



CHALMERS
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

*Karakterisering av en ny
(?) flockuleringsgen*

Kandidatarbete i bioteknik

KBTX01-15-17

Handledare: Carl Johan Franzén och Johan Westman

19 maj 2015

Jonathan Aldridge

Christoffer Dall

Alan Dazay

Marcus Hanaeus

John Hellgren

Lina Lawenius

FÖRORD

Vi vill tacka vår handledare Dr. Johan Westman som har varit ett stort stöd vid utförande av arbetet. Vi vill även tacka Docent Carl Johan Franzén för respons och hjälp under arbetets gång.

SAMMANDRAG

Flockulering är en mekanism hos *Saccharomyces cerevisiae* där jästceller binder till varandra och bildar flockar. Bindningen utförs av ytproteiner (flockuliner) som binder till sockerarter i cellväggen hos närliggande celler. Denna funktion regleras av en grupp gener kallade flockuleringsgener (*FLO*-gener).

I denna rapport undersöks om *FLO12hyp* (GenBank nummer KJ716851.1) är en paralog eller en allel av en känd *FLO*-gen. *FLO12hyp* har tidigare isolerats ur den osekvenserade jäststammen *S. Cerevisiae* CCUG 53310. För att undersöka om det är en ny gen har invers PCR använts för att kunna sekvensera genens flankerande DNA regioner. Därefter jämfördes dessa med de tidigare kända flankerande regionerna till *FLO*-generna i jäststammen *S. Cerevisiae* S288C. Resultatet visade att de flankerande regionerna till *FLO12hyp* har 99 % likhet med motsvarande regioner i *FLO1*. Detta kombinerat med närvaron av *FLO1* i CCUG 53310:s genom, leder till slutsatsen att *FLO12hyp* i denna stam är en paralog till *FLO1*.

I denna rapport har även Flo12p:s fenotyp undersökts genom att introducera *FLO12hyp* i den annars ickeflockulerande jäststammen *S. Cerevisiae* CEN.PK 113-7D. Denna NewFlo-fenotyp jämfördes sedan med fenotypen som erhöles då glutaminsyran (på plats 200 i aminosyrasekvensen) muterats till en glycin i *FLO12hyp*. Mutationen skapades med hjälp av mutagen-PCR följt av fusion-PCR. Den muterade genen transformerades sedan in i den ickeflockulerande jäststammen CEN.PK 113-7D via en litiumacetat baserad metod. Flockuleringstestets resultat visade inte på någon fenotypisk skillnad men fler tester bör genomföras för att en slutsats skall kunna dras.

Studien har bidragit till grundforskning kring flockuleringsgener hos jäststammen CCUG 53310. Eftersom CCUG 53310 uppvisar en Flo1-fenotyp bör CCUG 53310 ha fler aktiva flockuleringsgener som kompenserar uttrycket av *FLO12hyp*.

ABSTRACT

Flocculation is a mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* where yeast cells form flocs by binding to neighboring cells using surface proteins (flocculins) that bind to sugars in the cell wall. There are several genes that contribute to this function and they are collectively called flocculation genes (*FLO*-genes).

This report examines if *FLO12hyp* (GenBank number KJ716851.1) is a paralog or an allele of an existing *FLO*-gene. *FLO12hyp* has previously been isolated from the unsequenced yeast strain *S. Cerevisiae* CCUG 53310. Inverse PCR was used to be able to sequence the flanking DNA regions of the gene. These sequences were then compared to the flanking regions of the known *FLO*-genes in the yeast strain *S. cerevisiae* S288C. The result showed that the flanking regions in *FLO12hyp* have 99 % identity with the corresponding regions in *FLO1*. This combined with the presence of *FLO1* in the CCUG 53310 genome leads to the conclusion that *FLO12hyp* is a paralog of *FLO1* specific to CCUG 53310.

This report also evaluates the phenotype of Flo12p with and without mutating amino acid number 200 from glutamic acid to glycine in *FLO12hyp*. These two versions of *FLO12hyp* were then introduced to the non-flocculating yeast strain *S. Cerevisiae* CEN.PK 113-7D. The mutation was made by site-directed mutagenesis followed by a Fusion-PCR and then transformation into a non-flocculating yeast by the lithium acetate based method. The result of the flocculation tests did not indicate any phenotypical difference since both variants showed similar NewFlo phenotype. However, more tests have to be made to conclude whether the mutation results in a different phenotype.

This study has contributed to basic research in the field of flocculating yeast. Since CCUG 53310 shows a Flo1-phenotype it should have several active flocculation genes that compensate for the expression of *FLO12hyp*.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1	INTRODUKTION	1
2	SYFTE	2
3	TEORETISK BAKGRUND	2
3.1	FLOCKULERING	2
3.2	PCR	4
3.3	INVERS PCR.....	4
3.4	MUTAGEN-PCR OCH FUSION-PCR.....	5
3.5	TRANSFORMATION.....	6
3.6	FLOCKULERINGSTEST	6
4	METOD	7
4.1	GEMENSAM LABORATIV DEL.....	7
4.2	UNDERSÖKNING AV FLANKERANDE SEKVENSER TILL <i>FLO12HYP</i>	7
4.2.1	<i>Bioinformatik</i>	7
4.2.2	<i>Laborativ del</i>	8
4.3	FENOTYPTEST	9
4.3.1	<i>Bioinformatik</i>	9
4.3.2	<i>Laborativ del</i>	10
5	RESULTAT	13
5.1	UNDERSÖKNING AV FLANKERANDE SEKVENSER TILL <i>FLO12HYP</i>	13
5.1.1	<i>Gelresultat 1</i>	13
5.1.2	<i>Gelresultat 2</i>	15
5.1.3	<i>Positiv kontroll</i>	15
5.1.4	<i>Sekvenseringsresultat</i>	16
5.1.5	<i>Negativ kontroll av IPCR</i>	17
5.1.6	<i>FLO1 kontroll i CCUG 53310</i>	17
5.2	FENOTYPTEST	18
5.2.1	<i>Gelresultat</i>	18
5.2.2	<i>Sekvenseringsresultat 1</i>	19
5.2.3	<i>Sekvenseringsresultat 2</i>	19
5.2.4	<i>Flockuleringstest</i>	20
6	DISKUSSION	21
7	SLUTSATS	24
8	KÄLLOR	25
	BILAGA	26

ORDLISTA

Bp = baspar

FLO-gen = flockuleringsgen

Flockulin = flockuleringsprotein

FW primer = framåt primer

GPI = glykosylfosfatidylinositol

IPCR = invers PCR

OD₆₀₀ = optisk densitet vid 600 nm

PCR = polymerase chain reaction

PEG = polyethylene glycol

RV primer = bakåt primer

YPD = yeast extract peptone dextrose

1 INTRODUKTION

Då efterfrågan på förnyelsebara bränslen ökat kan bioetanol användas som ett alternativ till fossila bränslen. Dock framställs det mesta av etanolen av majs, vete och sockerrör som istället kan användas för matproduktion till boskap eller den lokala befolkningen. Odlingarna tar dessutom upp stora odlingsarealer för att mätta behovet av drivmedel. För att lösa dessa problem kan istället trä användas som utgångsmaterial för att med hjälp av jäst producera bioetanol (**Alvira et al., 2010**).

