelling (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	doel	Afvalverwijdering
284 gluconaat	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Medium voor CH34 bacterie	Risico houdend afval
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	VI	≥99.0%	H302 H318 H410	P273 P280 P305+P351+ P338 P508	Zinkoplossing	Risico-houdend afval
milliQ	VI	/	/	/	Oplosmiddel	gootsteen

3.1.4 Overzicht stalen met oorsprong en identificatie

staalcode	Aard van het staal	oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	afvalverwijdering
CH34	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval
CH34 _{Znr1}	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval
CH34 _{Znr3}	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval
CH34 <i>glpR::tet</i>	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval
CH34Δpomp	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval

Methoden

3.1.5 Werkschema

- Haal de vier stammen uit de -80°C diepvries
- Neem op aseptische wijzen met een entoog een deel van elke stam
- Breng dit in 5 ml vl 284 gluconaat
- Vortex goed
- Laat overnacht schuddend incuberen bij 30°C
- Maak een zink-oplossing van 1M ZnSO₄ · 7H₂O
- Pipeteer 284 gluconaat, de zinkoplossing en telkens 10 µl van de juiste cel suspensie volgens onderstaand pipeteerschema. Idem aan onderstaande plaat werd er nog een andere 24-well plaat gemaakt met hierin een drievoudige herhalingsreeks van CH34 met de repressor uitgeschakeld.

schema 24-well plaat												
	1		2		3		4		5		6	
CH34	0 mM zink	5 mM zink		10 mM zink		15 mM zink		20 mM zink		25 mM zink		
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	CH34	10	CH34	10	CH34	10	CH34	10	CH34	20	CH34	10
	Zn	0	Zn	10	Zn	20	Zn	30	Zn	40	Zn	50
	medium	1990	medium	1980	medium	1970	medium	1960	medium	1940	medium	1940
CH34Zn1	0 mM zink	5 mM zink		10 mM zink		15 mM zink		20 mM zink		25 mM zink		
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	CH34Zn1	10	CH34Zn1	10	CH34Zn1	10	CH34Zn1	10	CH34Zn1	10	CH34Zn1	10
	Zn	0	Zn	10	Zn	20	Zn	30	Zn	40	Zn	50
	medium	1990	medium	1980	medium	1970	medium	1960	medium	1950	medium	1940
CH34 glpR::tet	0 mM zink	5 mM zink		10 mM zink		15 mM zink		20 mM zink		25 mM zink		
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	CH34 glpR	10	CH34 glpR	10	CH34 glpR	10	CH34 glpR	10	CH34 glpR	10	CH34 glpR	10
	Zn	0	Zn	10	Zn	20	Zn	30	Zn	40	Zn	50
	medium	1990	medium	1980	medium	1970	medium	1960	medium	1950	medium	1940
CH34Δpomp	0 mM zink	5 mM zink		10 mM zink		15 mM zink		20 mM zink		25 mM zink		
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	CH34Δpomp	10	CH34Δpomp	20	CH34Δpomp	20	CH34Δpomp	20	CH34Δpomp	20	CH34Δpomp	20
	Zn	0	Zn	10	Zn	20	Zn	30	Zn	40	Zn	50
	medium	1990	medium	1970	medium	1960	medium	1950	medium	1940	medium	1930

- Belangrijk is dat deze proef in 3 herhalingen wordt uitgevoerd
- Incubeer de 24 well-plaat al schuddend bij 30°C
- Meet de OD_{600nm} op geregelde tijdstippen

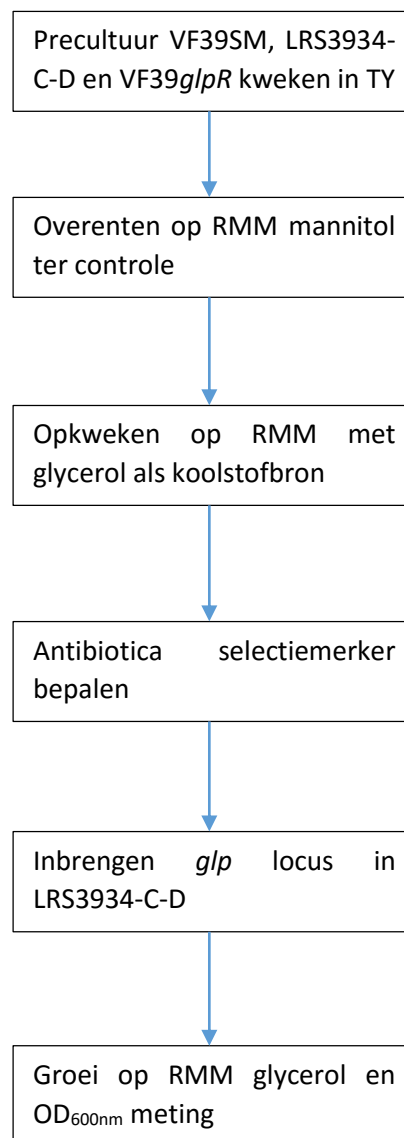
3.1.6 OD600nm meting

- Open de software op de computer
- Steek de 24-well plaat in de Clariostar
- Druk op 24-well plaat OD600_{nm} meting
- Open de resultaten
- Druk op knop exporteer resultaten naar Excel
- Sla de resultaten op

3.2 Groei van *Rhizobium leguminosarum* op glycerol

De ABC-transporter in CH34 is een glycerolpomp, dus de bacterie kan overleven in een medium met glycerol als enige koolstofbron. Bij *Rhizobium leguminosarum* ligt het locus voor deze transporter op één van de twee megaplasmiden. Door het *glp* locus (ABC transporter, transcriptionele regulator, *glpR* en *glpD*) in te brengen in een *Rhizobium leguminosarum* stam die de twee megaplasmiden niet bevat (LRS3934-C-D), kan onderzocht worden of dit locus noodzakelijk is voor groei in glycerol.

Door de groei op glycerol tussen de wildtype (VF39SM), een *Rhizobium* stam *glpR* knockout (VF39*glpR*) te vergelijken met een stam waar het *glp* locus is ingebracht kan dit experiment een antwoord bieden op de vraag of de ABC-transporter de enige verantwoordelijke is voor groei op glycerol.



Materialen

3.2.1 Overzicht gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables

hardware	Merk en type	doel
Vortex	/	Oplossingen homogeniseren
Micropipet	Gilson	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Bunzenbrander	/	Steriel werken
Spectrofotometer	Clariostar	OD _{600nm} meten
Incubator 30°C	IMV	Ideale groeitemperatuur instellen

3.2.2 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

hardware	doel
Pipettips	Kleine hoeveelheden vloeistof overbrengen
Handschoenen	Contaminatie vermijden
Rekjes voor microtubes	Houder voor microtubes
Papieren zakdoekjes	Labobench schoonmaken
Stift	Merken van microtubes
24 well plaat	Plaat met 24 wellen om bacteriën in op te kweken
Entoog	Bacteriën oppikken
Tandenstokers	Kolonies oppikken
Petriplaten	voedingsbodems

3.2.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	doel	Afvalverwijdering
TY-medium	/	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Medium voor bacterie	Risico houdend afval
RMM mannitol	/	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Medium voor bacterie	Risico houdend afval
RMM glycerol	/	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Medium voor bacterie	Risico houdend afval
Saline	/	VI	/	/	/	Fysiologische zoutoplossing	Gootsteen
Ampiciline	/	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	antibiotica	gootsteen

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	doel	Afvalverwijdering
Tetracycline	/	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	antibiotica	gootsteen
Carbenicilline	/	VI	/	/	Dragen van handschoenen en bril	antibiotica	gootsteen
kanamycine	/	VI	/	/	handschoenen en bril	antibiotica	gootsteen

3.2.4 Overzicht stalen met oorsprong en identificatie

staalcode	Aard van het staal	oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	afvalverwijdering
VF39SM	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval
LRS3934 01 –C-D	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval
VF39SM glpR	Bacterie-suspensie	bacterieel	Dragen van handschoenen +handen ontsmetten	Risico houdend afval

Methoden

3.2.5 Werkschema

- Haal de vier stammen uit de -80°C diepvries
- Neem op aseptische wijzen met een entoog een deel van elke stam
- Breng dit in 5 ml VI TY-medium
- Vortex goed
- Laat overnacht schuddend incuberen bij 30°C
- Bewaar de vloeibare VF39 cultuur voor later
- Breng de stammen over op RMM mannitol
- Incubeer bij 30°C tot er visuele groei waarneembaar is
- Pik aseptisch één kolonie vormende eenheid (kve) op met een tandenstokertje en wrijf dit uit in saline
- Neem met een entoog een beetje van de druppel saline en strijk dit uit op RMM glycerol platen en ter controle ook op RMM manitol platen. Zo is er steeds van dezelfde (kve) vertrokken
- Incubeer bij 30°C tot er visuele groei waarneembaar is
- Neem de vloeibare VF39 precultuur
- Neem een 24-well plaat om de antibiotica resistentie te testen

- Pipeteer volgens onderstaand schema.

VF39												
	1		2		3		4		5		6	
Amp	c= 50 µg/ml		c= 100 µg/ml		c= 200 µg/ml		c= 300 µg/ml		c= 400 µg/ml		c=500µg/ml	
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20
	Amp	1	Amp	2	Amp	4	Amp	6	Amp	8	Amp	10
	medium	1979	medium	1978	medium	1976	medium	1974	medium	1972	medium	1970
Cb	c= 50 µg/ml		c= 100 µg/ml		c= 200 µg/ml		c= 300 µg/ml		c= 400 µg/ml		c= 500 µg/ml	
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20
	Cb	1	Cb	2	Cb	4	Cb	6	Cb	8	Cb	10
	medium	1979	medium	1978	medium	1976	medium	1974	medium	1972	medium	1970
Tc	c= 10 µg/ml		c= 20 µg/ml		c= 40 µg/ml		c= 60 µg/ml		c= 80 µg/ml		c= 100 µg/ml	
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20
	Tc	1	Tc	2	Tc	4	Tc	6	Tc	8	Tc	10
	medium	1979	medium	1978	medium	1976	medium	1974	medium	1972	medium	1970
Km	c= 25 µg/ml		c= 50 µg/ml		c= 100 µg/ml		c= 150 µg/ml		c= 200 µg/ml		c= 250 µg/ml	
	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000	totaal	2000
	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20	VF39	20
	Km	1	Km	2	Km	4	Km	6	Km	8	Km	10
	medium	1979	medium	1978	medium	1976	medium	1974	medium	1972	medium	1970

- Maak TY-platen met de geschikte antibiotica merker.
- Vertrek vanuit één kve, en strijk de stammen met een entoog op TY en TY met de antibioticamerker
- Er mag geen visuele groei waarneembaar zijn op de TY met antibioticamerker platen.

3.2.6 Elektrocompetente LRS-C-D

- Maak een precultuur van één kve in TY-medium met de juiste antibioticamerker
- Laat al schuddend overnacht opkweken bij 30°C.
- Maak een 20 tot 50x verdunde startcultuur in een erlenmeyer van 500 ml met een totaalvolume van 100 ml (zodat de cultuur goed kan schudden)
- Bepaal de start OD_{600nm}
- Laat schuddend incuberen bij 30°C
- Meet ieder uur en iedere 15 minuten de OD_{600nm} wanneer deze boven 0.2 is
- Wanneer de OD-waarden tussen de 0.4 en 0.6 is, zet de cultuur op ijs voor 15-20 min
- Zet water en glycerol (10%) op ijs
- Verdeel de cultuur over 4x25ml centrifugeerbuisjes
- Centrifugeer 5min op 4°C bij 5000 rpm
- Verwijder het supernatans af
- Was met 25 ml ijswater en vortex de pellet terug los
- Herhaal deze stap met 10 ml water
- Resuspendeer de pellet met 1 ml water in epjes
- Centrifugeer 5 min op 4°C bij 5000 rpm
- Verwijder het supernatans
- Was de pellet met 500 µl glycerol (10%) en resuspendeer tot deze terug is opgelost
- Verwijder het supernatans
- Breng de inhoud van alle microcentrifugeerbuisjes samen en los op in 200 µl glycerol (10%)
- Verdeel 40 µl in microcentrifugebuisjes
- Bewaar in de -80°C tot verder gebruik

3.2.7 Elektroporatie

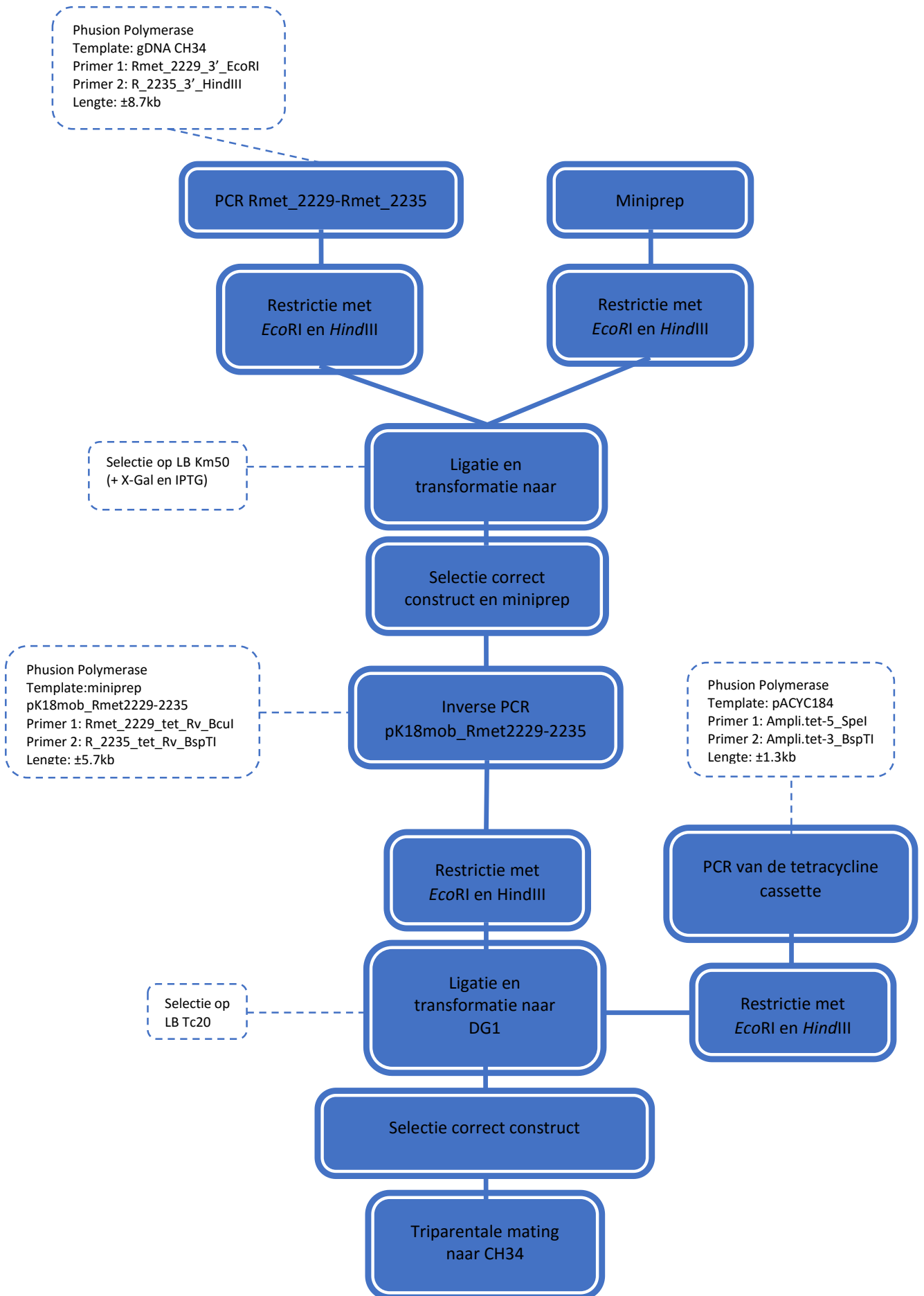
- Werk steeds steriel! Werk op ijs!
- Voeg 2 tot 4 μ l plasmide toe aan de competente cellen
- Doe het mengsel in de elektroporatiecuvette die op ijs staat
- Zet de cuvette in de elektroporator
- Elektroporeer op 1800V door 2x op de knop te duwen
- Zet onmiddellijk terug op ijs
- Breng 1 ml TY-medium bij de cellen
- Breng dit over naar een 1.5 ml epje en incubeer al schuddend gedurende een dag op 30°C
- Breng 100, 10-1 en 10-2 concentraat op een TY-plaat met juiste selectiemerker
- Laat overnacht incuberen bij 30°C
- Pik de juiste kve's eruit, breng deze over in een druppel saline en plaat uit op TY-platen met de juiste selectiemerker om ze herop te zuiveren en laat gedurende 4/5 dagen incuberen bij 30°C
- Breng dezelfde kve's ook over op RMM glycerol en zet ter controle de parentale LRS stam en een gewone VF39 stam op RMM glycerol
- Maak opnieuw een selectie van de juiste kve's, groei overnacht op in vloeibaar medium met de juiste selectiemerker en doe een miniprep, gevolgd door een sequentie-analyse

3.3 Invloed van de individuele genen van de pomp in zinkresistentie van CH34

In dit deexperiment wordt nagegaan welk(e) gen(en) in de pomp verantwoordelijk zijn voor de verhoogde zinkresistentie bij CH34. Aangezien de coderende sequentie van de ABC-transporter op de pomp ligt en het moeilijker is om zo de invloed van de individuele genen te meten, wordt er eerst een construct gemaakt waarin de pomp en de repressor zijn uitgeschakeld. Daarna wordt een plasmide ingebracht die de pomp bevat. Nu kan het plasmide eenvoudig aangepast worden door bijvoorbeeld een gen van de pomp uit te schakelen en te kijken of dit een effect heeft op de complementatie en groei op zink.