Trä består till stor del av lignocellulosa vars största beståndsdelar är cellulosa, lignin och hemicellulosa. Lignocellulosa kan även utvinnas ur restprodukter från jordbruket, till exempel majsstjälkar. Vid förbehandling och hydrolys av lignocellulosa bildas dock inhiberande ämnen vilka hindrar fermentationen (**Alvira et al., 2010**). Denna inhibering kan motverkas genom att använda en flockulerande stam av jästen *Saccharomyces cerevisiae* som flockulerar (bildar små sfäriska kolonier). Flockulering skapar förutsättningar som liknar en biofilm där de yttre cellerna skyddar de inre och det bildas en sjunkande koncentrationsgradient av inhibitorer inåt i flocken (**Westman et al., 2015**). Den här egenskapen möjliggörs av ytproteiner som binder till cellväggen hos närliggande celler.

För att kunna utnyttja flockuleringsegenskapen fullt ut vid bioetanolproduktion av lignocellulosa krävs en hel del grundforskning. Flertalet gener har identifierats vara involverade vid flockulering (**Goossens och Willaert, 2010**), exempelvis den nyligen sekvenserade genen *FLO12hyp* (**Westman et al., 2015**).

I detta projekt undersöks de flankerande DNA-regionerna till den potentiellt nya genen *FLO12hyp*, isolerad ur den osekvenserade stammen *S. cerevisiae* CCUG 53310. Syftet är att undersöka om det är en ny gen, vilket har föreslagits på grund av jästens unika flockuleringsfenotyp. De flankerande regionerna är av intresse då liknande icke-kodande sekvenser skulle tyda på gemensamt ursprung samt eventuell position i genomet. Framförallt är de regulatoriska elementen (i de flankerande regionerna) bevarade för gener med liknande uttrycksprofil och eventuellt liknande funktion (**Chin et al., 2005**). Om den flankerande sekvensen uppströms om *FLO12hyp* visar en tillräckligt hög likhet med motsvarande sekvens till en annan flockuleringsgen (*FLO*-gen), kan detta indikera att generna finns på samma plats i de olika stammarna och då är alleler till varandra.

Projektet undersöker även fenotypskillnad av proteinet Flo12p med och utan mutation E200G (aminosyra nummer 200 muteras från glutaminsyra till glycin). Detta eftersom Westman (2015) har en teori om att glutaminsyran på denna plats bidrar till den observerade NewFlo-fenotypen. Mutation till glycin skulle enligt teorin innebära att flockuleringen inhiberas vid en högre sockerkoncentration.

Projektet delas upp i två delar som benämns "Undersökning av flankerande sekvenser till *FLO12hyp*" och "Fenotypstest" i rapporten.

2 SYFTE

Syftet med arbetet är att undersöka om *FLO12hyp* är en ny gen hos jäststammen *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 53310, samt utvärdera hur flockulerings-egenskaperna påverkas av en förändring i aminosyrasekvensen hos flockulinen.

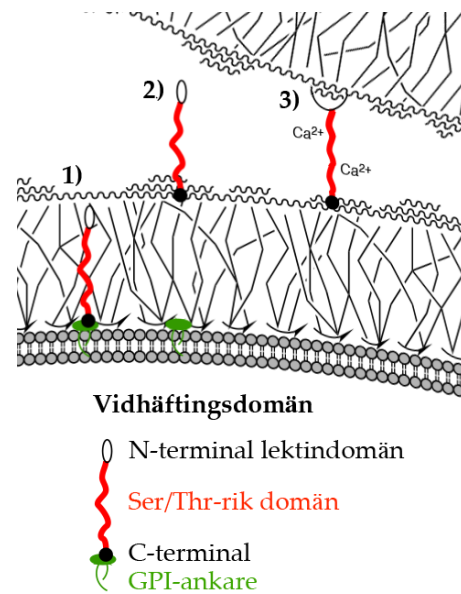
3 TEORETISK BAKGRUND

3.1 FLOCKULERING

Flockulering uppstår då jästceller bildar flockar genom interaktioner av proteiner (flockuliner) vilka förankrar sin C-terminal via en del av ett glykosylfosfatidylinositol (GPI)-ankare i cellväggen. Flockulinerna har en lektindomän vid sin N-terminal som binder till mannosoligomerer på cellväggen hos närliggande jästceller (Figur 1).

Mekanismen är beroende av kalciumjoner som ger flockulinen sin raka aktiva form när jonerna binds in (Verstrepen och Klis, 2006). Hur stark flockuleringen blir beror bland annat på antalet tandem-repeterade sekvenser i mitten av proteinet. Ett flockulin med flera repeterade sekvenser flockulerar starkare än motsvarande flockulin med färre repeterade sekvenser (Verstrepen et al., 2005). Detta tros bero på att ett kortare flockulin inte når ut från den egna cellväggen lika långt som ett längre. Är flockulinet alldeles för kort kan det inte passera cellens egna lager av mannosoligomerer (Verstrepen och Klis, 2006). Den dominanta flockuleringsgenen *FLO1* är den längsta flockuleringsgenen och har bland annat 18 tandem-repetitioner i mitten av genen, vilka är 135 baspar (bp) var (Goossens och Willaert, 2010).

Flockuleringen i *S. cerevisiae* delas in i två olika kategorier: Flo1-fenotyp och NewFlo-fenotyp. Celler med Flo1-fenotypen binder endast till mannos medan de med NewFlo-fenotyp binder till flera olika sorters sockerarter. Många bryggerijäster uppvisar NewFlo-fenotyp vilket medför att flockuleringen inhiberas då det finns fria sockerarter i lösningen. När koncentrationen socker i mediet är för hög binder flockulinerna till fritt socker istället för mannosoligomererna som befinner sig på



Figur 1. Flockulering mellan två jästceller. 1) Flockulinen lokaliserar till cellmembranet. 2) Större delen av GPI-ankaret klyvs av och flockulinen binder kovalent till cellväggen via kvarvarande del av GPI-ankaret. 3) Kalciumjoner binds in till flockulinen och möjliggör binding till mannosoligomerer på närliggande celler (Verstrepen and Klis, 2006). Bild adapterad från Verstrepen och Klis (2006)

närliggande cellväggar. När fermentationen är klar och sockerkoncentrationen är låg börjar de flockulera och kan då lätt avlägnas från produkten (**Verstrepen och Klis, 2006**).

De viktigaste generna i flockuleringsfamiljen är *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* och *FLO11* där *FLO1*, *5*, *9* och *10* är flockuliner. Både *FLO1* och *FLO5* ger stark flockulering när de uttrycks individuellt, medan *FLO10* ger svag flockulering. Flockuleringsgenen *FLO9* saknas i vissa stammar och *FLO11* möjliggör bindning till ytor såsom agar eller plast (**Goossens och Willaert, 2010**). *FLO8* är en transkriptionsaktivator som behövs för att kunna uttrycka flockuleringsgenerna. En enskild mutation av ett baspar i *FLO8* i *S. cerevisiae* S288C resulterar i ett stoppkodon mitt i genen och gör transkriptionsfaktorn dysfunktionell (**Liu et al., 1996**). Detta medför att S288C inte flockulerar trots att den har alla flockuleringsgenerna i sitt genom (**Goossens och Willaert, 2010**).

Sekvenserna för flockuleringsgenerna är kända och de är alla lokaliserade nära telomererna i genomet. *FLO1* har 96 % likhet med *FLO5* och 94 % likhet med *FLO9*. Trots den höga homologin mellan *FLO1* och *FLO5* är de inte alleler (varianter) (**Goossens och Willaert, 2010**) utan istället paraloger (**Katju et al., 2009**). Paralogi innebär att en gen har hamnat på två olika ställen i genomet under en genduplikering, för att sedan genom evolutionens gång ge upphov till två olika gener (**Alberts, 2008**).

Det uppträder stor fenotypisk variabilitet mellan stammar av flockulerande jäst beroende på vilken omgivning de har kultiverats i. Fenotypen som flockuleringsgenerna ger upphov till ändras mycket i synnerhet jämfört med andra proteinkodande sekvenser. Detta beror på att de utsätts för subtelomeriska växlingar, vilket innebär att deras närhet till telomererna ger upphov till stor variation i uttrycket av generna (**Kitada, 2011**). Dessutom förekommer rekombination av de repeterade sekvenserna inom och mellan olika flockuleringsgener vilket resulterar i både förlängning och förkortning av flockulinen. Egenskaperna ger jästcellerna inom flockulerande stammar en mycket stor reservoar av flockuleringsvariationer (**Verstrepen et al., 2005**).

Den osekvenserade jäststammen CCUG 53310 uttrycker en okänd kombination av *FLO*-gener vilket resulterar i flockulering som endast inhiberas av mannos (Flo1-fenotyp) (**Westman et al., 2012**). I en studie av Westman (2015) har en potentiellt ny gen i *FLO*-familjen isolerats från jäststammen CCUG 53310 med primers designade för *FLO1*. Genen fick namnet *FLO12hyp* och är 3408 bp lång, vilket är 1206 bp kortare än *FLO1*. Förutom skillnad i längd finns det en del skillnader vid bland annat N-terminalen, som binder till sockerarterna, mellan flockulinerna Flo12p och Flo1p. Translaterad har Flo12p 89 % likhet med Flo1p, 88 % med Flo5p och 90 % med Flo9p (**Westman et al., 2015**). Homologin kan tyda på att *FLO12hyp* är en paralog till någon av *FLO*-generna, och därmed en ny gen, eller endast en allel av en tidigare känd *FLO*-

gen. Det är dock inte fastställt om *FLO12hyp* uttrycks i vildtypsstammen CCUG 53310, och om det eventuella uttrycket bidrar till den observerade fenotypen.

För att undersöka flockuleringsegenskaperna hos Flo12p kan genen uttryckas i *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D, som annars inte flockulerar eftersom den saknar de nödvändiga flockuleringsgenerna (Nijkamp et al., 2012). När *FLO12hyp* uttrycks i CEN.PK 113-7D uppvisar flockuleringen en NewFlo-fenotyp även vid låga koncentrationer av sockerarter (Westman et al., 2015).

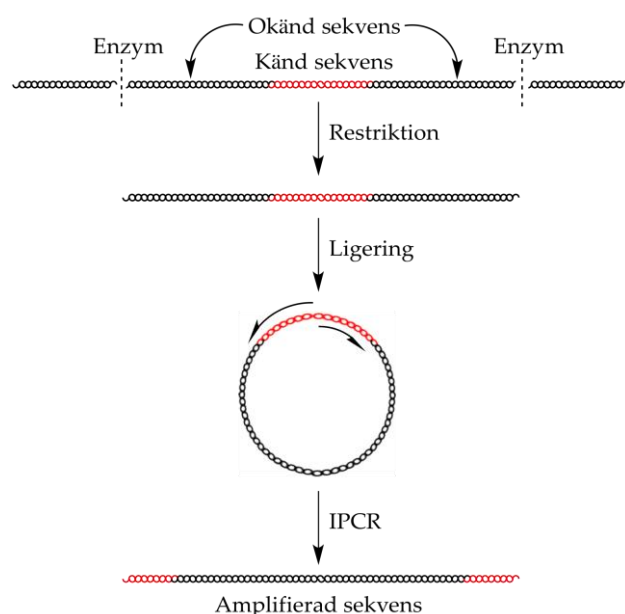
3.2 PCR

Polymerase chain reaction (PCR) är en metod som amplifierar DNA-fragment. För att PCR ska fungera används korta oligonukleotider, så kallade primers, som är komplementära till ändarna av DNA-fragmentet. Fria nukleotider används som byggstenar för DNA-polymeras som förlänger (elongerar) oligonukleotiderna som bundit till det enkelsträngade DNA:t. Metoden går ut på att temperaturen varieras i lösningen. Först denatureras det dubbelsträngade DNA:t till två enkelsträngar vid en hög temperatur. Därefter binder primers till ändarna på sekvensen som ska amplificeras, vilket kallas annealing, och sedan sker elongeringen. Detta upprepas i flera cykler och den slutgiltiga produkten blir det amplifierade DNA-fragmentet.

3.3 INVERS PCR

En brist med traditionell PCR är att metoden endast kan amplificera en känd sekvens eftersom primers måste flankera sekvensen som ska amplificeras. En metod som kallas för invers PCR är framtagen av tre oberoende forskargrupper (Ochman et al., 1988, Silver and Keerikatte, 1989, Triglia et al., 1988) och har möjliggjort amplifiering av okända flankerade regioner kring en känd sekvens.