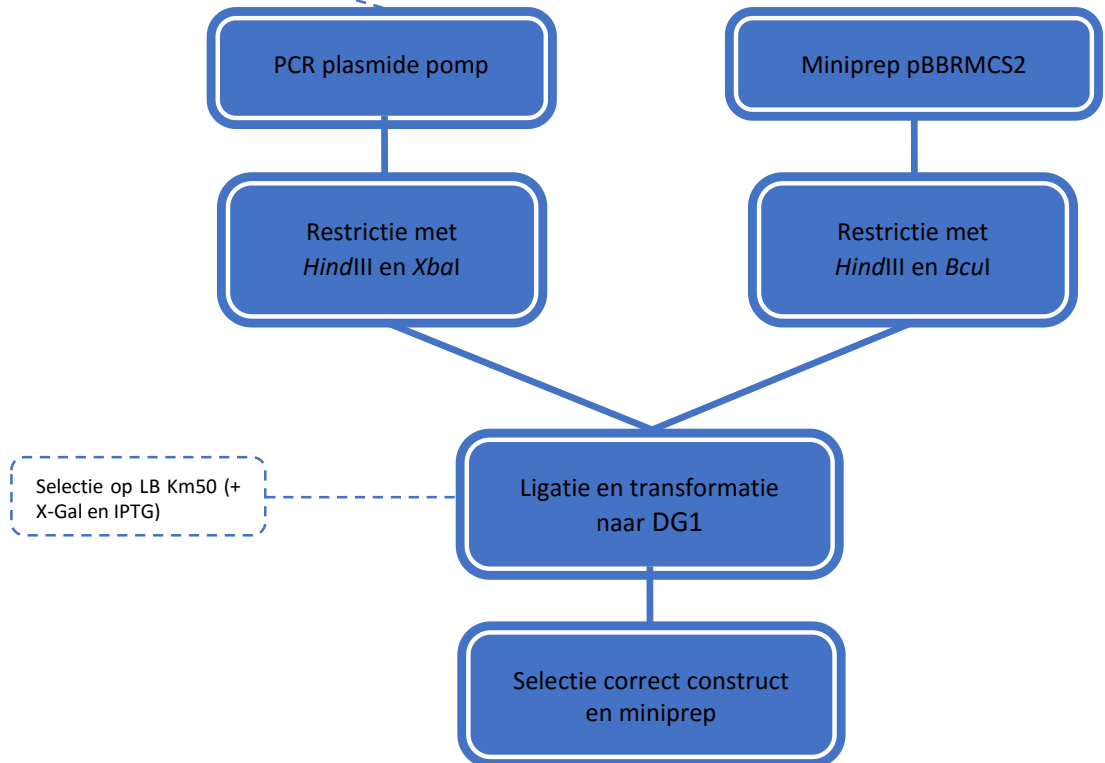
Aanmaak mutant pomp + repressor (Rmet_2229-Rmet_2235)

Zie volgende pagina



Aanmaak complementaire pomp

Phusion Polymerase
Template: gDNA CH34
Primer 1: Rmet_2229_3'_EcoRI
Primer 2: R_2235_3'_HindIII
Lengte: ±7kb



Materialen

3.3.1 Overzicht gebruikte apparatuur

hardware	Merk en type	doel
Micropipetten	Gilson	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Incubator 30°C	IMV	Ideale groeitemperatuur instellen
Incubator 37°C	IMV	Ideale groeitemperatuur instellen
Vortex	/	Oplossingen homogeniseren
Centrifuge	Eppendorf type 5424	Centrifugeren
Thermocycler	Veriti	PCR-toestel
UV/VIS reader	Trinean Xpose	DNA-concentratie bepalen
Gel-elektroforesetank	/	Gel-elektroforese
Elektroporator	/	Elektrisch veld creëren
UV-transilluminator	/	Gel bekijken

3.3.2 Overzicht van gebruikt glaswerk en disposables

hardware	doel
filtertips	PCR-reagentia aseptisch pipetteren
1,5ml-microtubes	vloeistofcontainer
2,0ml micro-tubes	Vloeistofcontainers
Spinkolom	DNA extracties
Entoog	Kolonies overenten
Tandenstoker	Kolonies opprikken
Drigalski spatel	Kolonies uitstrijken
Petriplaten	Voedingsbodems

3.3.3 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Stofnaam of oplossing	Vast of vloeibaar	MW	stof of oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	doel	Afvalverwijdering
Phusion HF buffer	VL	5x		/	Dragen van handschoenen en bril	Ideale buffer voor PCR	/
dNTP's	VL	10 mM		/	Dragen van handschoenen en bril	Bouwstenen van DNA	/
Forward primer	VL	10µM		/	Dragen van handschoenen en bril	Startplaats voor DNA-amplificatie	/
Reverser primer	VL	10µM		/	Dragen van handschoenen en bril	Startplaats voor DNA-amplificatie	/
Phusion DNA-polymerase	VL	1unit per 50 µl PCR		/	Dragen van handschoenen en bril	Ketenverlenging	/

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	doel	Afvalverwijdering
Nuclease vrij water	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Aanlengen mastermix	/
Cel resuspensie buffer	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Cellen resuspenden	Risico houdend afval
Cel lysis buffer	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Cellen lyseren	Risico houdend afval
Alkaline protease buffer	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Eiwitten lyseren	Risico houdend afval
Neutralisatie buffer	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	DNA stabiliseren	Risico houdend afval
Wasoplossing	VL	75 % ethanol	/	Dragen van handschoenen en bril	DNA wassen	Risico houdend afval
Membraan bindende oplossing	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	DNA binden	Risico houdend afval
Membraan was oplossing	VL	75 % ethanol	/	Dragen van handschoenen en bril	DNA wassen	Risico houdend afval
IPTG	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Niet metaboliserende analoog van galactose	/
X-gal	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Substraat voor β -galactosidase	/
Fast digest restrictie-buffer	VL	10 x	/	Dragen van handschoenen en bril	Restrictie-buffer	/
Restrictie-enzymen voor Fast digest	VL	1 μ l per 25 μ l reactie	/	Dragen van handschoenen en bril	Restrictie-enzymen	/
T4-ligase	VL	2 μ l per 20 μ l reactie	/	Dragen van handschoenen en bril	Restrictie-fragmenten ligen	/

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	doel	Afvalverwijdering
T4 ligase buffer	VL	10 x		Dragen van handschoenen en bril	Ligase buffer	/
Blue loading dye	VL	6x	H315, H319, H335	P305+351+338, P280	DNA op gel laden	/
Gel-red	VL	2.5 µl per 50 µl gel	H301, H315, H319, H335	P261, P262, P305+351+338, P280, P309+311	Visualisatie DNA onder UV-licht	/
1kb + ladder	VL	/	/	Dragen van handschoenen en bril	Lengtemeter	/
Agarose	V	/	H332	P216	Gelvorming	/
Tris-borare-EDTA (TBE)	VL	10x	/	Dragen van handschoenen en bril	Conductiviteit bevorderen	Apart 10 liter vat

3.3.4 Overzicht stalen met oorsprong en identificatie

staalcode	Aard van het staal	oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	afvalverwijdering
CH34	Bacterie suspensie	Bacterieel	Handschoenen dragen + handen ontsmetten	Risico houdend afval
DG1 <i>E. coli</i>	Competente cellen	Bacterieel	Handschoenen dragen + handen ontsmetten	Risico houdend afval
pK18mob	Plasmide	Bacterieel	Handschoenen dragen + handen ontsmetten	Risico houdend afval
pACYC184	Plasmide	Bacterieel	Handschoenen dragen + handen ontsmetten	Risico houdend afval
<i>E. coli</i> pRK600	Bacterie suspensie	Bacterieel	Handschoenen dragen + handen ontsmetten	Risico houdend afval
pBBRMCS2	Plasmide	Bacterieel	Handschoenen dragen + handen ontsmetten	Risico houdend afval

Methode

3.3.5 PCR

- Oppervlakken, micropipetten, doosjes met pipettips, rekjes, ... desinfecteren met umonium en doe handschoenen aan om kruiscontaminatie te voorkomen
- Maak een werkoplossing van primerpaar Rmet_2229_3'_EcoRI en R_2235_3'_HindIII van 10µM door 20 µl primer op te lossen in 80 µl nuclease vrij water of ultrapuur water
- Neem een ijsbakje en pipetteer volgende componenten van de mastermix bij elkaar volgens onderstaande pipeteerschema van boven naar onder
- Pipetteer het Phusion polymerase als laatste bij de MM en werk steeds zeker op ijs

Voor 1 reactie van 50µl
34 µl nuclease vrij water
10 µl HF buffer (5x)
2.5 µl forward primer (10µM)
2.5 µl reverse primer (10µM)
1 µl Phusion polymerase
49 µl totaal mastermix

- Voeg aan iedere reactie 1 µl genomisch DNA/ plasmide DNA toe van ongeveer 100 ng/µl
- Plaats in de thermocycler en stel in volgens onderstaand algemeen temperatuursprofiel

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd
Initiële denaturatie	98°C	30 seconden
25-35 cycli	98°C	5-10 seconden
	45-72°C	10-30 seconden
	72°C	15-30 seconden/kb
Finale extensie	72°C	5-10 minuten
∞	4°C	

- Voorbeeld Temperatuursprofiel voor PCR pomp+ repressor

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd
Initiële denaturatie	98°C	30 seconden
35 cycli	98°C	10 seconden
	68°C	30 seconden
	72°C	4 min 30 s
Finale extensie	72°C	10 minuten
∞	4°C	

3.3.6 PCR-Clean up met Wizard Gel en PCR-clean up

- Breng een gelijke hoeveelheid membraan bindende oplossing toe aan de totaal hoeveelheid PCR-product
- Breng een Mini-spinkolom in een collectietube
- Pipetteer het mengsel in de spinkolom
- Centrifuge aan 16000 g gedurende 1 minuut
- Zuig het permeaat leeg met de vacuümpomp
- Breng 700 μ l was oplossing toe en centrifuge aan 16000 g gedurende 1 minuut
- Zuig het permeaat leeg met de vacuümpomp
- Breng 500 μ l was oplossing toe en centrifugeer aan 16000 g gedurende 5 minuten
- Gooi de collectietube weg en steek de spinkolom in een 1.5 ml epje
- Laat gedurende een halfuur luchtdrogen
- Breng 50 μ l nuclease vrij water in de spinkolom, laat 1 minuten incuberen en centrifugeer dan aan 16000 g gedurende 1 minuut
- Zuig de DNA-oplossing op met een micro-pipet en breng nogmaals over de spinkolom
- Centrifugeer 1 minuut op 16000g
- Bewaar de DNA-oplossing op -20°C

3.3.7 Agarosegel elektroforese

- Maak een 1% gel, door 1 gram agarose af te wegen in 100 ml TBE buffer
- Verwarm oplossing in de microgolf tot kookpunt en een volledige heldere oplossing zichtbaar is, zwenk een paar keer
- Laat de oplossingen afkoelen tot ze handwarm is, en voeg 5 μ l Gelred toe.
- Giet de agarosegel in de tray
- Plaats kammetje, zorg ervoor dat alle luchtballen verdreven zijn
- Laat de gel stollen en verwijder daarna het kammetje
- Plaats de gel in de elektroforesetank
- Vul de elektroforesetank met TBE buffer tot de gel volledig onderstaat
- Voeg 2 μ l loading dye (6x) toe per 5 μ l staal
- Breng in het eerste en het laatste slotje 2 μ l 1kb+ladder
- Breng in de andere slotjes stalen (7 μ l)
- Maak een legende van alle slotjes
- Zet de spanningsbron aan en laat de gel lopen voor minstens 1 uur op 70 volt
- Haal de gel uit na afloop uit de tank en was de gel met water
- Plaats de gel onder UV-licht in de UV-transilluminator
- Sla de afbeelding van de gel op

3.3.8 Nanodrop

- Om de concentratie DNA te meten wordt gebruikt gemaakt van de nanodrop
- Breng 2 μ l nucleasevrij water op de sensor
- Druk op blanco-measurement
- Breng 2 μ l DNA-staal aan
- Druk op measurement
- Sla de resultaten op

3.3.9 Miniprep pK18mob met Wizard plus SV Minipreps

- Pelleteer 1-10 ml volgroeide cultuur 5 minuten op maximumsnelheid
- Resuspendeer pellet met 250 µl cel resuspensie buffer
- Breng 250 µl cell lysis oplossing toe aan het staal, Meng het staal 4x
- Breng daarna 10 µl alkaline protease oplossing toe en meng opnieuw 4x
- Laat 5 minuten incuberen op kamertemperatuur
- Breng 350 µl neutralisatie oplossing toe en meng opnieuw 4x
- Centrifugeer 10 minuten aan maximumsnelheid
- Breng een mini spinkolom in een collectietube
- Giet het helder lysaat in de spinkolom
- Centrifugeer 1 minuut aan maximumsnelheid
- Zuig de flowthrough leeg met de vacuümpomp
- Breng 750 µl was oplossing toe, centrifugeer 1 minuut aan maximumsnelheid
- Zuig de flowthrough leeg met de vacuümpomp
- Herhaal met 250 µl was oplossing, centrifugeer 2 minuten aan maximumsnelheid
- Breng de spinkolom in een nieuw 1.5ml epje
- Breng 100 µl nuclease vrij water in de spinkolom, laat 1 minuten incuberen en centrifugeer dan aan 16000 g gedurende 1 minuut
- Zuig de DNA-oplossing op met een micro-pipet en breng nogmaals over de spinkolom
- Centrifugeer 1 minuut op 16000g
- Bewaar de DNA-oplossing op -20°C

3.3.10 Restrictie

- Werk steeds op ijs!
- Neem telkens ongeveer een concentratie van 3µg van de te knippen restrictiefragmenten
- Zorg ervoor dat de buffer 1x geconcentreerd in het mengsel zit (fast digest buffer is 10x geconcentreerd)
- Voeg hieraan 2 µl van beide restrictie-enzymen toe.
- Voeg dit alles toe in een 1.5 µl epje en
- Laat gedurende een uur de restrictie-enzymen hun werk doen bij 37°C in een incubator
- Zuiver de restrictie op met Wizard PCR clean-up, meet de concentratie met de nanodrop en controleer de fragmenten met agarose gel elektrofores (AGE)

3.3.11 Ligatie

- Werk steeds op ijs!
- Probeer de ligatie-reactie steeds in maximaal 20 µl uit te voeren
- Bereken een 1/3 moleculaire verhouding van vector t.o.v insert
- Voeg hieraan 2 µl (10x ligatie buffer) aan toe
- Voeg hieraan 2 µl T4-ligase buffer toe
- Laat overnacht incuberen op kamertemperatuur (op de labobench)

3.3.12 Chemische Transformatie

- Werk steeds op ijs! Werk steriel!

- Bereid LB-platen voor met de juiste selectiemerker (LB Tc20 of LB Km50)
- Indien blauw wit selectie vereist is, voeg aan de platen 40 µl IPTG en 40 µl x-gal toe
- Verspreid dit over de platen met een Drigalski-spatel
- Laat de platen drogen en verwarm ze op 37°C
- Stel een warmwaterbad in op 42°C
- Zet een tube SOC-medium klaar
- Neem voor elke reactie, 1 microcentrifugeertube van DG1-competente cellen
- Laat de cellen 5-10 minuten ontdooien op ijs!
- Voeg 1 tot 5 µl van de DNA oplossing toe aan de DG1 competente cellen, Meng door met de pipettip te roeren, zeker niet op en neer pipetteren
- Incubeer 30 minuten op ijs
- Geef de bacteriën een hitteschok op 42°C gedurende 30 seconden
- Breng de tubes meteen terug op ijs
- Voeg 300 µl SOC-medium toe en meng de oplossing goed
- Breng de oplossing over in een 1.5 ml microcentrifugeertube en incubeer al schuddend gedurende een uur op 37°C
- Breng telkens 100 µl van de oplossing over op de hierboven geselecteerde voedingsbodems
- Verspreid dit over de platen met een Drigalski spatel
- Laat overnacht incuberen op 37°C
- Pik de juiste kve's eruit, breng deze opnieuw over op LB-platen met de juiste selectiemerker om ze herop te zuiveren en laat overnacht incuberen op 37°C
- Maak opnieuw een selectie van de juiste kve's, groei overnacht op in vloeibaar medium met de juiste selectiemerker en doe een miniprep, gevolgd een concentratie bepaling met de nanodrop

3.3.13 Elektroporatie

- Werk steeds steriel! Werk op ijs!
- Voeg 2 tot 4 µl plasmide toe aan de competente cellen
- Doe het mengsel in de elektroporatiecuvette die op ijs staat
- Zet de cuvette in de elektroporator
- Elektroporatie: 1800V door 2x op de knop te duwen
- Zet onmiddellijk terug op ijs
- Breng 1 ml SOC-medium bij de cellen
- Breng dit over naar een 1.5 ml microcentrifugeertube en incubeer al schuddend gedurende een uur op 37°C
- Breng 100, 10-1 en 10-2 concentraat op een LB-plaat met juiste selectiemerker
- Laat overnacht incuberen bij 37°C
- Pik de juiste kve's eruit, breng deze opnieuw over op LB-platen met de juiste selectiemerker om ze herop te zuiveren en laat overnacht incuberen op 37°C
- Maak opnieuw een selectie van de juiste kve's, groei overnacht op in vloeibaar medium met de juiste selectiemerker en doe een miniprep, gevolgd door een sequentie-analyse

3.3.14 Sequentie-analyse door Mix2Seq

- De templates moet bestaan uit 15 µl opgezuiverd DNA met de volgende concentraties
- Plasmide DNA tot 15 kb: 50-100 ng/µl
- PCR-producten 150-300 kb: 1ng/µl, 300-1000 bp: 5ng/µl, >1000 bp:10 ng/µl

- Voeg hieraan 2µl van de gekozen primer om te sequencen toe, met een concentratie van 10 µmol/µl (10 µM)
- Zorg ervoor dat het totaal volume van de oplossing (DNA + primer) minimaal 17 µl is
- Pipeteer de oplossing in een Mix2Seq tube en doe het deksel erop
- Noteer de barcode aan de zijkant van de tube
- Stuur op om te sequencen

3.3.15 Triparentale conjugatie

- De drie aparte culturen donor, helper *E. coli* pRK600 en recipient CH34 opkweken in 5ml vloeibare cultuur (LB+ selectiemerker)
- Neem een petriplaat LB met daarop een Pall Corporation filter met poriëndiameter van 45 µm en leg deze op de petriplaat
- Breng van elke cultuur 50 µl op de filter
- Incubeer overnacht op 30°C
- Steek de filter in een falcon tube met 1 ml saline
- Vortex grondig zodat de cellen loskomen van de filter
- Plaat de mix van donor, acceptor en de transconjuganten uit in verdunningen gaande van 100 tot 10⁻⁵ op een 284 tetracycline (selectief medium)
- Laat overnacht incuberen op 30°C
- Er wordt een mengeling van dubbele/enkele recombinante kolonies verkregen
- Maak twee 96 welplaten met 284 Km50 en 284 Tc20
- Breng identiek dezelfde kve's over op beide platen, op dezelfde positie.
- De recombinanten die Tc resistent zijn en Km gevoelig zijn de juiste transconjuganten

4 Resultaten

4.1 Invloed van de transcriptionele regulator bij zinkresistentie

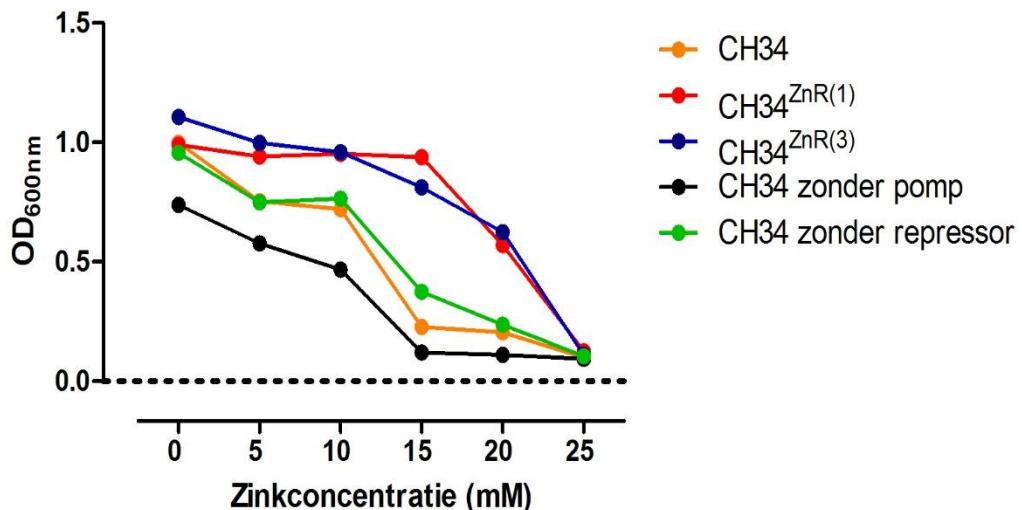
4.1.1 OD_{600nm} metingen

Zoals reeds vermeld speelt de ABC-transporter een belangrijke rol in de verhoogde zinkresistentie van CH34. Daarom is er gestart met het opgroeien van verschillende CH34 stammen in 284 gluconaat waarin verschillende zinkconcentraties in de grootteorde van millimolair zijn aan toegevoegd. Door het vergelijken van twee zinkmutanten CH34^{ZnR1} en CH34^{ZnR3}, waar de transcriptionele regulator (= repressor) niet meer tot expressie komt en bijgevolg de pomp verhoogd tot expressie gebracht wordt met de parentale stam, kan de invloed van de ABC-transporter bewezen worden. Ter controle werd ook een stam waarin de repressor en een stam waarin de pomp uitgeschakeld is, opgekweekt in verschillende zinkconcentraties. Deze proef werd in drievoud uitgevoerd. Het pipeteerschema is zichtbaar in materiaal en methode (3.3.1). De verwachte MIC van CH34 is 12mM Zn²⁺ en van CH34^{ZnR1,3} 24 mM Zn²⁺.