Det DNA som amplificeras klipps med ett restriktionsenzym vilket inte klipper i den kända sekvensen. Eftersom klyvningställerna inte är kända i den okända sekvensen är det inte känt vilka restriktionsenzym som ger lämplig produkt och därför bör flera olika restriktionsenzym testas. De resulterande fragmenten från restriktionssteget ligeras ihop till cirkulärt DNA, så



Figur 2. Schematisk bild av invers PCR. Bild: Wheeler (2005). Creative commons. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/9/98/Inverse_PCR.png. Adapterad.

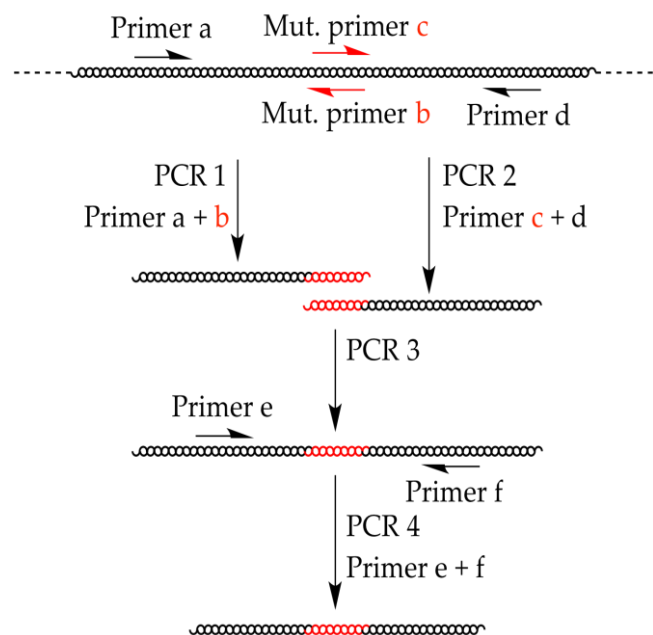
sekvensen kan amplifieras (Triglia et al., 1988). Ligeringen underlättas genom att använda restriktionsenzym som klipper med “sticky ends”, vilket skapar överlapp mellan DNA-fragmenten.

Primers designas så att de binder in till ändarna på den kända sekvensen i det cirkulära DNA:t men till skillnad från vanlig PCR kommer de amplifiera ut från genen. Resultatet blir en produkt av ändarna på genen samt en del av de flankerade regionerna (Figur 2) som sedan skickas för sekvensering. Uppströms och nedströms flankerande sekvenser särskiljs med restriktionsklyvningsplatsen (Ochman et al., 1988). Principen för IPCR är samma som PCR men eftersom längden på den okända sekvensen som ska amplifieras inte är känd får tiden för elongeringssteget testas fram.

3.4 MUTAGEN-PCR OCH FUSION-PCR

I syfte att byta ut, lägga till eller ta bort aminosyror i ett protein kan fyra PCR:er användas där ett mutagen primerpar utnyttjas som innehåller en eller flera avvikelser från genen av intresse. Om målet är att introducera en aminosyra infogas ett kodon i primerparet. Kodonet kommer inte binda komplementärt till genen, men denna avvikelse vägs upp av andra baspar vilka är komplementära mot genen. På samma sätt raderas ett kodon i primern för att bli av med en aminosyra i det slutliga proteinet. För att byta ut en aminosyra mot en annan i proteinet ändras de baspar som behövs (Ho et al., 1989).

I de två första PCR:erna (mutagen-PCR) används en mutagen-primer samt en primer som binder till änden av DNA-fragmentet som ska amplifieras (se primer a-d i Figur 3). Genen blir efter de två separata PCR:erna uppdelad på två DNA-fragment med mutationen introducerad på ändarna av sekvensen. I en tredje PCR (fusion-PCR) är målet att klistra ihop dessa två DNA-fragment. De är komplementära mot varandra på de ändar där mutationen har introducerats. De första 10 cyklerna körs därför utan tillsatta primerpar. På så sätt fungerar DNA-fragmenten som primers till



Figur 3. Schematisk bild över mutagen-PCR med primers vid varje reaktionssteg. Bild adapterad från Ho (1989).

varandra och ger en lång produkt som sedan amplifieras med primers e och f i en sista PCR (Figur 3). Produkten kan sedan med homolog rekombination transformeras till organism av intresse (**Ho et al., 1989**).

3.5 TRANSFORMATION

Transformation är en metod som används för att kunna integrera främmande DNA i en organism. För att få en lyckad transformation i till exempel jäst måste det främmande DNA:t ta sig genom cellväggen och cellmembranet för att nå fram till cellkärnan där fragmentet genom homolog rekombination kan integreras på önskad plats i kromosomen. För att integrera ett DNA-fragment med homolog rekombination krävs det att fragmentet flankeras av DNA sekvenser som är homologa till den plats som fragmentet skall integreras. Det finns olika teorier angående vilken mekanism som gör transformationen möjlig men ingen är formellt erkänd. Transformationsmetoden som användes i arbetet var en litiumacetat baserad som anses vara lättare och snabbare att genomföra än andra transformationsmetoder som exempelvis sferoplastmetoden. För att DNA ska fästa på jästens cellvägg används PEG (polyethylene glycol). PEG hjälper troligtvis även till med att få DNA genom cellmembranet. Litium-acetat och värmechock gör att DNA kan transporteras genom jästens cellvägg (**Kawai et al., 2010**).

3.6 FLOCKULERINGSTEST

Flockuleringstestet genomförs för att karaktärisera fenotyper och upptäcka skillnader mellan olika flockulerande jäststammar. De jäststammar som jämförs utsätts för varierande sockerkoncentration av olika sockerarter. Uträkning av total cellkoncentration görs från början med hjälp av en räknekammare, för att sedan övergå till en spektrofotometer och mätning av den optiska densiteten vid 600 nm (OD_{600}) och erhålla absorbansvärden. Ett nollprov visar den totala cellkoncentrationens absorbans, då det inte innehåller något kalcium. Utan kalcium kan inte cellerna flockulera och alla är därmed fria och mätbara. Då OD_{600} mäts för proverna (innehållandes olika jäststammar, sockerarter och koncentrationer) fås ett absorbansvärde, som beskriver hur många celler som är fria. Absorbansen blir lägre vid ökad flockulering då fria celler klumpar ihop sig (**Soares och Mota, 1997**).

4 METOD

4.1 GEMENSAM LABORATIV DEL

Jäststammarna *S. cerevisiae* CCUG 53310, S288C och CEN-PK 113-7D ympades till varsin E-kolv med yeast extract peptone dextrose medium (YPD), och placerades på skakplatta över natt i 30 °C.

Cellerna centrifugerades, och pelleten löstes upp i lyserings-buffert. Glaskulor och fenol:kloroform (1:1) tillsattes för att med hjälp av en ”bead beater” förstöra cellväggarna. Det övre vattenskiktet fördes över till ett nytt eppendorfrör, och isopropanol tillsattes innan centrifugering. Den resulterande pelleten tvättades med 70 % etanol. Därefter centrifugerades proven ytterligare en gång och pelleten löses upp i TE buffert. DNA koncentrationen i lösningen bestämdes med NanoDrop 2000.

4.2 UNDERSÖKNING AV FLANKERANDE SEKVENSER TILL *FLO12HYP*

4.2.1 BIOINFORMATIK

För att designa lämpliga primers med önskad specificitet till *FLO12hyp* jämfördes sekvensen för genen med de andra kända *FLO*-generna i EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html). Sekvenserna av de kända flockuleringsgenerna kommer från *S. cerevisiae* S288C (*Saccharomyces* Genome Database) och sekvensen till *FLO12hyp* finns i GenBank med nummer KJ716851.1. Primers designades (Tabell 1) så att de började elongera minst 100 bp in i *FLO12hyp* för att kunna särskilja *FLO12hyp* från *FLO*-generna. De primers som designades skulle vara minst 24 bp långa, ha ett G/C-innehåll på 40-60 % samt att minst ett av de tre sista basparen utgörs av G eller C. Primers för *FLO11* (positivt test) samt *FLO1* designades på samma sätt. Val av restriktionsenzym som inte klipper i *FLO12hyp* utfördes med hjälp av NebCutter.

Tabell 1. PCR primers använda för att utföra IPCR och PCR (*FLO1*-primer).

Primer	Nukleotidsekvens (5'-3')
FLO12_FW_J	AAGAGTCTAACAAGTTCCGGGTTGAGC
FLO12_RV_J	CCCAATTTGACTTTGTCTGCATATTGG
FLO12_FW_A	GCACTATGTCGCAACAGCCTC
FLO12_RV_A	CCCACTAACAGAGCCCAATTTGAC
FLO12_RV_J_2	AGTGGTATTAAGCAATGGAATGAAAGTC
FLO12_RV_A_2	AACCTCAGGGACATATCAGTGC
FLO11_FW_P	TTCTGCAGTCGCTACATACTCTGTTC
FLO11_RV_P	GTCTAAGTTGGGACAGCCATTAACG
FLO1_FW	CATCAACGAACTTTACCATTGAC
FLO1_RV	GGGACAGTACAGTTAGATTGACTT

4.2.2 LABORATIV DEL

Genomiskt DNA från jäststammen *S. cerevisiae* CCUG 53310 klipptes med 10 olika restriktionsenzym (~50µg/ml DNA i varje prov) i Fast Digest buffert. Proverna inkuberades i 37 °C i 60 minuter och restriktionsenzymerna inaktiverades i 80 °C i 20 minuter. Restriktionsenzymen numrerades enligt Tabell 2. Samtliga enzymer i denna rapport producerades av ThermoScientific och för samtliga enzymatiska reaktioner användes medföljande protokoll.

Tabell 2. Använda restriktionsenzym.

Enzymer	
1. AatII	Proverna självligades till cirkulära DNA-fragment över natt med T4 DNA Ligas i rumstemperatur vid en DNA koncentration på 1 µg/ml. Det ligerade DNA:t renades med fenol:kloroform extraktion. Efter att kvarbliven vätska torkat löstes pelleten upp i autoklaverat MQ vatten.
2. BlpI	
3. XbaI	
4. HindIII	
5. MluI	
6. NotI	I en IPCR (15 µl reaktionsvolym) amplifierades proverna med tre olika primerpar: FLO12_J, FLO12_A och FLO11_P (Tabell 1), enligt programmet i Tabell 3. Polymeraset som användes var Phusion polymerase (Thermo Scientific).
7. PstI	
8. Sall	
9. BstXI	
10. XhoI	

Tabell 3. Program för IPCR där primerparen FLO11_P, FLO12_A och FLO12_J hade annealing temperatur på 69, 70 respektive 72 °C.

STEG	TEMP	TID
Initial denaturering	98 °C	30 sekunder
40 Cykler		
Denaturering	98 °C	10 sekunder
Annealing	69-72 °C	30 sekunder
Elongering	72 °C	2 minuter
Slutgiltig elongering	72 °C	10 minuter

Proverna analyserades med gelelektrofores för att kontrollera att produkt erhållits. Gelen fotograferades under UV-ljus. De prover som gav band på gelen valdes för ytterligare en IPCR. Dessa prover amplifierades i en större reaktionsvolym (50 µl) och separerades på en ny gel. DNA från utskurna gelfragment renades med Illustra Gel Band Purification Kit. De framrenade proverna skickades för sekvensering (Eurofins MWG Operon, Eberberg, Tyskland).

Ytterligare IPCR utfördes med andra bakåt (RV) primers (FLO12_RV_J_2 och FLO12_RV_A_2) men med samma framåt (FW) primers. Dessa nya RV primers förlängde längre in från genen, vilket underlättar identifiering av vilken gen som

amplifierats. Kontroll av *FLO1*:s närvaro i jäststammen CCUG 53310 utfördes med PCR enligt

Tabell 4 med primers *FLO1_FW* och *FLO1_RV*. Produkten förväntades bli 247 bp och verifierades med gelelektrofores.

Tabell 4. PCR-program med *FLO1*-primers.

STEG	TEMP	TID
Initial denaturering	98 °C	30 sekunder
40 cykler		
Denaturering	98 °C	10 sekunder
Annealing	62 °C	30 sekunder
Elongering	72 °C	30 sekunder
Slutgiltig förlängning	72 °C	10 minuter

Den negativa kontrollen utfördes på jäststammen S288C med primers för *FLO12hyp* och de restriktionsenzymerna som gav resultat efter IPCR på CCUG 53310.

Restriktionen, ligeringen, IPCR samt verifiering med hjälp av gelelektrofores utfördes på samma sätt som för CCUG 53310.