Eénmaal de 24-wellplaten geënt werden met de juiste stammen, werd om de 24 uur de OD_{600nm} bepaald met de Clariostar. Tussen de metingen in werd de 24-well plaat al schuddend geïncubeerd bij 30°C.

4.1.2 Troebelheidsmeting na 96 uur

troebelheidsmeting na 96u bij variërende zink concentraties



Figuur 14: OD_{600nm} van de verschillende stammen gemeten na 96 uur bij variërende zinkconcentraties

Figuur 14 geeft de grafiek weer van de gemeten OD_{600nm} bij toenemende zinkconcentraties na 96 uur. Elk punt uitgezet op de grafiek is een gemiddelde van de drie bekomen waarden. Bij een OD-waarde van 1 zijn er ongeveer $8 \cdot 10^8$ cellen per ml aanwezig in de oplossing. Deze grafiek geeft dus een maat weer van de groei en het aantal bacteriecellen in de oplossing, hoe hoger de overeenkomstige OD-waarde, hoe meer groei heeft plaats gevonden. De twee zinkmutanten (rood en blauw op de grafiek) groeien het beste in verhoogde zinkconcentraties. Vanaf 20 mM begint dit pas te dalen en is de OD-waarde nog altijd rond de 0.8 en bij 25 mM heeft er amper groei plaats gevonden.

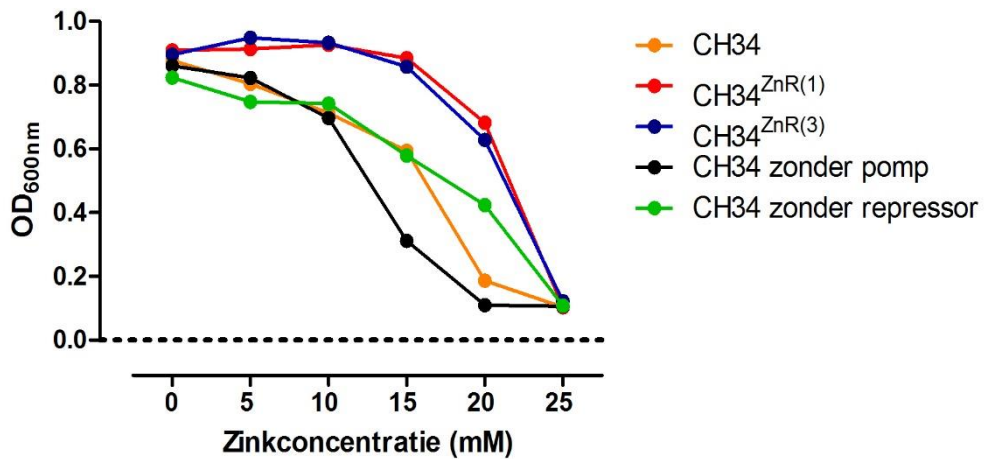
Ook CH34 zonder repressor (groen) kan groeien in hogere zinkconcentraties, hier is de grootste daling waarneembaar tussen de 10 en de 15 mM, maar de groei ligt nog steeds hoger als bij de parentale CH34.

Bij de parentale CH34 (oranje) neemt de groei drastisch af bij 15 mM. Vanaf het moment dat er 15 mM Zn^{2+} in het medium zit, is er amper nog groei zichtbaar. Tot en met 10mM loopt dit ongeveer gelijk met de CH34 zonder repressor.

Bij CH34 zonder pomp (zwart) werden de laagste OD_{600nm} waarden gemeten. Bij een concentratie van 10mM liggen de OD-waarden van deze stam al rond de 0.5 en vanaf 15mM benadert het de nul.

4.1.3 Troebelheidsmeting na 1 week

Absorbantie gemeten na 1 week bij variërende zink concentraties



Figuur 15: OD_{600nm} van de verschillende stammen gemeten na 1 week bij variërende zinkconcentraties

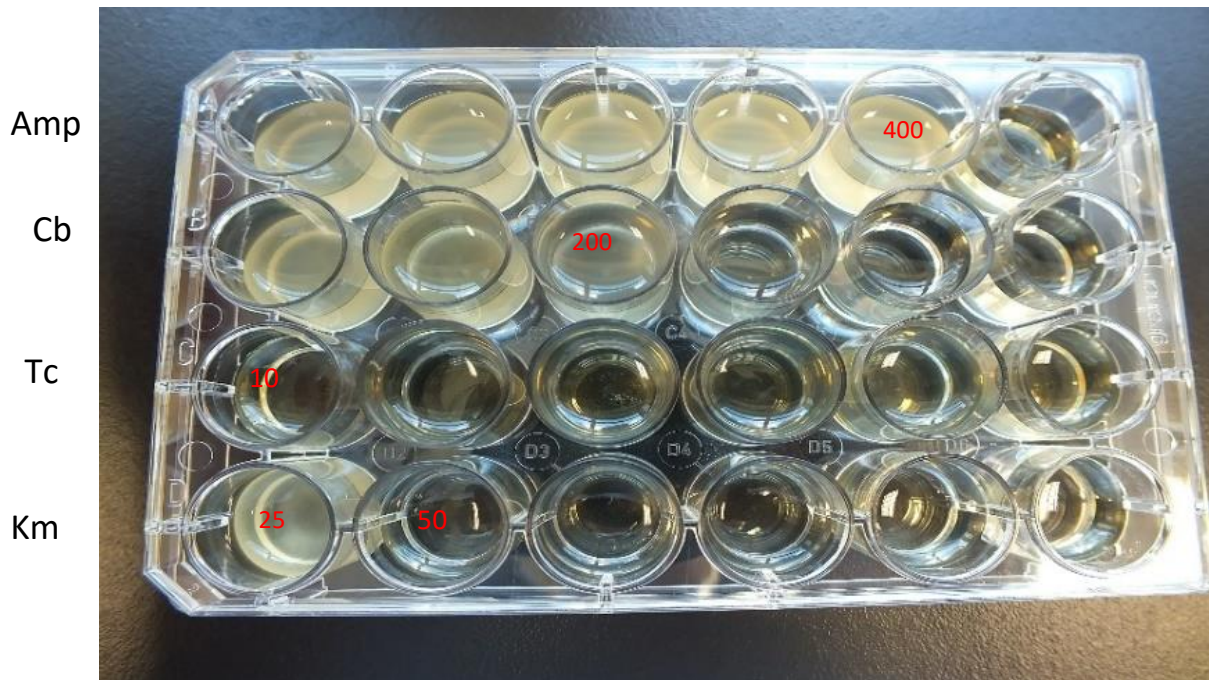
Figuur 15 geeft de grafiek weer van de gemeten OD_{600nm} bij toenemende zinkconcentraties na 1 week. Elk punt uitgezet op de grafiek is een gemiddelde van de drie bekomen waarden.

Ook hier vertonen de twee zinkmutanten (rood en blauw) de meeste groei in verhoogde zinkconcentraties. De grootste daling is hier pas zichtbaar tussen de 20 en de 25 mM. Ook de CH34 zonder repressor (groen) bevindt zich hier bij 20 mM duidelijk hoger op de grafiek dan de parentale CH34 (oranje). Bij CH34 is er een duidelijke afname in groei waarneembaar tussen 15mM en 20 mM, de OD_{600nm} daalt van 0.6 naar 0.2. Bij de CH34 met uitgeschakelde pomp (zwart) liggen de OD-waarden van de eerste twee punten wel hoger als bij de meting van 96 uur, vanaf 10 mM daalt de groei drastisch, meer bepaald van 0.7 bij 10 mM naar 0.3 bij 15mM. Bij 20 mM zijn het aantal gegroeide bacteriecellen al reeds verwaarloosbaar.

4.2 Groei van *Rhizobium leguminosarum* op glycerol

4.2.1 Antibioticamerker

Voordat het *glp* locus dat de ABC-transporter bevat ingebracht kan worden is er nood aan een selectiemerker. Het *glpK* locus dat ingebracht gaat worden ligt op het plasmide pJB3 dat genen resistentiegenen bevat tegen ampicilline en carbenicilline. Na het opkweken van VF39 in TY-medium met toenemende antibiotica concentraties (3.2.5) werd volgende 24-well plaat bekomen (figuur 16).



Figuur 16: 24-well plaat van VF39 in TY-medium met verschillende antibiotica concentraties

Bij Tetracycline werd er geen groei waargenomen zelfs niet in het welletje met de laagste antibiotica concentratie (10µg/ml). VF39 is dus van nature gevoelig tegen tetracycline. Er werd wel groei waargenomen in het eerste welletje van VF39 waar kanamycine is aan toegevoegd met een concentratie van 25 µg/ml. Maar aangezien op het plasmide pJB3 geen kanamycine resistentiemerker ligt, wordt er eerst gekeken naar ampicilline en carbenicilline. Bij ampicilline is er nog groei waarneembaar bij een concentratie van 400 µg/ml en bij carbenicilline bij een concentratie van 200 µg/ml.

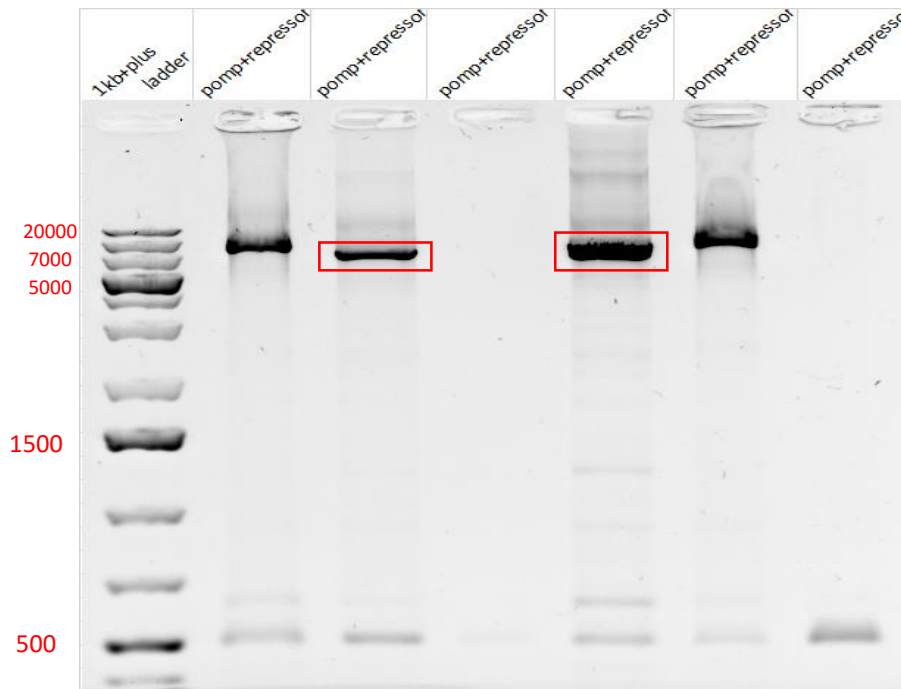
4.3 Invloed van de individuele genen van de pomp in zinkresistentie van CH34

4.3.1 Constructie Rmet_2229-Rmet_2235

Het eerste deel van dit experiment is het maken van construct Rmet_2229-Rmet_2235 waarbij de ABC transporter (pomp + repressor) zijn uitgeschakeld en er vervangen door een tetracycline cassette. Alle *in silico* analyses zijn zichtbaar in bijlage 4.

4.3.1.1 PCR van ABC-transporter (pomp+repressor)

Als eerste werd er een PCR uitgevoerd op de pomp en repressor met primerpaar Rmet_2229_3'_EcoRI en R-2235-3'_HindIII de lengte is 8740 bp. De PCR werd zesmaal uitgevoerd (figuur17).



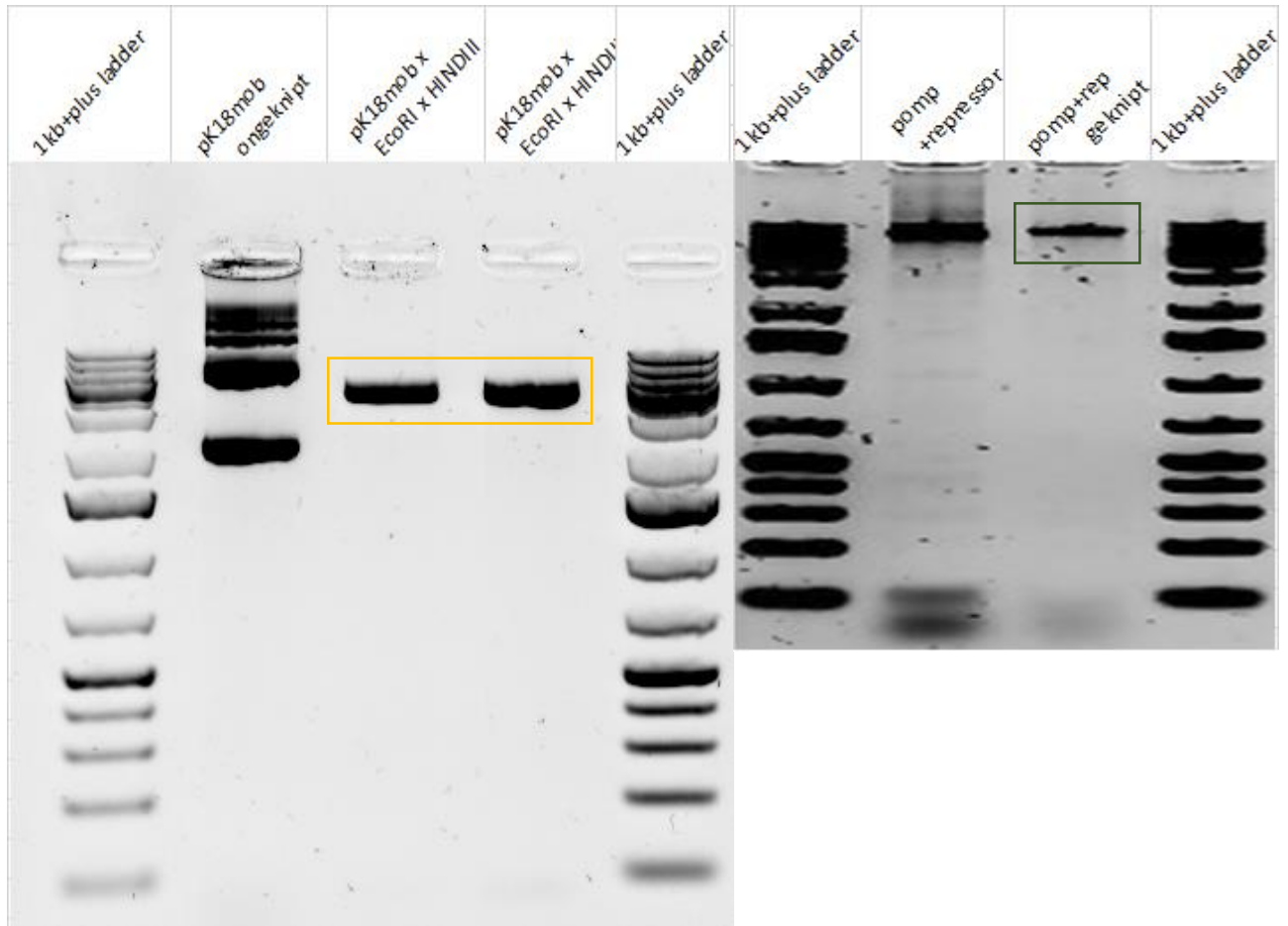
Figuur 17: controle PCR pomp+repressor op 1% agarosegel

Zoals zichtbaar op figuur 17 zijn vier van de zes PCR-producten succesvol geamplificeerd. Lanen 3 en 5 vertonen de beste bandjes met de verwachte hoogte van 8730 bp. Op de gel liggen deze bandjes tussen het bandjes van de 7kb en 10 kb in. De andere twee stalen liggen iets hoger op de gel. Doordat het grote fragmenten zijn en de ladder kort op elkaar ligt zijn hoogstwaarschijnlijk deze PCR-producten ook correct. Voor de zekerheid wordt er verder gewerkt met de twee fragmenten in de rode kader. Deze PCR-fragmenten zijn nadien opgezuiverd en hadden een concentratie van rond de 150 ng/ μ l.

4.3.1.2 Restrictie pK18mob en PCR fragment pomp+repressor

Ongeveer 3 μ g van pK18mob en het PCR-fragment is geknipt met *EcoRI* x *HindIII* ter controle zijn deze fragmenten op gel gezet.

Allereerst is pK18mob op gel gezet (figuur 18). De palindromische herkenningssequentie van de restrictie-enzymen liggen vlak naast elkaar. pK18mob wordt dus opgeknipt en er is maar een verlies van enkele basenparen. Daarom is er op de gel in **laan 3 en laan 4** ook maar één restrictie-fragment zichtbaar. Het andere fragment is zo klein dat het van de gel gelopen is. De fragmenten zijn wel zuiver en niet gefractioneerd t.o.v. de ongeknipte pK18mob in laan 1.