4.3 FENOTYPTEST

4.3.1 BIOINFORMATIK

Det mutagena primerparet designades på samma sätt som i kapitel 4.2.1. Mutation skapades med en mismatch i en KAN_{MX} -*TDH3p* kassetten innehållandes en promotor och selektionsmarkör. Kassetten var dessutom flankerad av ändrar homologa till *HO*-lokuset. Mutationen skapades genom en serie av PCR:er. Mismatchen sitter i mitten av primerparet, då det är viktigast att primerns ändrar är komplementära till och binder in till DNA-fragmentet. Samtliga primers visas i Tabell 5. *HO_A_FW*, *MUT_B_RV*, *MUT_C_FW*, *HO_D_RV*, *HO_E_FW* och *HO_F_RV* motsvarar primer a-f i Figur 3. *FLO12ATG_FW* binder till *FLO12hyp* och används vid colony-PCR.

Tabell 5. PCR primers använda för att utföra Fenotypstest. Rödmarkering anger mismatch till *FLO12hyp*.

Primer	Nukleotidsekvens (5'-3')
<i>HO_A_FW</i>	CAGAAAGGGTTCGCAAGTC
<i>MUT_B_RV</i>	GGGACTTCCATTCCATTGC
<i>MUT_C_FW</i>	CAATGGAATGGAAGTCCCC
<i>HO_D_RV</i>	CAAATCAGTGCCGGTAACG
<i>HO_E_FW</i>	TACTTTGAATTGTACTACCGCTGGGC
<i>HO_F_RV</i>	TTAGCAGATGCGCGCACCTGCGTTG
<i>FLO12ATG_FW</i>	ATGACAATGCCTCATCGCTATATGTTTTTGGC

4.3.2 LABORATIV DEL

4.3.2.1 Mutagen-PCR

Genomiskt DNA från jäststammen CEN.PK 131-7D (innehållandes KAN_{MX}-TDH3p med *FLO12hyp*) fungerade som templat i två PCR:er. Den ena med HO_A_FW samt MUT_B_RV och den andra reaktionen med MUT_C_FW samt HO_D_RV. PCR-programmet utfördes enligt

Tabell 6.

Tabell 6. Program för mutagen-PCR.

STEG	TEMP	TID
Initial denaturering	98 °C	30 sekunder
35 Cykler		
Denaturering	98 °C	10 sekunder
Annealing	67 °C	20 sekunder
Elongering	72 °C	90s + 2s/cykel
Slutlig elongering	72 °C	5 minuter

De två PCR-produkterna separerades med gelelektrofores och fotograferades under UV-ljus. Två band av korrekt storlek skars ut för att sedan renas fram med hjälp av Illustra Gel Band Purification Kit.

4.3.2.2 Fusion-PCR

De två erhållna fragmenten genomgick sedan en fusion-PCR:er där de sattes ihop med primer HO_E_FW och HO_F_RV. Dessutom prövades en fusion-PCR med HO_A_FW och HO_D_RV. PCR-programmet utfördes enligt Tabell 7.

Tabell 7. Program för fusion-PCR med en annealingtemperatur på 67 °C för HO_A_FW och HO_D_RV samt 72 °C för HO_E_FW och HO_F_RV. De första 10 cyklerna kördes utan primers.

STEG	TEMP	TID
Initial denaturering	98 °C	30 sekunder
10 Cykler		
Denaturering	98 °C	10 sekunder
Annealing	61 °C	30 sekunder
Elongering	72 °C	90s + 2s/cykel
Primeraddition		
Denaturering	98 °C	20 sekunder
35 Cykler		
Denaturering	98 °C	10 sekunder
Annealing	67-72 °C	20 sekunder
Elongering	72 °C	135s + 2s/cykel

PCR-produkterna separerades i en gelelektrofores och fotograferades under UV-ljus, se Figur 13. Dess PCR-produkt renades med hjälp av Illustra kit och skickades på sekvensering för att verifiera att mutationen satt på rätt plats.

En koloni från jäststammen CEN-PK 113.7D (som saknade KAN_{MX} - $TDH3p$ med $FLO12hyp$) inokulerades i YPD-medium över natten innan mätning av OD_{600} och utspädning till en OD_{600} på 0,08.

4.3.2.3 Transformation

OD_{600} uppmättes efter 7 timmar till 0,96, vilket indikerar att cellerna är i logfasen. Cellsuspensionen centrifugerades i ett eppendorfrör. Den resulterande pelleten med jästceller blandades försiktigt ut med MQ-vatten följt av centrifugering. Pelleten blandades sedan ut med 0,1 M LiAc innan röret centrifugerades och pelleten löstes upp med 0,1 M LiAc, följt av vortex och överföring till två nya eppendorfrör. De centrifugerades för att sedan pipettera bort supernatanten. I den negativa kontrollen tillsattes: 50 % w/v PEG, 1 M LiAc, 0,1 mg kokat enkelsträngat bärar-DNA och MQ-vatten. Till det andra eppendorfröret tillsattes även 1 μ g fusion-PCR produkt. De två rören vortexades innan de inkuberades i 30 °C. Efter inkuberingen placerades proverna i ett varmvattenbad (42 °C) innan de centrifugerades, följt av att supernatanten pipetterades bort. YPD-medium adderades och rören placerades i en skakinkubator (30 °C) över natten.

Proverna spreds ut på varsin agarplatta innehållandes geneticin som användes för selektering och inkuberades (30 °C) i ett några dagar tills 5 kolonier hade växt fram.

4.3.2.4 Colony-PCR

En liten del av varje transformerad koloni löstes upp i MQ-vatten tillsammans med glaskulor innan provet sattes i en Thermomixer i 5 min och 95 °C. Provet centrifugerades i en bordscentrifug och supernatanten användes som templat i en 15 μ l colony-PCR-reaktion. PCR-programmet utfördes enligt Tabell 8.

Tabell 8. Program för colony-PCR med primers FLO1ATG_FW och HO_D_RV.

STEG	TEMP	TID
Initial denaturering	98 °C	30 sekunder
35 Cykler		
Denaturering	98 °C	10 sekunder
Annealing	67 °C	30 sekunder
Elongering	72 °C	135s + 2s/cykel
Slutlig elongering	72 °C	10 minuter

PCR-produkterna separerades i en gelelektrofores för verifiering av erhållen produkt, och fotograferades under UV-ljus, se Figur 14. Två kolonier gav upphov till band av rätt storlek, där den ena valdes ut att genomgå samma colony-PCR som ovan, fast en 50 μ l

reaktion för att amplifiera DNA. PCR-produkten separerades i en gelelektrofores, och gelen fotograferades under UV-ljus. Då produkten verifierats, renades PCR-produkten fram med Illustra kit för att sedan skickas iväg på sekvensering.

En liten del av varje koloni inokulerades i YPD-medium och inkuberades i 30 °C i 24 timmar innan flockuleringen kontrollerades. Kolonin som inorporerat kassetten på rätt position i genomet späddes ut med glycerol (20 % av slutvolymen) och frystes sedan in i -80 °C.