Figuur 18: controle restrictie pK18mob en pomp+repressor op 1% agarosegel

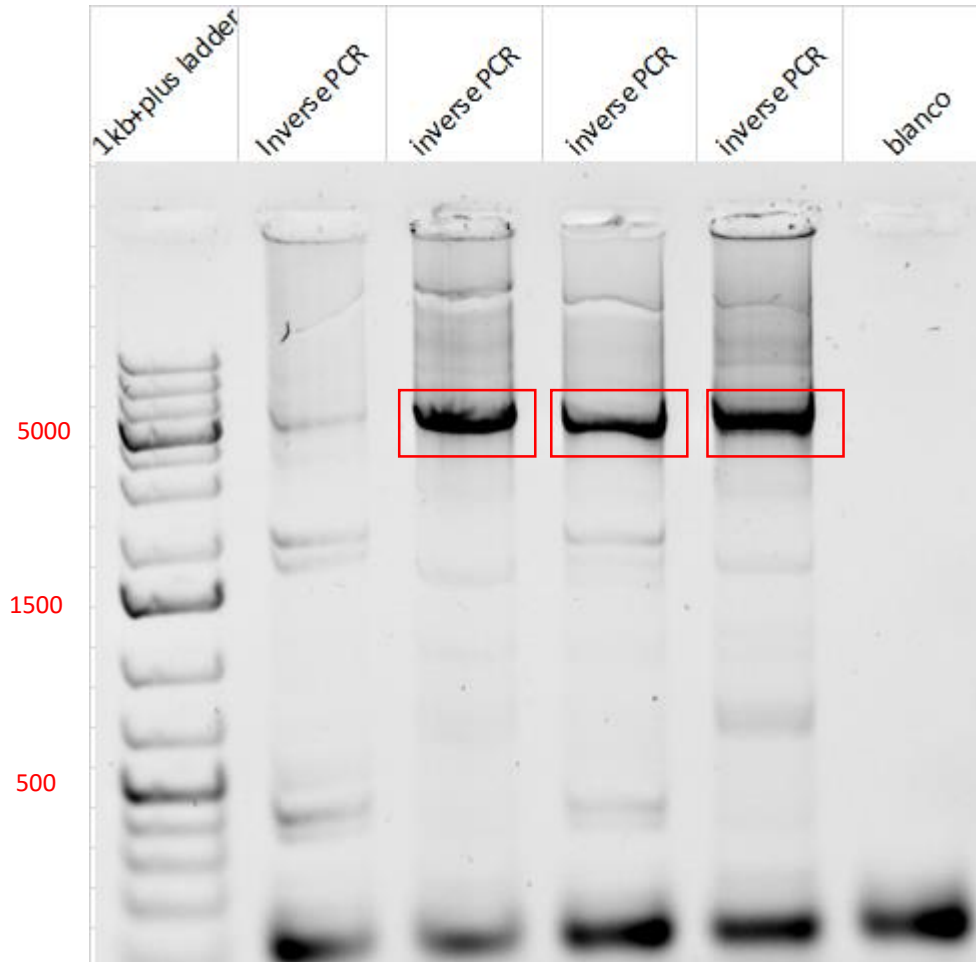
Bij de restrictie van de pomp en repressor zit de palindromische herkenningssequentie van de restrictie-enzymen aan het uiteinde van de primer. Ook hier wordt er dus één restrictiefragment gevormd van enkele basenparen (dat niet zichtbaar is op de gel) en **één groot restrictiefragment** zichtbaar op de rechterkant van figuur 18.

Het geknipte PCR-fragment bevat minder smeer en is zuiverder dan de controle in laan 2 (het ongeknipte PCR-fragment).

Hierna werden deze fragmenten overnacht geligeerd via chemische transformatie ingebracht in DG1/competente cellen en via blauw/wit screening werden de juiste kolonies (de witte) opgezuiverd en vloeibaar opgekweekt. Hierop werd een miniprep gedaan en met dit plasmide pK18mob_2229_2235 werd verder gewerkt. Ook werd een kolonie-PCR gedaan ter controle. Waarbij het fragment ongeveer 12.5 kb lang is. De afbeelding hiervan zit in bijlage 5, indien het construct correct is, wordt in de volgende stap het verwachte amplicon verkregen bij inverse PCR. Het is dus een extra controle met bovenaan de figuur de verwachte amplicons.

4.3.1.3 Inverse PCR

Op pK18mob_2229_2235 werd een inverse PCR uitgevoerd met primers Rmet_2229_tet_Rv_BcuI en R_2235_tet_Rv_BspTI. *In silico* werd bepaald dat de lengte van deze fragmenten rond de 5.8 kb moeten liggen (figuur 19).

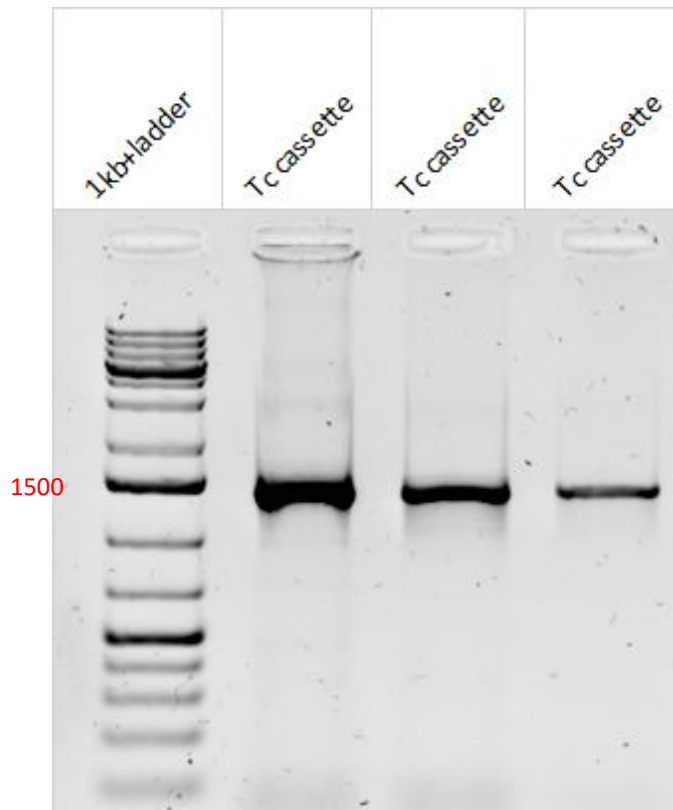


Figuur 19: Inverse PCR controle op 1% agarosegel

De fragmenten in laantjes 3,4 en 5 liggen op de verwachte hoogte van 5.8 kb. Wat ook opvalt is dat er redelijk wat smeer op de gel zit. In laan 2 is er een heel klein bandje zichtbaar op de juiste hoogte, maar er zijn heel veel nevenbandjes. Ook is er beneden op de gel wat primer-dimeren zichtbaar. Bij de blanco is geen fragment zichtbaar maar wel redelijk veel primer-dimeren. Voor het verdere verloop van het experiment wordt verder gewerkt met PCR-fragmenten uit laan 3,4 en 5, waarbij de concentratie na opzuivering rond de 100 ng/ μ l is.

4.3.1.4 PCR tetracycline cassette.

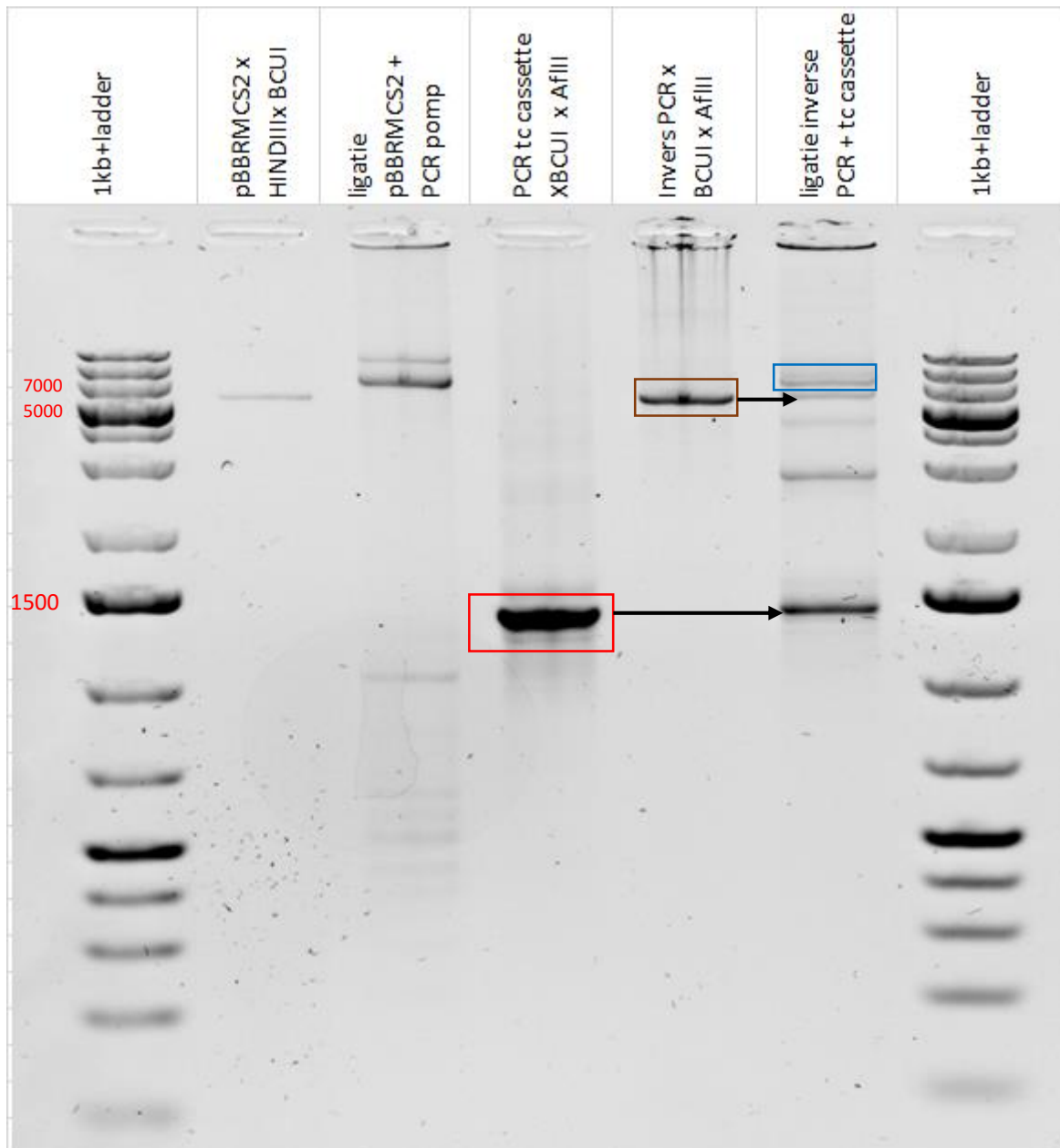
Uit pACYC184 wordt met primers ampli.tet-5 en ampli.tet-3_BspTI de tetracycline cassette geamplificeerd. De verwachte lengte is 1500 bp.



Figuur 20: controle PCR tetracycline cassette op 1% agarosegel

De geamplificeerde fragmenten liggen na controle op gel op de gewenste hoogte namelijk bij 1500 bp (figuur 20). Er zijn geen nevenbandjes zichtbaar en ook primer-dimeren zijn maar heel minimaal aanwezig. Het bandje in laan 2 is wel iets dikker dan de rest en er is ook een beetje smiling opgetreden bij dit bandje. Na opzuivering van de PCR-fragmenten bedraagt de concentratie 161 ng/ μ l.

4.3.1.5 Restrictie inverse PCR + tetracycline cassette



Figuur 21: restrictie+ ligatie inverse PCR en tetracyclinecassette controle op 1% agarosegel

Na de amplificatie van de inverse PCR uit pK18mob_2229_2235 en de tetracycline cassette werden deze fragmenten geknipt met *BcuI* en *AfIII*. Ter controle werden deze beide restricties en het ligatieproduct op gel gezet (figuur 21).

Laan 2 en 3 zijn resultaten van een ander experiment (4.5.2). In [laan 4](#) is één restrictiefragment zichtbaar van het PCR-product en het fragment is iets kleiner als 1500 bp. Het ander fragment is niet zichtbaar op gel doordat het net zoals bovenstaande restricties maar enkele basenparen groot is. Er is weinig smeer en het restrictiefragment is redelijk dik.

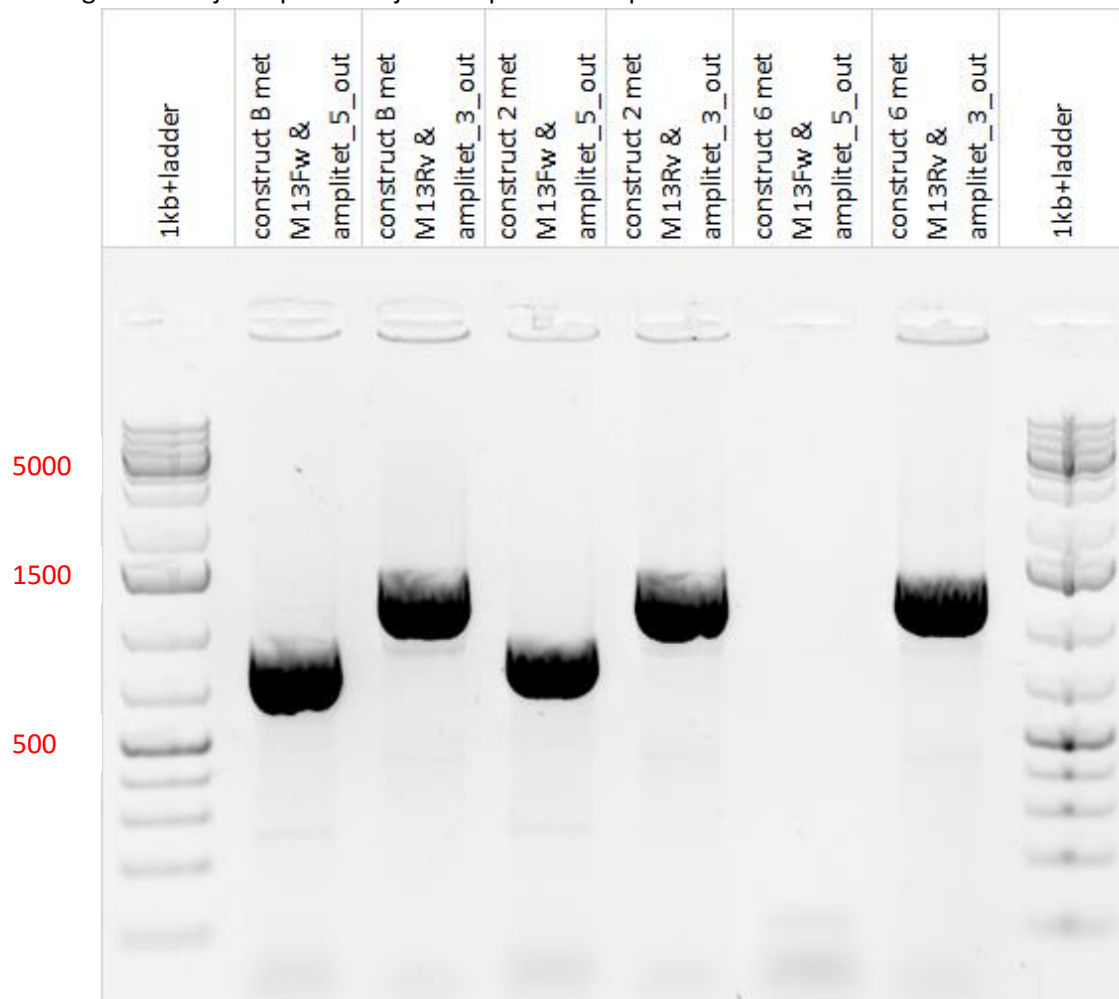
In [laan 5](#) is één van de twee restrictiefragmenten van de inverse PCR zichtbaar, het tweede is opnieuw te klein om op de gel te zien. Dit fragment is iets kleiner als 5.8 kb en de laan bevat weinig smeer. Om te kijken of de ligatie gelukt is werd dit product op [laan 6](#) aangebracht. Allereerst zijn er restanten van de geknipte inverse PCR en de geknipte tetracycline cassette zichtbaar. Het

belangrijkste is echter dat er ter hoogte van ongeveer 7 kb een bandje zichtbaar is dat duidt op een ligatie-fragment van de inverse PCR en de tetracycline cassette. Dit bandje is zeer klein, boven het bandje is nog een kleine smeer zichtbaar.

Het geligeerde fragment waarin de pomp en repressor ingebracht in pk18mob vervangen is door een tetracycline cassette (pK18mob_2229_2235::tet) wordt hierna chemische getransformeerd naar DG1 met selectie op LB Tc20. Ter controle werd van de juiste kolonies een kolonie-PCR uitgevoerd en een sequentie-analyse.

4.3.1.6 Kolonie-PCR en Sequentie-analyse

Om te controleren of de constructen juist zijn werd een kolonie-PCR uitgevoerd met de primercombinatie M13forward/ amplitet_5_out en M13reverse/ amplitet_3_out. De gewenste PCR-fragmenten zijn respectievelijk 700 bp en 1450 bp.



Figuur 22:kolonie-PCR controle op 1% agarosegel

Construct B en construct 2 vertonen voor beide primerparen een bandje, respectievelijk bij 700 bp en rond 1500 bp. Bij construct 6 is enkel een bandje aanwezig voor de PCR-reactie met M13Rv en amplitet_3_out. De bandjes zijn redelijk dik, dit kan verklaard worden doordat er niet met zuiver DNA vertrokken is maar met bacteriële kolonies. Hierin zit dus ook nog de celwand en andere onzuiverheden. Ter controle is construct B en construct 2 opgestuurd voor sequentie-analyse enkel construct 2 aligneerde correct met de *in silico* verwachte sequentie. (sequentie-analyse in bijlage 6). In tabel 5 is een overzicht zichtbaar van de registratiecode van de opgestuurde sequentie-

analyse met de gebruikte primer. Voor de triparentale conjugatie wordt dus verder gewerkt met construct 2 nadat het chemisch getransformeerd is naar DG1

Tabel 5: construct 2 opgestuurd voor controle via sequentie-analyse

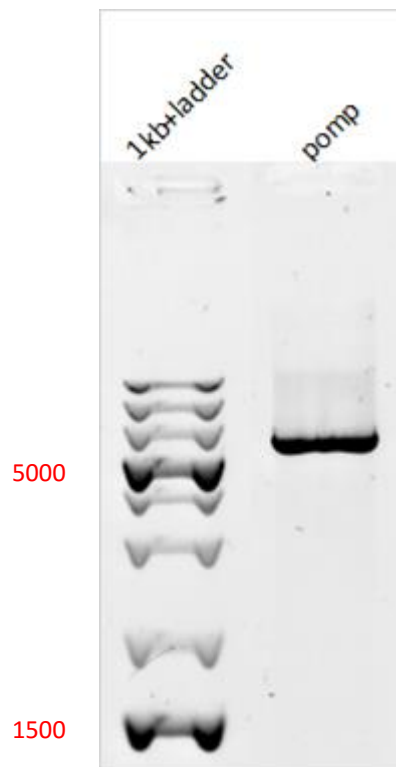
Construct 2	primer
FR10734719	Amplitet_5_out
FR10734720	Amplitet_3_out

4.3.2 Aanmaak complementaire plasmidepomp

In dit experiment wordt een complementaire plasmide pomp geconstrueerd met de pomp van de ABC-transporter hierop gelokaliseerd. Als eerste stap was er een PCR op gDNA van CH34 om de pomp te amplificeren.

4.3.2.1 PCR van de pomp

Het PCR-fragment werd geamplificeerd met Rmet_2229_3'EcoRI en R_2234_2_5'HindIII als primerpaar. De verwachte lengte is ongeveer 7kb.

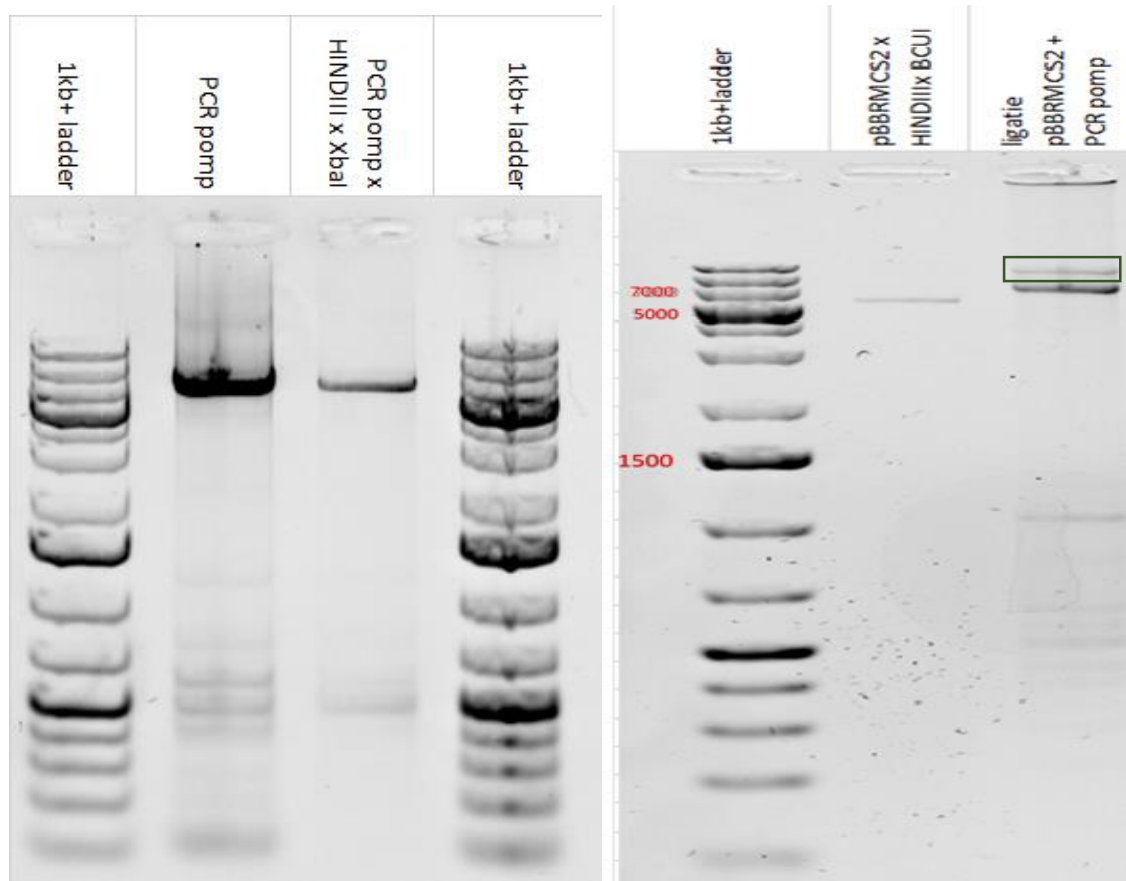


Figuur 23: PCR van de pomp controle op 1% agarosegel

In laan 5 bevindt zich de pomp, zoals zichtbaar ligt het fragment rond 7000 bp. Het is een mooi recht bandje. Na opzuivering bedraagt de concentratie 200 ng/ μ l.

4.3.2.2 Restrictie pBBRMCS2 en PCR pomp

Het PCR-fragment van de pomp is geknipt met *EcoRI* en *XbaI* en het plasmide pBBRMCS2 met *HindIII* en *BclI*. *XbaI* en *BclI* herkennen beide dezelfde palindromische sequentie, maar zijn van verschillende bacteriofagen afkomstig. Dit is noodzakelijk omdat pBBRMCS2 dam gevoelig is.

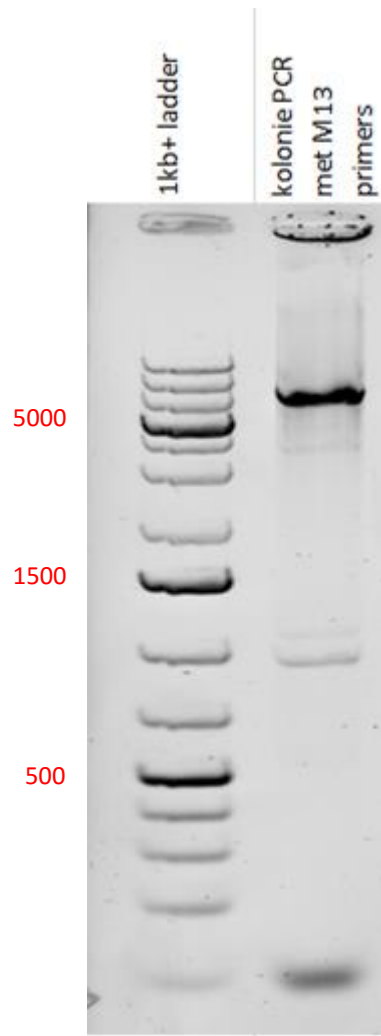


Figuur 24: restrictie pomp, pBBRMCS2 en ligatieproduct controle op 1% agarosegel

In laan 3 is het geknipte PCR-fragment van de pomp zichtbaar. Het is een dun, maar zuiver bandje (figuur 24). Rechts is het geknipte plasmide zichtbaar pBBRMCS2. Ook dit bandje is relatief dun, maar de gel vertoont verder geen onzuiverheden. Het ligatieproduct bevat verschillende fragmenten waaronder de geknipte pomp, het geknipte plasmide en een zeer dun bandje bij ongeveer 14 kb (=het ligatieproduct). Na opzuivering kan hiermee verder gewerkt worden. Het product pBBRMCS2_Rmet2229_2234 wordt via chemische tranformatie ingebracht in DG1 en wordt gecontroleerd aan de hand van een kolonie-PCR en een sequentie-analyse.

4.3.2.3 Kolonie-PCR en sequentie-analyse

Ter controle wordt een kolonie-PCR uitgevoerd met M13 primers, het verwachte amplicon ligt rond de 7 kb.



Figuur 25: kolonie-PCR op DG1/pBBRMCS2_2229_2234 controle op 1% agarosegel

In laan 2 is het fragment van de kolonie-PCR met M13 primers zichtbaar, er zijn ook een paar nevenbandjes. Maar het gewenste fragment ligt op ongeveer 7kb zoals voorspeld was. Ter controle is ook een sequentie-analyse uitgevoerd met M13 primers (zichtbaar in bijlage 6) ook deze bevestigde dat het construct correct was.

5 Discussie

5.1 Invloed van de transcriptionele regulator bij zinkresistentie

De twee mutanten van CH34 waar de transcriptionele regulator niet meer tot expressie komt, hebben een veel hogere zinktolerantie dan de parentale CH34. Vanaf 25 mM Zn²⁺ nemen de OD-waarde pas drastisch af. Na een week zijn de verschillen tussen de mutanten en de parentale CH34 nog groter. Wetenschappelijk onderzoek had reeds bepaald dat de MIC van CH34^{ZnR1,3} 22mM bedraagt. Dit is een verklaring voor de afname in groei tussen de 20 en de 25 mM. Bij CH34 is de MIC 12 mM daarom neemt de groei ook drastisch af tussen de 10 en de 15 mM. De controlestam waar de transcriptionele regulator is uitgeschakeld groeit ook beter in hogere zinkconcentraties dan de parentale stam. De waarden liggen echter lager dan die van de zinkmutanten wat kan duiden op het feit dat de ABC-transporter toch niet de enige factor is in verhoogde zinkresistentie bij deze stam. De stam waar de pomp van de ABC-transporter is uitgeschakeld groeit het minst. Dit bewijst nogmaals dat de ABC-transporter wel een rol speelt bij zinkresistentie.

Na 1 week zijn de verschillen tussen de stammen nog groter, CH34 is een bacterie die een relatief lange lag-fase heeft en dus enkele dagen nodig heeft om te groeien. Omgevingsstress zoals in dit geval zinkionen aanwezig in het medium, vertragen de groei.

5.2 Groei van *Rhizobium leguminosarum* op glycerol

Het pJB3 plasmide dat in een competente *E. coli* gebracht is bevat op zijn plasmide resistentiemerkers voor ampicilline en carbenicilline. In dit plasmide is ook het *gfp* locus gebracht waarop de ABC-transporter zich bevindt. Voordat dit plasmide ingebracht kan worden via elektroporatie is er nood aan een selectiemerker. Daarom wordt er allereerst gekeken of de VF39 stam gevoelig is aan één van de twee antibiotica. Voor het geval dat dit niet zo is worden ook tetracycline en kanamycine meegenomen als merkers. De bacterie is op zijn eigen al zeer resistent tegen ampicilline, dus dit is geen goede merker. Tc en Km zijn wel goede merkers maar dan moet de *gfp* locus eerst ingebracht worden in een ander plasmide of een coderende cassette van één van deze twee antibiotica bij ingebracht worden in pJB3. Uit de proef blijkt wel dat carbenicilline een goed alternatief is, VF39 is van nature resistent tegen een concentratie Cb van 200 ng/μl. Dus als selectiemerker wordt vanaf nu 400 ng/μl gebruikt. Ter controle worden TY-platen met een Cb van 400ng/μl gemaakt. VF39 en LRS3934-C-D kunnen hier niet op groeien, de selectiemerker is goed gekozen. In de toekomst kan beter het *gfp* locus ingebracht worden op een plasmide waar een tetracycline of kanamycine cassette ligt. Deze selectiemerkers zijn beter bij het gebruik van *Rhizobium* stammen

5.3 Invloed van de individuele genen van de pomp in zinkresistentie van CH34

Deze proef is vierledig: allereerst het maken van het construct DG1/pK18mob-Rmet_2229_2235::tet, gevolgd door de triparentale conjugatie naar CH34. Het maken van de complementaire plasmidepomp pBBRMCS2_Rmet2229_2234 met de als laatste stap het inbrengen van de complementaire plasmidepomp in deze nieuw mutant. Hierna kan afzonderlijk elk gen van de pomp getest worden om de exacte rol bij verhoogde zinkresistentie te onderzoeken.

Bij het maken van de pomp en repressor mutant, is de tussentijdse selectie van de juiste constructen van uiterst belang. Telkens er een chemische transformatie plaatsvindt naar DG1 wordt

de mutant op verschillende wijze geselecteerd. Bij de transformatie naar DG1/pK18mob-Rmet_2229_2235 wordt gebruik gemaakt van Km50 als selectiemiddel, aangezien pk18mob een kanamycine cassette op zijn plasmide heeft liggen. Maar ook blauw-wit screening wordt toegepast op de nieuw gevormde mutanten. De witte kolonies worden op hun beurt dan opgezuiverd en enkel degene die na opzuivering volledig wit blijven, komen in aan merken voor kolonie-PCR. In deze stap is kolonie-PCR niet volledig noodzakelijk. Want bij de inverse PCR in de volgende stap wordt enkel een amplicon van correcte grootte verkregen als de ligatie van de ABC-transporter in pK18mob succesvol was.

Na elke ligatie, zijn er meerder fragmenten zichtbaar op gel. Zo is een ligatie een mengeling van de geknipte vector, in dit geval een plasmide, het geknipte PCR-product en het ligatieproduct. Dit geeft nogmaals de noodzaak weer voor het gebruik van selectiemerker en screeningsmethode om alleen de juiste getransformeerde cellen te verkrijgen. Nadat een kolonie-PCR en een sequentie-analyse de juistheid van de nieuwe constructen bevestigt, kunnen deze in CH34 gebracht worden. Deze stappen zijn dus een logisch vervolg op de zelfgemaakte constructen. Als eerste zal pK18mob-Rmet_2229_2235::tet via een triparentale conjugatie met het *E.coli* pRK600 als helpercel het gen van interesse uitwisselen met de parentale CH34. Hierdoor wordt een CH34 verkregen waarop het chromosoom de ABC-transporter vervangen is door een tetracycline cassette. Door in deze mutant de zelfgemaakte complementaire pomp in te brengen, kan relatief eenvoudig de functie in verhoogde zinkresistentie voor ieder gen apart bepaald worden. Dit geeft meer inzicht in de micro-adaptatie van CH34 bij blootstelling aan verhoogde zinkconcentraties.

6 Conclusie

In een zinkmutant van CH34 is een inactivatie van de transcriptionele regulator (repressor) van de bijhorende pomp dat in het geheel de ABC-transporter vormt vastgesteld. Dit locus is gelegen op het chromosomaal van CH34. Hierdoor komt de pomp tot verhoogde expressie en is de bacterie resistent tegen hogere concentraties zink. De MIC van deze mutant is vastgesteld op 24 mM Zn²⁺. Terwijl deze bij de parentale stam 12 mM is. De invloed van deze transcriptionele regulator op de verhoogde zinktolerantie is onderzocht, niet alleen is de overleving van zinkmutanten groter bij hogere concentraties (gaande tot 25 mM), maar de zelfgemaakte repressor-knockout en pomp-knockout bevestigen enerzijds dat wanneer de repressor is uitgeschakeld de bacterie beter bestand is tegen hogere zinkresistentie en in het geval van een uitgeschakelde pomp de zinkresistentie afneemt. Echter liggen het aantal overlevende bacteriecellen bij de repressor-knockout nog steeds lager als bij de twee mutanten stammen. Dit betekent dat de transcriptionele regulator misschien niet de enige factor is bij verhoogde zinkresistentie in deze mutant, maar het een samenhang is met nog andere factoren.

Ook is er succesvol een selectiemerker bepaald voor het inbrengen van het *glp* locus in LRS3934-C-D. Deze selectiemerker is carbenicilline met een concentratie van 400 ng/μl. Op het in te brengen plasmide pJB3 waar het *glp locus* zich bevindt ligt deze merker ook. Dus het plasmide kan via elektroporatie ingebracht worden en op TY cb400 platen geselecteerd worden.

E. coli DG1 pK18mob-Rmet_2229_2235::*tet* en de complementaire plasmidepomp pBBRMCS2_Rmet2229_2234 zijn succesvol aangemaakt, dit is zowel bevestigd door kolonie-PCR als door een sequentie-analyse. Deze constructen kunnen gebruikt worden in de volgende stap waarin CH34 via triparentale conjugatie zijn ABC-transporter gaat vervangen door een tetracycline cassette. Hierna kan de complementaire pomp ingebracht worden en kan relatief eenvoudig elk gen apart bestudeerd worden om zijn specifieke functie in verhoogde zinkresistentie te achterhalen.

Literatuurlijst

- [1] P. J. Janssen, R. Van Houdt, H. Moors, P. Monsiers, N. Morin, A. Michaux, M. A. Benotmane, N. Leys, T. Vallaey, A. Lapidus, S. Monchy, C. Médique, S. Taghavi, S. McCorkle, J. Dunn, D. van der Lelie en M. Mergeay, „The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a Master survivalist in harsh and anthropogenic Environments,” *Plos one*, vol. 5, nr. 5, pp. 1-33, 2010.
- [2] Kenyon College, „*Cupriavidus metallidurans*,” Turnkey Linux, 27 december 2012. [Online]. Available: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Cupriavidus_metalidurans. [Geopend 18 maart 2016].
- [3] S. Monchy, M. A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. van der Lelie en M. Mergeay, „Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals,” *Journal of Bacteriology*, vol. 20, nr. 189, pp. 7417-7425, 2007.
- [4] J. A. Lemire, J. J. Harrison en R. J. Turner, „Box 2: Adapt and resist: how microorganisms deal with deadly metals,” *Nature*, vol. 11, nr. 3028, pp. 371-384, 2013.
- [5] J. M. Andrews, „Determination of minimum inhibitory concentrations,” *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 48, nr. 1, pp. 5-16, 2001.
- [6] J. Vandecraen, „*Cupriavidus metallidurans* in response to environmental stressors,” SCK-CEN, Mol, 2016.
- [7] L. A. Pray, „Transposons: the jumping Genes,” *Nature Education*, vol. 1, nr. 1, pp. 4-7, 2008.
- [8] H. Ding, C. B. Yip en m. F. Hynes, „Genetic Characterization of a Novel Rhizobial Plasmid Conjugation System in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Strain VF39SM,” *Journal of Bacteriology*, vol. 195, nr. 2, pp. 328-339, 2013.
- [9] R. Van Houdt en M. Mergeay, *Metal Response in Cupriavidus metallidurans: Volume 1: from habitats to gens and proteins*, Belgium Nuclear Research Centre: springer, 2015.
- [10] Boundless, „“ABC Transporters.” Boundless Microbiology,” Boundless, 21 juli 2015. [Online]. Available: <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/cell-structure-of-bacteria-archaea-and-eukaryotes-4/transport-across-the-cell-membrane-33/abc-transporters-256-1009/>. [Geopend februari 20 2016].
- [11] VIB, „Genetische modificatie bij bacteriën,” VIB, 14 januari 2010. [Online]. Available: <http://www.vib.be/nl/biotech-basics/Pages/Genetisch-wijzigen-van-een-bacterie.aspx>. [Geopend 20 maart 2016].
- [12] C. Lagrand, „recombinant DNA technologie,” Universiteit Utrecht, 2010. [Online]. Available: http://www.projects.science.uu.nl/PHARMACEUTICS/Studentsreports/Lagrand/synthese_inleiding.html. [Geopend 20 maart 2016].

- [13 Sigma-Aldrich, „Competent cells for transformation,” Sigma-Aldrich, 1 maart 2014. [Online].
] Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/transformation.html>. [Geopend 31 maart 2016].
- [14 R. J. Redfield en J. C. Mell, „Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity,”
] *Journals of Bacteriology*, vol. 196, nr. 8, pp. 1471-1483, 2014.
- [15 NPTEL, „Experimental Biotechnology: Preparation of Competent Cells,” NPTEL, [Online].
] Available: <http://nptel.ac.in/courses/102103047/37>. [Geopend 20 maart 2016].
- [16 N. Oswald, „E.Coli electroporation vs Chemical transformation,” bitesizebio, 18 september
] 2007. [Online]. Available: <http://bitesizebio.com/10297/ecoli-electroporation-vs-chemical-transformation/>. [Geopend 10 april 2016].
- [17 M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. Bender, D. A. Stahl en D. Buckley, *Biology of Microorganisms*
] thirteenth Edition, Pearson Education, 2011.
- [18 D. Cress, „Inovio Biomedical Extends Agreement with the Internation AIDS Vaccine Initiative,”
] onemedplace, 14 augustus 2008. [Online]. Available: <http://www.onemedplace.com/blog/archives/854>. [Geopend 20 april 2016].
- [19 wikipedia, „Triparental mating,” wikipedia, 10 Februari 2016. [Online]. Available:
] https://en.wikipedia.org/wiki/Triparental_mating. [Geopend 10 Mei 2016].
- [20 F. Widdel, „Theory and Measurement of Bacterial Growth,” *Grundpraktikum Mikrobiology*, p.
] 11, 5 juni 2010.
- [21 Sigma-Aldrich, „Introduction to Blue-White Screening- Background and protocols for colony
] selection,” Sigma-Aldrich, [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>. [Geopend 10 april 2016].
- [22 M. J. Colombo, J. Ha, J. R. Reinfelder, T. Barkay en N. Yee, „Oxidation of Hg(0) to Hg(II) by
] diverse anaerobic bacteria,” *Chemical Geology*, nr. 363, pp. 334-340, 2014.

Figurenlijst

Figuur 1: Foto gemaakt met scanning elektronen microscoop (SEM), <i>Cupriavidus metallidurans</i> [2].	9
Figuur 2: overzicht genoom <i>C. metallidurans</i> CH34 [1].	10
Figuur 3: overzicht van de resistentie mechanismen van bacteriën tegen (zwarte) metalen [4].	11
Figuur 4 genomische regio van <i>glpR</i> in CH34 met daaronder de vergelijking met de locus voor glycerol gebruik als koolstofbron in plasmide pR1eVF39c in <i>R.leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> VF39 [6].	14
Figuur 5: mechanisme van actief transport door ABC-transporter om substraten in de cel te brengen [10].	15
Figuur 6: schematische weergave van construct $\Delta Rmet_2229_2235::tet$ gemaakt met <i>snappgene</i>	17
Figuur 7: overzicht van de aanmaak van een complementaire pomp gemaakt door <i>snappgene</i>	18
Figuur 8: genetische modificatie van plasmide [11].	19
Figuur 9: Sticky ends en blunt ends verkregen door restrictie-enzymen [12].	20
Figuur 10: schematische weergaven van transformaties in bacteriën [14].	21
Figuur 11: ontstaan van hydrofiele poriën [16].	22
Figuur 12: Elektroporatieproces waarbij er een spanningsveld gecreëerd wordt door de positieve en negatieve elektrode [18].	23
Figuur 13: schematisch overzicht van een blauw-wit screening [21].	26
Figuur 14: OD_{600nm} van de verschillende stammen gemeten na 96 uur bij variërende zinkconcentraties	49
Figuur 15: OD_{600nm} van de verschillende stammen gemeten na 1 week bij variërende zinkconcentraties	50
Figuur 16: 24-well plaat van VF39 in TY-medium met verschillende antibiotica concentraties	51
Figuur 17: controle PCR pomp+repressor op 1% agarosegel	52
Figuur 18: controle restrictie pK18mob en pomp+repressor op 1% agarosegel	53
Figuur 19: Inverse PCR controle op 1% agarosegel	54
Figuur 20: controle PCR tetracycline cassette op 1% agarosegel	55
Figuur 21: restrictie+ ligatie inverse PCR en tetracyclinecassette controle op 1% agarosegel	56
Figuur 22: kolonie-PCR controle op 1% agarosegel	57
Figuur 23: PCR van de pomp controle op 1% agarosegel	58
Figuur 24: restrictie pomp, pBBRMCS2 en ligatieproduct controle op 1% agarosegel	59
Figuur 25: kolonie-PCR op DG1/pBBRMCS2_2229_2234 controle op 1% agarosegel	60

Tabellenlijst

Tabel 1: Mutaties in CH34 ^{ZnR} [6]	12
Tabel 2: Differentiële gen expressie van CH34 ^{ZnR} [6].....	13
Tabel 3: Overzicht gebruikte bacteriestammen en plasmiden [6].....	26
Tabel 4: overzicht gebruikte primerparen [6].....	28
Tabel 5: construct 2 opgestuurd voor controle via sequentie-analyse.....	58

Bijlagen

Bijlage 1: media

LB-medium

- Neem een Schottfles van 500 ml
- Voeg 10g LB of 16 g LB+agar hier aan toe (LB+agar zorgt voor een vaste voedingsbodem)
- Giet aan de hand van een maatcilinder exact 500 ml ultrapuur water hierbij
- Voeg een roerstaafje toe
- Laat de oplossing goed roeren op een schudpaneel en kantel de oplossing een paar keer op en neer.
- Autoclaveer 15 minuten bij 121°C en 1 atm overdruk
- vloeibaar LB medium kan hierna bewaard worden bij 4 °C
- Zet LB+agar gedurende een uur in een waterbad van 50°C zodat het medium deze temperatuur krijgt
- Giet dit medium op aseptische wijze in de buurt van de bunsenbrander (ongeveer 20 platen)
- Laat de platen enkele uren drogen
- Bewaar ze bij 4°C.

TY-medium

- Neem een Schottfles van 500 ml
- Voeg 5g difco bacto tryptone, 3 g dico bacto gist extract en 1.3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ toe.
- Voeg 10 g agar toe indien een vaste voedingsbodem vereist is.
- Voeg een roerstaafje toe
- Laat de oplossing goed roeren op een schudpaneel en kantel de oplossing een paar keer op en neer.
- Autoclaveer 15 minuten bij 121°C en 1 atm overdruk
- VI TY medium kan hierna bewaard worden bij 4 °C
- Vast TY medium volgt dezelfde stappen als vast LB zie 3.2.1

Robertson minimaal media

- Neem een Schottfles van 1 liter
- Maak eerst volgende stockoplossingen

Stockoplossingen	afgewogen
FeCl_3 10x	60 mg
Biotine 1000x	20 mg
Thiamine HCL 10000x	100 mg
Calciumpantothenate 10000x	100 mg

- Steriliseren laatste 3 oplossingen apart met behulp van een spuit en steriele filter
- Neem de Schottfles van 1 liter en voeg hier deze hoeveelheden bij

Stof	Afgewogen hoeveelheid per liter
MgSO ₄ 7H ₂ O	150 mg
CaCl ₂	50 mg
NaCl	50 mg
K ₂ HPO ₄	300 mg
KH ₂ PO ₄	300 mg
glutaminezuur	1.1 g
FeCl ₃ 10x	100 ml
Mannitol of glycerol*	10g

*afhankelijk of het media RMM glycerol of RMM mannitol dient gemaakt te worden

- Voeg 10 g agar toe indien een vaste voedingsbodem vereist is.
- Voeg een roerstaafje toe
- Stel de pH in op 6.8 door NaOH of HCl toe te voegen
Opgelet! Vermijd contact met ogen of handen
- Laat de oplossing goed roeren op een schudpaneel en kantel de oplossing een paar keer op en neer.
- Autoclaveer 15 minuten bij 121°C en 1 atm overdruk
- Voeg aseptisch 1ml biotine, 0.1 ml thiamine HCl en 0.1ml calciumpantothenate toe.
- VI RMM medium kan hierna bewaard worden bij 4 °C
- Vast RMM volgt dezelfde stappen als vast LB zie 3.2.1

284 medium

SCK heeft een Standaard operating procedure (SOP) voor 284 medium, dit wordt hieronder weergegeven.

Introduction

284 is a minimal salty medium, without carbon source, which is often used to test heavy metal resistance in bacteria's. The medium also can be used to test autotrophic growth or growth of bacteria's on various carbon sources. This medium is a basic medium: if necessary the carbon source and/or metals to test, can still be added.

Composition

to prepare **one liter 284-medium**:

stock solution	100ml
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	40mg or 4ml of a 1% solution
Fe(III)NH ₄ .citrate	10ml of a 48mg/100ml solution
SI 7 trace elements	1ml

to prepare one liter of a 10 x concentrated **stock solution**:

Tris (=Trizma base)	60,6 g (500mM)
NaCl	46,8 g (800mM)
KCl	14,9 g (200mM)
NH ₄ Cl	10,7 g (200mM)

Na ₂ SO ₄	4,3 g (30mM)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,0 g (10mM)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,3 g (2mM)

to prepare one liter of **SI 7 trace elements**:

25% HCl	1,30 ml (10mM)
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	144 mg (0.5mM)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	100 mg (0.5mM)
H ₃ BO ₃	62,0 mg (1mM)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	190 mg (0.8mM)
CuCl ₂ · 2H ₂ O	17,0 mg (0.1mM)
NiCl ₂ · 6H ₂ O	24,0 mg (0.1mM)
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	36,0 mg (0.15mM)

Preparation

Prepare one liter of the stock solution. For this, weigh the products and put them in a beaker of 1000ml. Solve them in less than a liter of Milli Q. If the solution is clear, it can be diluted till 1000ml by using a graduated cylinder. Do not autoclave the stock solution!

Prepare the SI 7 trace elements. For this, follow the same procedure as the one of the stock solution.

Prepare the 1% solution of Na₂HPO₄ · 2H₂O and the 48mg/100ml solution of Fe(III)NH₄.citrate.

To make a liter of the medium

- Measure the amounts which are on the previous page.
- Put them together in a beaker and add less than a liter of Milli Q.
- If necessary a carbon source can be added to the basic medium.
Normally, the amount of 0,2% (weight/volume) is used.
- To make the 284gluc medium, the carbon source 'Na-gluconate' is used.
- Add the carbon source to the medium before adjusting the pH.
- Bring the medium at pH 7,0 by using HCl 25%
- Dilute the medium till one liter.
- Divide the medium in bottles of a chosen volume.
- If the medium has to be solid, add 2,0% agar to each bottle.
- Autoclave the bottles with medium at 120°C for 20min..

-Metals and antibiotics are added after sterilization and cooling.

List of products

products to prepare the stock solution:

trizma base	Sigma / Sigma-Aldrich	T6065
NaCl	Merck / VWR	1.06404.1000
KCl	Merck / VWR	1.04936.0500
NH ₄ Cl	Merck / VWR	1.01145.0500
Na ₂ SO ₄	Prolabo / VWR	103984T
MgCl ₂ . 6H ₂ O	Merck / VWR	1.05833.0250
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Merck / VWR	1.02382.1000

products to prepare the SI 7 trace elements:

25% HCl	Merck / VWR	1.00316.1000
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	Merck / VWR	1.08883.0500
MnCl ₂ . 4H ₂ O	Merck / VWR	1.05927.0100
H ₃ BO ₃	Sigma / Sigma-Aldrich	B0252-500G
CoCl ₂ . 6H ₂ O	Merck / VWR	1.02539.0100
CuCl ₂ . 2H ₂ O	Merck / VWR	1.02733.0250
NiCl ₂ . 6H ₂ O	Merck / VWR	1.06717.0250
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	Merck / VWR	1.06521.0100

other products:

Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	Merck / VWR	1.06580.0500
Fe(III)NH ₄ .citrate	Merck / VWR	1.03762.1000
agar	OXOID	LP0011
Na-gluconate (carbon source)	Prolabo / VWR	27871.295

Bijlage 2 Metalen toevoegen aan medium

SCK heeft een SOP om metalen toe te voegen aan medium, dit wordt hieronder weergegeven.

Introduction

Heavy metals are added to the medium after the medium is sterilized and cooled down.

Solutions of a certain concentration are made. To make these solutions, the salt of the metal is used.

Push the solutions through a filter to make it sterile.

Solutions

<i>Metal</i>	<i>salt</i>	<i>solvent</i>	<i>concentration</i>
Ni (=1000mM)	NiCl ₂ · 6H ₂ O	H ₂ O	1M
Zn	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	H ₂ O	1M (=1000mM)

Calculation

To calculate how much of a salt solution, with known concentration, needs to be added to a certain amount of medium, use the following rule.

$$V_1 \cdot c_1 = V_2 \cdot c_2$$

example: 500ml of a medium is needed with a final concentration of nickel 1mM.

- Prepare 500ml medium and let it cool down after sterilization.
- Prepare a salt solution of NiCl₂ · 6H₂O with a concentration of 1M.
- Calculate how much of the solution is needed to get to a final concentration of 1mM.

$$\begin{aligned} V_1 &= (V_2 \cdot c_2) / c_1 \\ &= (500\text{ml} \cdot 1\text{mM}) / 1000\text{mM} \\ &= 0,5\text{ml} \end{aligned}$$

in a - Add 0,5ml of the prepared salt solution to the 500ml medium. Make sure it's added sterile way.

List of products

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Merck / VWR	1.08883.0500
NiCl ₂ · 6H ₂ O	Merck / VWR	1.06717.0250

Bijlage 3 :Antibiotica toevoegen aan medium

SCK heeft een SOP om antibiotica toe te voegen aan medium, dit wordt hieronder weergegeven.

Introduction

Antibiotics are very unstable in heat, so they should not be autoclaved. They get sterilized by pushing them through a 0,45µm membrane filter. They are added to the medium after sterilization. The medium has to be cooled down till at least 60°C.

Composition

Following antibiotics are weighed and solved in milli-Q water. The most frequently used concentration of those stock solutions is 1% unless a higher concentration is needed for certain experiments.

Carbenicillin

Cycloheximid

Gentamicin

Kanamycin

Penicilline

Streptomycin

Spectinomycin

Note: For higher concentrations of Cycloheximid it's necessary to solve the product in alcohol or to heat it a little bit (not more than 60°C!).

Following antibiotics are an exception on the rule above.

They will be described one by one below.

Ampicillin

The amount of powder is weighed and solved in milli-Q water and a drop of NaOH 40%.

Chloramphenicol

The amount of powder is weighed and solved in ethanol. Sterilization isn't necessary anymore.

Nalidixique acid

The amount of powder is weighed and solved in milli-Q water and a drop of NaOH 40%.

Rifampicin

The amount of powder is weighed and solved in 1% NaHCO₃.

Trimethoprim

The amount of powder is weighed and solved in milli-Q water and a drop of acetic acid.

Tetracycline

The amount of powder is weighed and solved in 50% ethanol.

Sterilization isn't necessary anymore.

Solutions

<i>Antibiotic</i>	<i>solvent</i>	<i>concentration stock</i>
Km	H ₂ O	50mg/ml
Tc	50% ethanol	20mg/ml

Calculation

To calculate how much of an antibiotic solution, with known concentration, needs to be added to a certain amount of medium, use the following rule.

$$V_1 \cdot c_1 = V_2 \cdot c_2$$

V_1 = volume of stock solution that needs to be added to the medium to get the wanted final concentration.

V_2 = volume of the medium.

c_2 = final concentration needed.

c_1 = concentration of the stock solution.

example: *500ml of a medium is needed with a final concentration of Km 50µg/ml.*

- Prepare 500ml medium and let it cool down after sterilization.
- Prepare a solution of Kanamycin with a concentration of 50mg/ml (=5%).
- Calculate how much of the solution is needed to get to a final concentration of 50µg/ml.

$$V_1 = (V_2 \cdot c_2) / c_1$$

$$\begin{aligned} V_1 &= (500\text{ml} \cdot 50\mu\text{g/ml}) / 50\text{mg/ml} \\ &= 25000 \mu\text{g} / 50\text{mg/ml} \\ &= 25 \text{ mg} / 50\text{mg/ml} \end{aligned}$$

$$= 0,5\text{ml}$$

- Add 0,5 ml of the prepared stock solution to the 500ml medium. Make sure it's added in a sterile way.

Bijlage 4: *glp* locus en *in silico*'s

Glp locus

Rmet_2235 (*glpR*) (- strand)

Rmet_2234 (*glpS*)

Rmet_2233

Rmet_2232

Rmet_2231

Rmet_2230

Rmet_2229 (*glpV*)

Rmet_6513

Rmet_2228

>NC_007973_2443000_2452400_-1

```
ATCGCTTACGATGAGTTCCACCGGATTTATCCTCACGCTTTCCTGCCCCGACCAGCCGGGCATCGTTACGCCGTATCCGG
CCTGCTGTTCCAGCAGCGGTGCAATATCGTTGACTCCGACAGTACGGTGTATGCCTTCGCCGGCCGCTTCTTTATGCGCGT
GCATTTACGCGCGCGCCGGCCGGATCTGGCCGAGCTTCGTGCCCGCTTTGCCCCCGTGGGCGACCACTTCGCGCAT
GCAGTGGGAGGTGCACGACGCGACCGTGAAGCCGCGCGTGTATCATGGTGTGGAAGATTGGCCACTGCCTGAACGACCT
GCTGTTCCGCGCAAGGTTGGCGGTCTGCCGGTGGAGATCGCGCGATCGTCTCGAACCATCGTGACTTCTATCAGCTCGC
CGCGTGTACGACGTGCCGTCTTCCATCTGCCGTGATGAACGCATCGCGGAGCAGAAGGCCGCGCAGGAAGCGCGCGT
GTTTGAAGTCGTGCGCGAGCAGAATATCGACCTGGTGTGCTGGCCCGCTACATGCAGGTGCTGTCCGATGACCTGTGCCG
CAAGCTCCAGGGCCGCGCGATCAACATCCACCATTTCGTTCTGCGGAGCTTCAAGGGCGCCAAGCCTTACTACCAGGCGCA
TGACCGCGCGTGAAGCTGATTGGCGCGACGGCCACTACGTGACTGCCGACCTCGACGAAGGCCGATCATCGAACAGGA
GATCGAGCGCGTGGACCACAGCATGGATCCGGAGCAACTGACCGCCGTGGTTCGCGACGTCGAATGCGTGGCGCTGGCCCG
CGCCGTCAAGTGGCATGCGGAACATCGGATTCTGCTGAACGGCCACAAGACGGTGGTGTCAAGTAAGGACCGGAAACCGC
AATGGTTTTCTCCCTCTCCGAACGGGGGAGAGGGGCGGAGAGGGACGGGAGAAGGGCAGGCGGCTCAAATGCGAC
CTGTGCTGATTGCTGCTACCCCAATGCCTTCTCCAGAACCCTTTCCACAAGCGTGAAGGGAGCGCGAGACGTGAGC
CCACCACACTCCTGATCCGCGACCACACATTCCACCCCCTTTCCTGACGATCGTGTGAAAGGGCGCGGTAACGGCTCG
TCCGTGAATAGCCGGTGCATGCTCCGAGCGGCGCCAGTTCCACCATGGCTCGCCGGTTGAACTTGCTGGCGTCCGCCGCC
AGCCAGATTTCCGCGCAGTGTTCATGATCGTGGCAGACACTTGACCTCGCGAAAATCATAGTCCGCGACCGTGCCTCG
GCCTCGATGCCCGAGATGCCGATCAGGCCGATATCCACCTTGAAGTCCCGGATAATTCCACCCTAGCCTCGCCAACGATG
CCGCGGTGCGGTGAACGCAGCACGCCACCGCGCAGATGACCTCGCAGTCCGGGTTGTGCGCCAGGATATTGGCCACGTTT
AGGTTGTTGCTGATTACCCGCAAGCCCCGGTGTGATGGATCAGCGCGCGCCACTTCTCCACCCTGGTGCCTGATGTTT
ATCAGCGAGCAGCCTTCCGCGCAGGCAGCCGCCACCGCGCGCGCATGCGCGCCTTACCCTCCGCGTTCAGCAGCTGGCGT
TGCCGGTAGGCAATGTTCTCGGTGGTGCATCCCTTACCCGTACCCCGCATGAAATCGGGCCAGCATGCCGTTCTCGGC
AGCAGGTTGACGTCGCCGCGCACCGTTTGCAGGGTACGCCGAACTTGCAGCGCAATTTCGTCGATGAGAGGCAAGGCCTGC
GTGCGGACTTCTCGAGGATGCGGTTGGCGTGGATTGAGCGTCAATGTCGGCATTCTAGTTCAAACAGAAACGAAACA
AATGATGCGCGCAGTATTGTTTTGTTGTTGTTTTGAGTAAAACGAGCGGTTGCTATGAAAAGTGCAGCTCAGCCGCA
GGTTTTCGAAGTGGCTGAGCTGTCACAAGAAGAATATTGGAGACTGGATGACGCTCAGCCTGGAAGGCATTGCGCAGCACG
TGGGATCGCAAGCCTATCTTACTCGATGTCGCTGGCCCCGTGCCTGGCGCGTACAGATCCTGCTGGGAACGACCCAGG
CGGGCAAGACATCGCTGATGCGGGTATGCGAGGGCTGGACAAGCCACCGGGCCGCGTGTGTTAGACGGCGCCGAGC
TGACCGCGTGCCTGCGGGAACGCAACGTTGCTGATGGTCTATCAGCAGTTCATCAACTACCCGTGCTGCGCGTCTTCG
ACAACATGTCATCGCCGTTGCGGCTGCGCGGGATCGCCAGGCTGACGTCGACGCGCGTGTTCGCTGCTGGCGGGCGCC
TGCACATCGAACATCTGCTCGACCGTATCCCTCGGAGCTATCTGGTGGCCAGCAGCAGCGTGTGGCCCTGGCCCGCGC
TGGCCAAGAATGCGCGCTGATGCTGCTCGATGAGCCCTGGTCAACCTCGACTACAAGCTGCGCGAGGAAGTGCAGGAGG
AACTGACGCAACTCTTCGCGCAGGGCGATGCCACCGTGAATTAACCCACTACCGAGCCGGCCGAAGCGCTGCTGCTGCGT
GCCATACCGCGTGTGCTGAGCTGGCGAAGTGTTCAGTATGGCCCGACGCGGAGGTGTTCCACTATCCGGGCTCACTGC
CGGTGGCGCGCCTTACGCGATCCGCCGATGAATCTTCTCGAAGGTGTGCTGGGGCATGGCCGCGTGTGCTGGCCGGCA
ACATTTCCATCCCGATGCGCGACGTTGGCCCATGCCGATGGGCCGGTAAACGGTGGGCGTGCCTGCTGGCGCGTGGCGCTG
ACGCGTGGCCAGCAAGCTGTGGCGTGGCGGCGAGGCTGGCTGACTGACGTTGCGGGTTCGATACGTTCTGATGCTG
ATACACCCGCGCAATCTGGTGGCCAGCTTACCGGTGTGCGCGATCTCGAACTGGGCGCGAGTTGTGCTGCCATATCG
AGCCAGCGCAGATCTACCTGTTCAACGCGGACGGCGATCGCATAACGCGCGCGCCGCTCCAGGCATGTGCGCGCATCGG
CAGGCCCGTGGCGCGATTACCGAGTGGGAGCCTGATATGGCACGCATCGATCTCGACCTCGCGCACGCCATATGTCGCC
AATCCTCAGAAGGATGAGGACTACGCGTGTGCCACTACATTTACGTTTCGAGGATGGCGGTGCCACGCGTGTGGGC
CCGTACGGTGCAGCAAGACTACGTTGCTGAACTGCATCTCGGGTCTGCTGCTGCCCTCGCAAGGCACGATCAGCTTCGAT
GGCAAGGATGTGACTGGCGATTTCGCGCAGGCAACGCAACATCGCCAGGATTCAGTTCCAGTCCCGGTGATCTACGACGATG
ACGGTGGCGGAGAACCTGCGTTCACCTGCGCAACCGCGTGTACCAGCCGCGCAGGTCAGGTAAGGAGCGGGTGGCGCGT
GCCGAAATGCTCGACCTCTCGCGTGCCTGGACCGCGCGCCAGCGGGTGGTGGCGACGCCAAGCAGAAGATTTGCTG
GGTGTGTTGCTGGTGCAGGACGATCGCGCATCTGTTTCGACGAGCCGCTGACCGTGAATGACCCACTTGAAATGG
CAACTCCGTGCAAGCTCAAGGAGATCCACCAGGATTTGCGCTGACGCTGATCTACGTGACCCATGACCAGACCGAGGCA
CTGACCTTTGCCGATCAGGTTGTGGTCAATGTCGCGTGGCAAGGCCGTGCAGGTGGGCTCGGCCGATGCATTGTTGAGCGG
CCGCGCACACCTCTGTTGGGCACTTTCATCGGCTCGCCCGCATGAAATTTCTGCGGGCCAAATGGCGCGATGGTGGCATC
GAAATGCGGGGCGGCGCTACGCGCCGACCTGTCCCCAGATGGAACGCGAGGCTGCAGGCTGCCGGCCTCAAGTTC
GGCGTGGCTGGGAGTGAAGCTGGCAGCCGCAACGATCCGCGAGGCGTCCCGTGGCGTGGAGCGCGGCTGGGAACCGAGG
ATCGGCACGTAAGTGGTGTCTCAACGGTAGACCAGCGCAAGCCGCGACCTGCGCGCGCGGCTGGGAACCGAGGCC
CGCATCTGCGCGTGGCGATACCGCGTGGTGTGCGGTGTTCAACGGCATACTGCTTCTACGTCAACGAGGAACTGGT
```

CAATGAAGCCCGTCAACCAGAAGGCCTGGCTGCTGGTGTGCCAGTGGTGTGTGCGTGGCGTTCTCGGCCATCTGCCAT
TGATGACGATCGTCAATTAATCGGTGCAGGACATCATCTCGCCTGATCGGCCGGTGTTCGTGCGCACCGAATGGTTCCGCA
CCGTTCTCCGGGACGAGGAACTGCATGGCGCGCTGTTCCGCCAGCTCGGTTTCTCGTGGCCGTGCTGTGCGTGGAGATTC
CGCTCGGCATCCTGTGGCGCTGTGATGCGCGCAAGGGCTGGAAGGCATCGGCACGCTGGTTCATCATCGCGCTGTCCG
TGCTGATCCCTGGAACGTGGTCCGCACGATCTGGCAGATCTTTGGCCGTACCGATATCGGCCTGCTCGGGGCGCGCTCG
ACGGGCTAGGCTTCGCCCTACAACACTACCCGGTAGCGCGTTCGACGCCTGGGTACCCTGCTCGTCATGGACGTGTGGCACT
GGACACCCCTGGTGGCATTGCTCTGCTACGCGGGGCTGCGGGCCATCCCGGATGCCTACTACCAGGCGGGCAGATCGACG
GCGCATCGCGCTTCGCGGTGTTCCGCTTCATCCAGTTGCCAAGCTGCGCGGTGTGCTGATGATCGCGGTGCTGCTGCGCT
TCATGGACAGCTTCATGATCTACACGGAGCCGTTCGTGCTGACCGGGCGGGCCCTGGGAATGCCACCACGTTCTGTGCG
AATACCTGACGAGAAGCGGTAGGCCAGTTCGACCTGGGGCCGGCCGCGGCTTCTCGATCGTCTACTTCTGATCATCC
TGCTGACCTGCTTACCTCTACAACCTGGATGCAACGCGCCGACGCGGGCCGAGGAGATTCCGAATGGCTGAGCAT
GTGCTTCGGGCGACGCGCCAGCTGGTGGCGCCTGTATTCTGACCACCTACCTGTTGTTCGCGATCGTCCGATCTAC
TGGATGGTGAACATGTGTTCAAGACCAATGAGGAGATCGTCTCGACACTCTCGTCTGGCCGGCATCGTTCACGCTCGAG
CACTACGTGACGATCTTACCGACGCGTCTGGTACTCGGGTACATCAACTCGATGATCTAGTGGTCTGAATACGGTG
ATATCGATCGCGGTGGCGCTCCCGGCCCTACGCGTTCCTCGCGTACCAGTTCATCGGCGACAAGCAGTGTTCCTGG
CTGCTGACCAACCGCATGACGCGCGCGGTTCTCTGCTGCGGTTCTCCAGCTCTACACGACGATCGGCCATGATGGAT
ACACCTTGCGGTGGCGCATGTGGTTCACCTCAAGCTGCGGCTGGGTTGCGGTTGGATCTGGAGGGTTTCATGTCCGGC
GTGCCACGCGAGATCGACGAAACCGCTACGTTGACGGTACTCGTTCGCGGTTCTTCTGACGATCTTCTGCGCGTG
ATCAAGGCCGGGTGGCGTGGCGGCTTCTTCTGCTTACGTTTCAAGTGGGTGGAGCTGCTACTGGCGGGACGCTGACG
TCCGTCAACGCCAAGCCGATCGTGGCGACGATGACGCGCACGGTGTGCGGCTCGGGCATGGATTGGGGCGTGTGGCAGCG
GCCGGCGTCTGACCATCGTCCCGGGCGCATCGTGTGTTCTGCTGCGGCACTACATCGCGAAAGGCTTCGCGATGGGC
CGCGTTGAGGGAGGCACCGATGCTGAGCTGGATGGTGTGGACACGCCCCGTGGCGGTGTTCTTTCGCGCGGTGGTGGTGA
TGCTGATCGGCATGACGATCTGGGAACCCGTACGCGCAGCTTATGCGCAAGGGCTTCTGCCCATCGCCACCACAGCTG
GCGACCGCTGTTTACCGGCTGATGTGCGCGCGTGGATCAACCTCGCATGGGTAGGACTGGGTGAAAAGATCCAGAGCT
GGCTGCAACTGGCCGAAGAACCATCGATATGGATCAGTGCGGCGCCTCTGCTCTGGTGTGCTGCTGATCATGCGCCGGG
GCTAGTGTCCGGCGCAACGCGGATTTTGTGATGTGGGTGCGAGATCTTGTCCCTTCCCAGGGCCGCAACCCAATTAC
AGAGAGCCGGGAAGGGTTCATGAGGAGACACAGATGAAAGAGCGCGTGAAGTTGGGGATGTCGGCCCTGGCCTTTGCGG
CCGCGCTGGCTTGCGGTTCATGCGGCCTGGGCCGACGAGGCCCTCCGCGAAGAAGTGGGTAGACAACGAGTTCACGCCGTGCT
CGCTGTCCAAGGACAGATGGCGGAAATGAAGTGTTTCATGACGCGCCGCCAAGCTCAAGGCGAAGGGCGTCAACC
AGATCAACGTGGTGTCCGAAACCTTACCACGACGATGATCAAGACGCTGGCCAAAGGCTTCGAGGAAATCACCG
GCATCAAGTCAATCACGACATCATCCAGGAAGCGATGTGCTGAAAAGCTGACAGCTCGATGACGTCAGTCCGCGAAGTCGA
TCTACGATGGCTGGATCTCCGACTCGGATCTGATTGGCACGCACTACCGCTATGGCGGATCCTGCGGCTGTCCGACTACA
TGACCGGCTGGGCAAGGAGTACACGAACCCCGCATCGACATCAAGGACTTCATCGGGACGAAGTTCACCACGGCGCCGG
ACGGCAAGCTTACCAGTCCCGGATCAGCAGTTCGCCAAGCTGACTGGTTCGCGCGGCTGGTTCGCGCGCAAGGATC
TGCAGGAGAAGTTCAGGCAAGTACGGCTATGACCTGGGCGTGCCAACCAACTGGTCCGCCCTACGAGGACATTGCCAAGT
TCTTACCAACGACGTAAGGAACTTGACGGCAAGAAGTGTTCGGCCACATGGACTATGGCAAGAAGGACCCGCTGCTCG
GCTGGCGCTTACCAGTCCGCTGGCTGTGATGGCCGATCGGCGCAAGGGGCTGCCAATGGCATCCGCTGGCAGGAT
GGGGCATTCGCGTGGCCGAGGACAAGTGCACGCGGTTGGCGGCTCGGTCTCGCGTGGCGGCGCCACGAACAGCCGCGCG
CGGTCTACGCGCTGACCAAGTACATCGACTGGATGAAGAAGTACGCGCCGCGCAGGCCATGGGCATGACCTTCTCCGAGG
CGGGCCCGTGCCTGCCAGGGCCAGGTGGCGCAGCAGATCTTCTGGTACAGGCGTTCACGCGGATATGACCAAGAAGG
GCCTGCCGTTGGTCAATGCCGATGGCTCGCCGAAGTGGCGCATGGCGCCGTGCGCGTACGGCCCGTACTGGAAGCAGGGGA
TGCAGAACGGCTACCAGGACGTCGGCTCGTGGACTTCTTCAAGAACCAGTCCGAACCGTCTGGCTGCCGCTGGCTCT
ACGCGCAGTTCGTGACGTTCAAGACGTTGCTGTAAGAAATCGTACCGGCTGACCTTTATCCGCGACAGCATATTC
ACCACGATCCTGACCAAGAACGCGGACAGTATGGTGGCTGATCGAGTTCACCGCAGCCGCGCCGCTGGCTGGA
CGCCGACCGGCAACAACGTGCTGACTATCCGAAGTGGCGCAACTGTGGTGGAAAGACGTGGCCACTGCGGTGACGGGCG
AAAAGACGCTCAGGTGGCGATGGATACCCTGGCCGAGGAGATGGACAACGTGATGGCCGCTGCAGCGTGTGGCATGG
CGAATTGCGCGCCGAAGCTCAATCCGAAGAGCGATCCGTGCAAGTGGCTGTGCTGCGAACATGCGCCGTGGAAGAAGCTGG
ACAATGAAAACCAAGGCGAACCATCGCCTATGACAAGCTGCTGACGGCGTGGAAAGGAAGGGCGCGTGGCGTGAATTGT
TGCTGAACGGGGTGTTCGGCTTGTAGGGAGGAGCGCGCGCTGTTGCCCGCCGTTTCGTTTTGTGCCGGATCTGTGCCA
GTTTGGAACTTCCGCTTGCCTCCGATTCGACACCTAAAGCCCTCCATGGCTATCTAGATACGCTCGCGCTCGAGTTGGATCT
CATGGACAGAGGCAAGATGAACGAATCCGAAAGCATTTTCAGACGGCGGCAAGCTCGCGGCCAACTCGCCGACGAGCTGA
TGGGCGATTACCGACAGGCATGGCGTGGTGGGGTGTTCCTGTCCGCGCCACGCGCACGGGCAAGTGCAGCTTTCTGC
GGGAAGACCTCAGCCGGCACTCGAGCGTGTGGCGACTGGTTCGTTGGTGGGATCTATGGAAAAACAACGATGTGATC
CTGGCGACGTGATCGTACGCTGTACGCCAGGCACTGGCCGCGCATGAGGGAGTCTGTTGCCAGAGCGGCGCGCCGCTGG
GGCTGGACCGGTTCCGATTCCGAGGCTTTCTTCTCGATAGACCGGGTGGGGCTCGGCAAGGGTGTTCGCCATCCGATG
CGCTGGCCGAACGTGTCGGACAAGTCCAGCGGCCATCGCGTGTATCGA**CGAAGCTCAGCAATGCATGCCACCCGGC**
GGGCAACAACGCGATGTTCCGCTCAAGGCGGCACTGATGAACCTCGCCATCACGGCTCGCATCATCGCCCA
CGGGCTCCGATCACTCAAGCTGCGCATGCTGCTGGCTCTCGCGAGGCAATTCTTTCGCGCGCAAGCAGGATCTTCCCGG
TGCTGGGGCGTACTACATCGATTGGTTCCGTTCCGCGCACGGCTTTTCCGACGTGCTAAACCGCGATGTGATGACGCATC
TGTTCCGCGGTGCGGCGTATCGTCCCAGCTATTCCAGTCCGCGCGGTTGCGGTGGGCAGGGACGGTCTTGTCCGGGACG
ATGCGCGACGGTGTCTGAGCGGCGGATCGACGAACAGATGCGCGCCGTTTCATGCACCCGCTATGCGAACGCTGGAAGAAC
TGCCCGCGTCTGATGACGCGATCATCCGCGTATGGCGACGAGCAACAGATGTTCCGCGGATTCAGCGCGTCAACGATGC
AAACCTATCGCGGAGTCAAGACGCCCTGTCAGGCGAGCCATCGTCCGCTCTGACTACGCGGAGGTGCGAGGGCGCTGG
AAAGACTGGTGGTCTGCTGCGCTCCGACTGGCGCTCCGATGGGCTGCATGTTCTCGAAGACCAACGCTCCCGGAGGCGA
TGCGCGGTGACGGGCTGTTGACGTGGTTCAGGCGGCTCTCGGGCAGAAAGTACCCTCGTTTCCGGGGCGGAGCAGACT
TATCGGTTGCCTGA

```

Rmet_2229_3'_EcoRI      GATCGAATTC CCATGCATTGCTGAGCTTCG
Rmet_2234_5'_HindIII   GATCAAGCTT CCACCTTGAAGTCCCGGATA
Rmet_2229_tet_Rv_BcuI  CAACACTAGT CGAAACCATCGCCTATGACAAGC
Rmet_2234_tet_Fw_XbaI  ACCATCTAGA AGACCATCGACACGTTGCGTTC
Rmet_2235_5'_HindIII   GATCAAGCTT GGGCAATCGGGATGGAAATGG
Rmet_2235_3'_EcoRI     GATCGAATTC ACCGGATTTATCCTCACGCT
Rmet_2235_tet_Fw_BcuI  GTTGAAGCTT GTTTCGTCGATAGAGGCAAAGC
Rmet_2235_tet_Rv_XbaI  ACCATCTAGA GACACGATGCTGCAGGAAAGC
Rmet_2235_tet_Rv_XbaI  GTACTCTAGA GTTTCGTCGATAGAGGCAAAGC
Rmet_2235_tet_Fw_BcuI  GTGTACTAGT GAGCATCGACCGGCTATTCAC

Rmet_2235_GA_Fw      GAATTGTGAGCGGATACGGCATCGGGATGAAATGT
Rmet_2235_GA_Rv      TTCGCTATTACGCCAG ACCGGATTTATCCTCACGCT

```

Primerpaar voor de aanmaak mutant 2229-2235

Eerste pcr en klonering in pK18mob

```

Rmet_2229_3'_EcoRI      GATCGAATTC CCATGCATTGCTGAGCTTCG (69)
R_2235_3'_HindIII      GATCAAGCTT ACCGGATTTATCCTCACGCT (65)

```

Inverse PCR

```

Rmet_2229_tet_Rv_BcuI  CAACACTAGT CGAAACCATCGCCTATGACAAGC
R_2235_tet_Rv_BspTI   ACCACTTAAG GACACGATGCTGCAGGAAAGC

```

PCR ampli.tet met SpeI / BspTI primer paar

Primerpaar voor de aanmaak pBBR-2229/34

```

Rmet_2229_3'_EcoRI      GATCGAATTC CCATGCATTGCTGAGCTTCG (XbaI knipping)
R_2234_2_5'_HindIII    GTTGAAGCTT GTTTCGTCGATAGAGGCAAAGC

```

Controle/Sequencings

```

>150814-03_G23_1771ZAC138.ab1 1068
CAATAAGTCTGACTGCGTTAGCATTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAG
AATTACAACCTTATATCGTATGGGGCTGAAGTGAAGACCATCGACACGTTGCGTTCGCCGACCGGCACGCCGTCACGTCG
GCGCCGTCTACCAGCAGCGGCCCGCGGTTGGCTTGTCCAGCCCTGCCATGACCCGCATCAGCGATGTCTTGCCCGCCTGG
GTCGTTCCAGCAGGATCGTGACGGCGCCAGGCACGGGGCCAGCGACATCGAGTAAAGATAGGCTTGCGATCCACGTCG
TGCAGCAATGCCTTCCAGGCTGAGCTGCATCCAGTCTCCAATATTCTTCTTGTGACAGCTCAGCCACTTCGAAAACCTGCGG
CTGAGGCGCACTTTTCATAGCAACCCGCTCGTTTTAGCTCAAAAACGAACAAAAACAATACTGCGCCCGCTCATTTGTTT
TCGTTTTCTGTTTGAAGTGAATGCGCGACATGACGCTCAATCCACGCCAGACCCGCACTCCTCGAGGAAGTCCGCACGCAGG
GCTTTGCTCTATCGACGAACTCGCGCGCAAGTTCGGCGTGACCCGTGCAACCGGTGCGCCGGGACGTC AACCTGCTGGCCG
AGAACGGCATGCTGGCCGATTTTCATGGCGGGTACGGGTAGAGGGATCGACCACCGAGAACATTGCCTACCGGCAACGCC
AGGTGCTGAACCGGAGGGTAAGGCGCGCATCGCGCGCGCTGGCAGCTGCCGTGCGGGAAGGCTGCTCGTGATCCTGA
ACATCGGCACCACGGTGAAGAAGTGGCGCGCGCTGATCCATCACCGGGCTTGCGGTAATCACGAACAACCTGAACG
TGGCCAATATCCTGGCCGACAACCCGACTGCGAGGTCATCGTCCGGTGGCGTGCTGCGTTCACGCGACCGCGGCATCG
TTGGCGAGGCTACGGTGAATTTATCCGGCAGTCAGTGGGAAACCTTTGAATAAAAACCCCGGGCACCTTCCACCCAGG
GAGGCTGGTAAGAAT

>150814-03_G23_1771ZAC138.ab1 1068 reverse complement
ATTCTTACCAGCCTCCCTGGGTGGAAGGTGCCCGGGTTTTTATTCAAAGGTTTTCCCACTGACTGCCGGATAAAATCCA
CCGTAGCCTCGCCAACGATGCCGCGTCCGTGAACGCAGCACGCCACCGGCGACGATGACCTCGCAGTCGGGTTGTGCGG
CCAGGATATGGCCACGTTTCAAGTTGTTTCGTGATTACCCGCAAGCCCCGGTATGGATCAGCGCGCGGCCACTTCTTCCA
CCGTGGTGGCGATGTTTCAAGATCAGCGAGCAGCCTTCCGGCACGGCAGCTGCCACGGCGCGCGATGCGCGCCTTACCCT
CCGCGTTCAACACCTGGCGTTGCCGTTAGGCAATGTTCTCGTGGTTCGATCCCTTACCCGTACCCCGCATGAAATCGGG
CCAGCATGCCGTTCTCGCCAGCAGGTTGACGTCGCCGCGCACCGTTTGCAGGGTACGCGCAACTTGCAGCGGAGTTTCGT
CGATAGAGGCAAAAGCCTTCCGTGCGGACTTCTCGAGGAGTGGCGTCTGGCGTGGATTGAGCGTCAATGTCGGCATTCTAG
TTCAAACAGAAACGAAAACAATGACGCGCGCAGTATTGTTTTGTGTTTCGTTTTTGGAGCTAAAACGAGCGGGTTGCTATG
AAAAGTGCCTCAGCCGACGTTTTCGAAGTGGCTGAGCTGTCACAAGAAGAATATTGGAGACTGGATGCAGCTCAGCCT
GGAAGGCATGCGCAGCAGTGGGATCGCAAGCCTATCTTACTCGATGTCGCTGGCCCCGCTGCTGGCGCGGTCACGAT
CCTGCTGGGAACGACCCAGCGGGCAAGACATCGCTGATGCGGGTTCATGGCAGGGCTGGACAGCCACCGCGGGCCGCGT
GCTGGTAGACGGCGCCGACGTGACCGGCTGCCGGTGCAGGAAACGCAACGTCGATGGTCTTCTAGTTTACAGCCCATACG
ATATAAGTTGTAATTTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATGCTAACG
CAGTCAGACTTATTG

```


In silico's

De linkse figuur geeft de PCR weer en de rechtse figuur de verwachte grootte op gel.

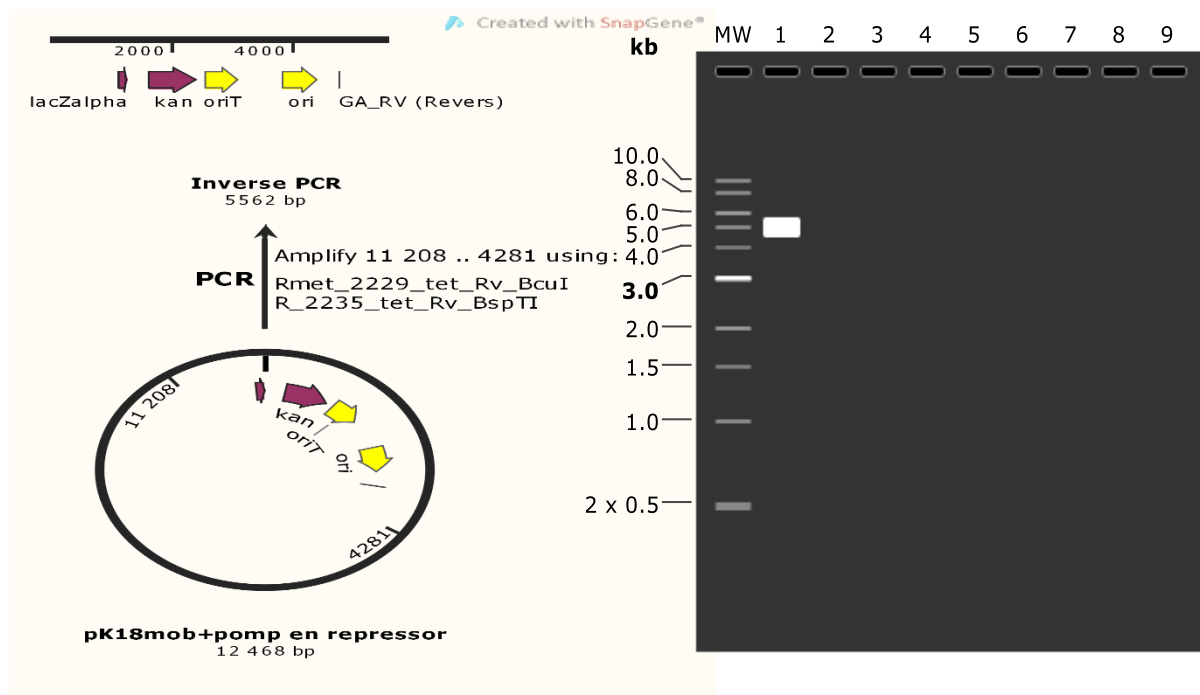
PCR ABC-transporter (pomp+repressor)

primerpaar	Rmet_22229_3'_EcoRI en R_2235_3'_HINDIII
Amplicon	8740 bp



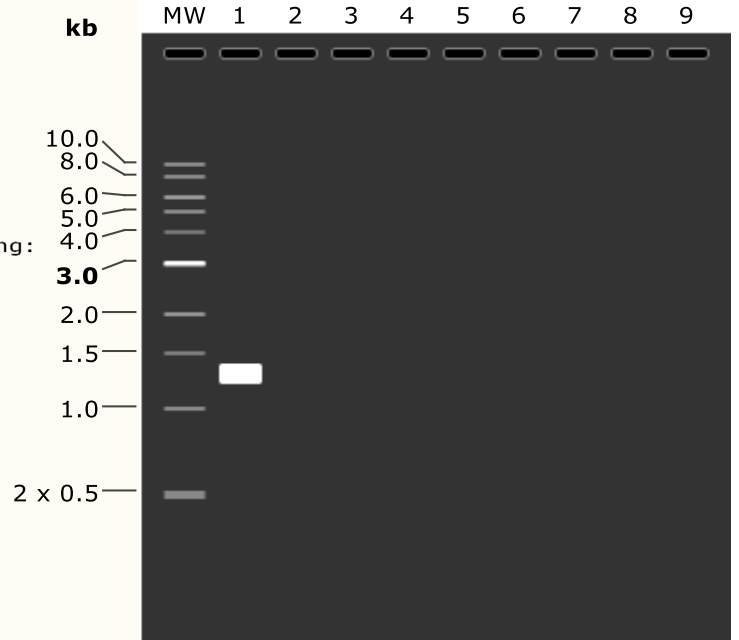
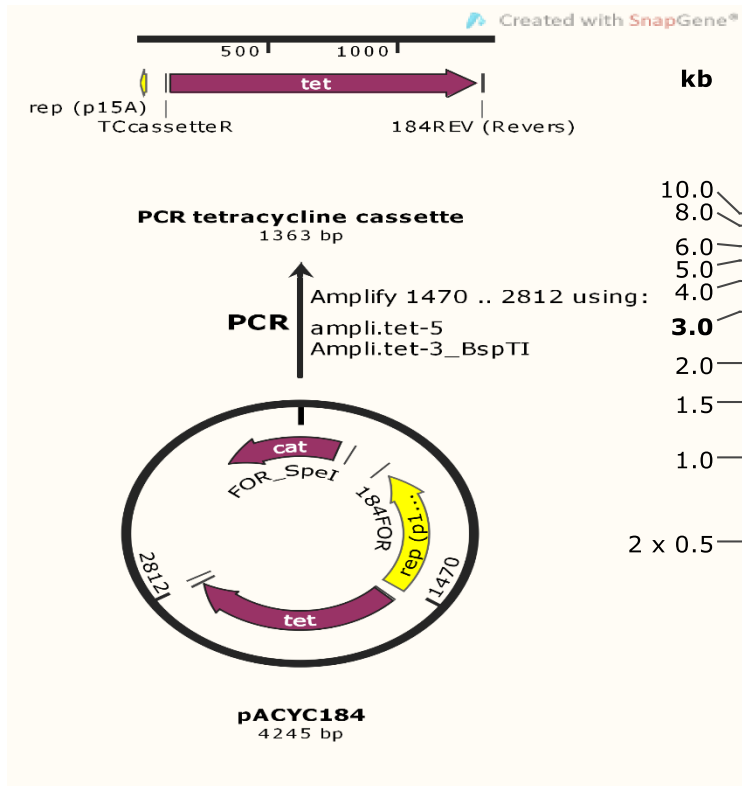
Inverse PCR

primerpaar	Rmet_2229_tet_Rv_BcuI en R_2235_tet_Rv_BspTI
Amplicon	+/- 5.8kb



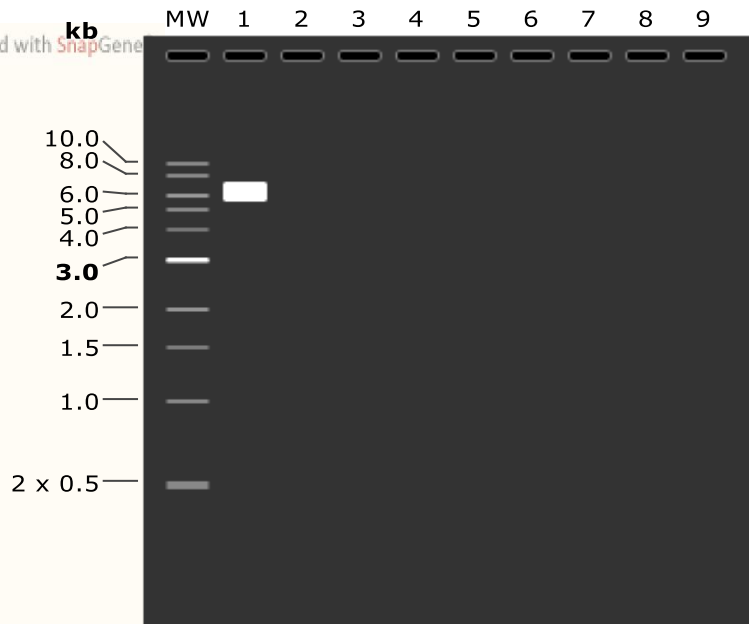
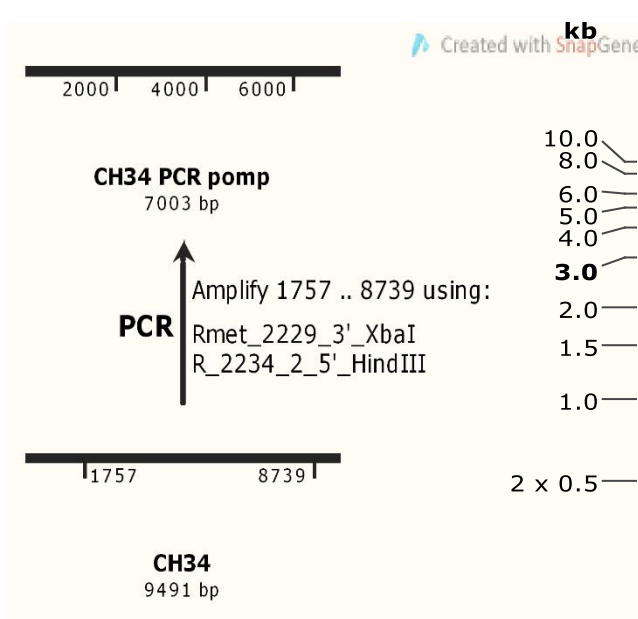
PCR-tetracycline cassette

Primerpaar	Ampli.tet-5 en ampli.tet-3_BspTI
Amplicon	+/- 1500 bp



PCR pomp

primerpaar	Rmet_2229_3'_XbaI en R_2234_2_5'_HindIII
Amplicon	7kb



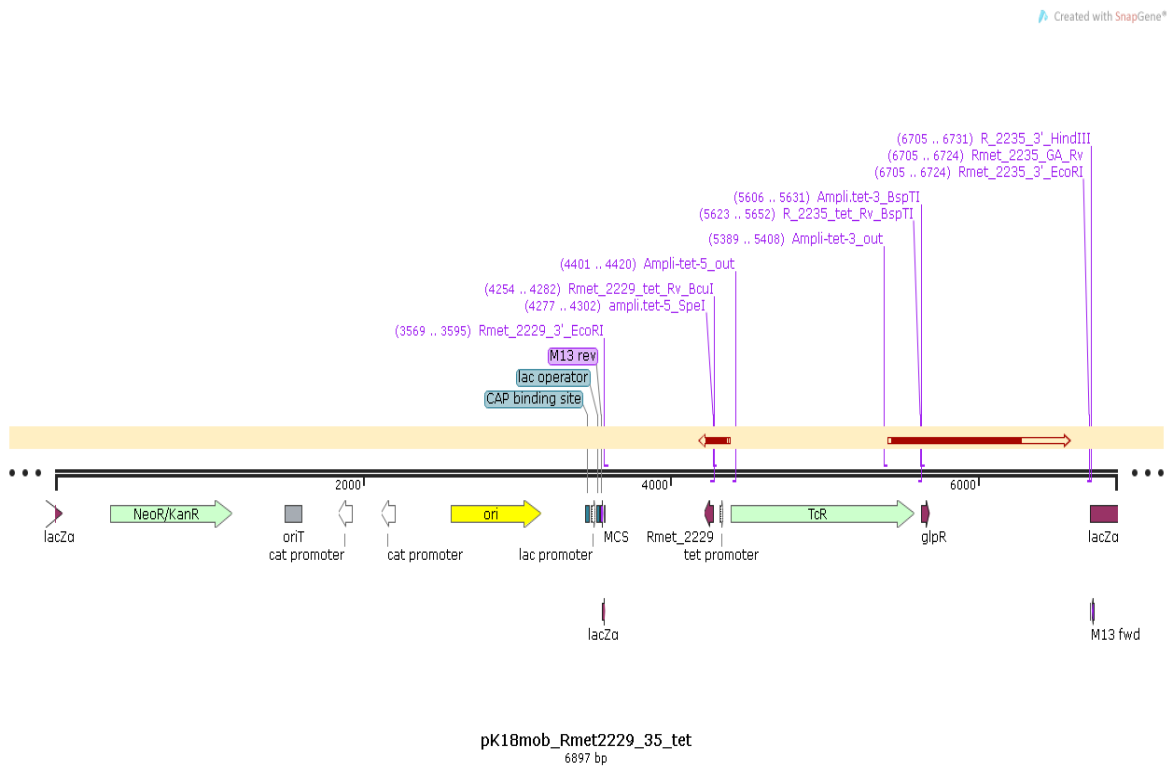
Bijlage 5: kolonie PCR pK18mob_Rmet_2229_2235



Bijlage 6: sequentie-analyse

Rmet_2229_2235::tet (pomp + repressor vervangen door tetracycline cassette)

De pijlen geven de overeenkomst weer tussen beide sequenties voor zowel amplitet_3_out als amplitet_5_out.



pBBRMCS2_2229_2234

De pijlen geven de overeenkomst weer tussen de beide sequenties met de M13 primers