4.3.2.5 Flockuleringstest

YPD-medium tillreddes samtidigt som 0,5 M EDTA och fem olika 2,5 M sockerlösningar tillverkades (galaktos, glukos, maltos, mannos och sukros). Samtliga lösningar autoklaverades för att bli sterila.

De två jäststammarna CEN.PK 113-7D.FLO12 samt CEN.PK 113-7D.FLO12mut.E200G inokulerades i 100 ml YPD-medium och placerades på ett skakbord i 44 timmar för att jästen skulle kunna växa till sig.

Varje jäststam hälldes över till ett 50 ml eppendorfrör och centrifugerades. Supernatanten hälldes av och pelleten löstes upp med 250 mM EDTA. De två rören placerades i ett varmvattenbad (60 °C) för att döda jästcellerna och bibehålla konstant cellkoncentration (cellerna flockulerar trots att de inte är viabla). Rören centrifugerades återigen och supernatant hälldes bort. Cellerna tvättades sedan i tre omgångar: först med 30 mM EDTA och sedan två gånger i MQ-vatten. Rören centrifugerades och supernatant hälldes bort. En 9 mg/ml NaCl lösning adderades till rören och därefter togs ett 100 µl prov från varje stam och späddes ut innan cellerna räknades med hjälp av Neubauer räknekammare under mikroskop.

Cellerna späddes ut till koncentrationen 1×10^8 celler/ml i varje provrör med citratbuffert (50 mM, pH 4,5), CaCl_2 (4 mM) och varierad sockerartskoncentration så att totalvolymen blev 2 ml. Samtliga rör vortexades rejält innan de inkuberades i 25 °C på ett skakbord i 150 rpm i 17 timmar och 30 graders lutning.

Efter inkuberingen plockades provrör ut slumpmässigt och fick stå i 30 sekunder innan ett 200 µl pipetterades precis under menisken (då endast fria celler var önskade) ner i en kyvett med 100 mM EDTA. Celltätheten bestämdes med OD_{600} .

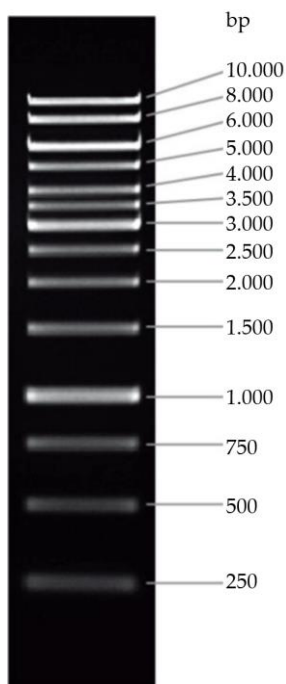
5 RESULTAT

5.1 UNDERSÖKNING AV FLANKERANDE SEKVENSER TILL *FLO12HYP*

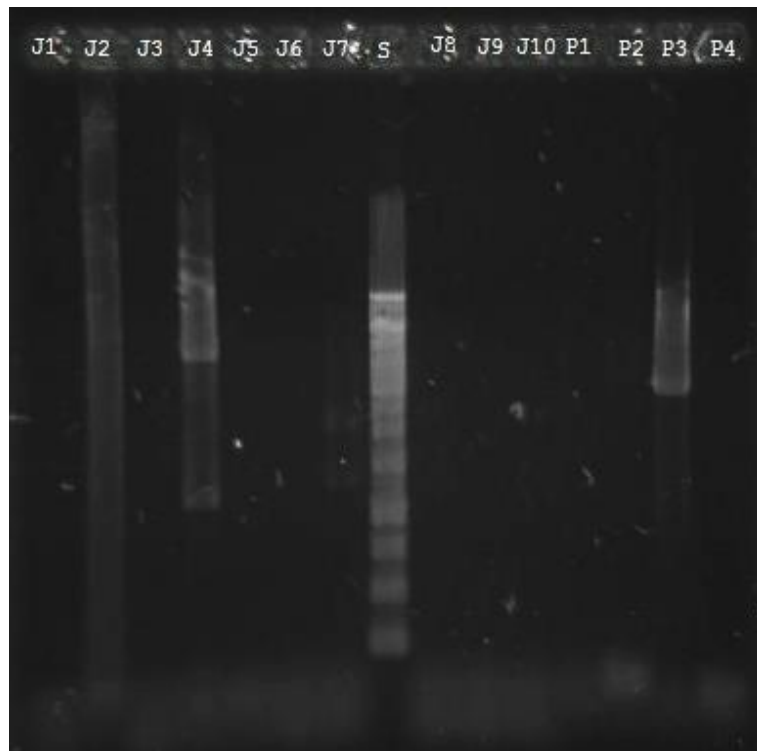
5.1.1 GELRESULTAT 1

Resultatet av IPCR för verifieringen av alla 10 restriktionsenzymers syns i Figur 5-Figur 6. Proverna märks enligt primerpar: P (FLO11_P), J (FLO12_J) och A (FLO12_A), samt enzym enligt nummer från Tabell 2. P3, P8, J4, J7, A4, A7 och A9 ansågs ge bra band och amplifierades i en 50 µl IPCR. Resultatet från den större IPCR:en, för rening från gel, syns i Figur 7.

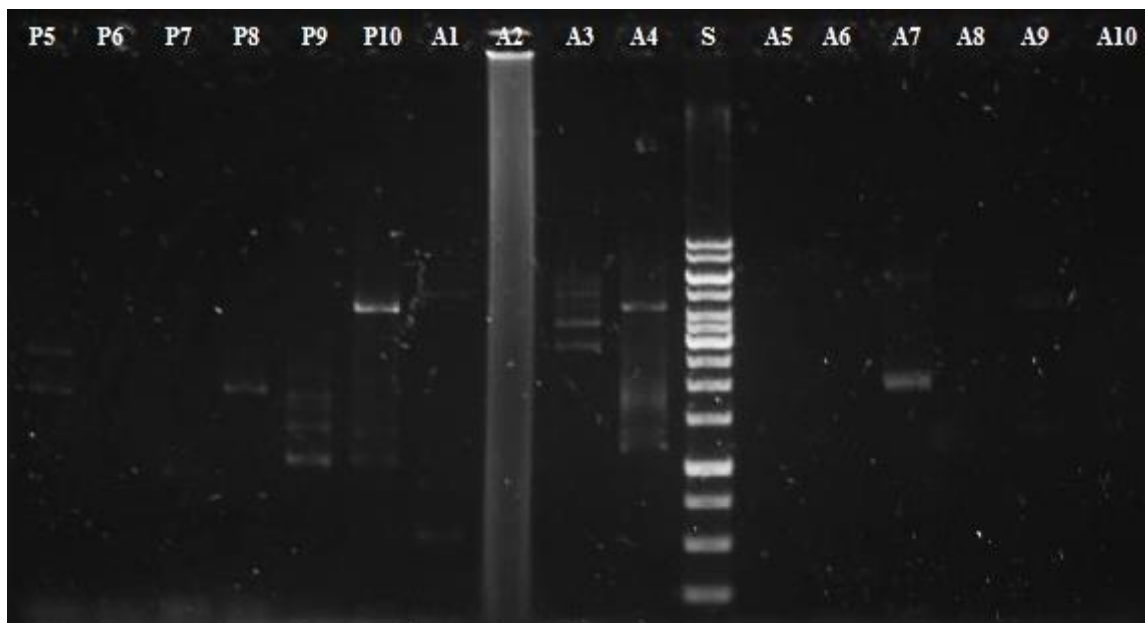
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder



Figur 4. DNA-stege som använts under laborationerna.

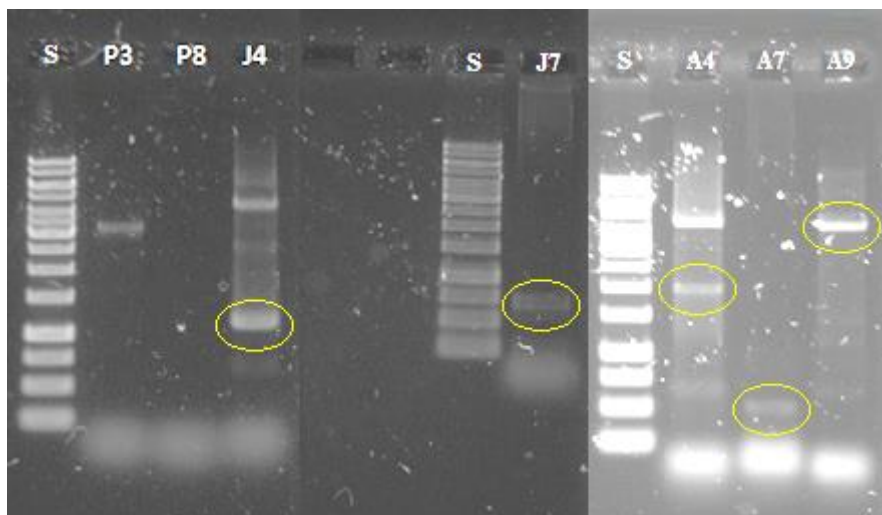


Figur 5. Band från 15 µl IPCR med primerparen FLO12_J (J1-J10) och FLO11_P (P1-P4). S: stege enligt Figur 4.



Figur 6. Band från 15 µl IPCR med primerparen FLO11_P (P5-P10) och FLO12_A (A1-A10). S: stege enligt Figur 4.

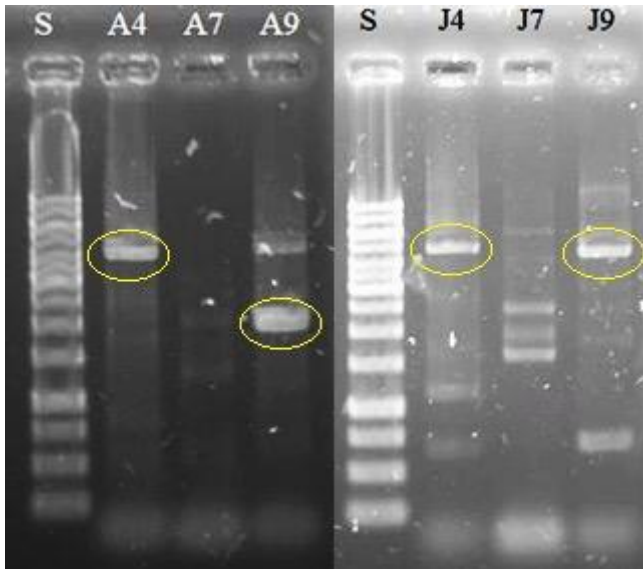
De inringade banden i Figur 7 renades fram från gelen och skickades in på sekvensering, se Bilaga 1. Då det fanns flera tydliga band valdes det kortare fragmentet. Det längre bandet består möjligtvis av flera restriktionsfragment som ligerades ihop innan de självcirkulerades. P3 kunde inte skickas in på sekvensering på grund av för låg DNA koncentration efter gelreningen, även om ett tydligt band syntes. Bandet från P8 i Figur 6 lyckades inte erhållas igen trots flera försök.



Figur 7. Band från 50 µl IPCR. Markerat band renades från gelen och skickades på sekvensering. S: stege enligt Figur 4.

5.1.2 GELRESULTAT 2

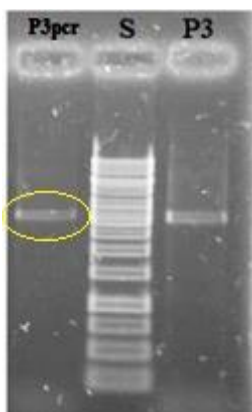
En andra IPCR genomfördes med två nya RV primers FLO12_RV_A_2 och FLO12_RV_J_2 (samma FW primers som tidigare reaktion) för att lättare kunna skilja på *FLO12hyp* och övriga *FLO*-gener. Resultatet av elektroforesen visas i Figur 8. Produkterna består av en större del av genen jämfört med tidigare IPCR produkter. De inringade banden renades fram från gelen och skickades in på sekvensering, se Bilaga 1. Banden hos A7 och J7 hade för låg koncentration för att kunna skickas in.



Figur 8. Band från 50 μ l IPCR produkt. Markerat band renades från gel och skickades på sekvensering. S: stege enligt Figur 4.

5.1.3 POSITIV KONTROLL

Resultatet av den positiva kontrollen för IPCR metoden, med primers specifika mot *FLO11*, syns i Figur 9. Det band som efter rening från gel gav tillräckligt hög koncentration DNA är inringat och skickades in på sekvensering, se Bilaga 1.



Figur 9. Band från 50 μ l IPCR produkt. Markerat band renades från gelen och skickades på sekvensering. För P3pcr användes tidigare IPCR produkt som templat. S: stege enligt Figur 4.

5.1.4 SEKVENSERINGSRESULTAT

Resultatet av sekvenseringen finns i Bilaga 1. Sekvenseringsresultaten jämfördes med kända flankerande sekvenser till övriga *FLO*-gener med EMBOSS Needle, se Tabell 9.

När den flankerande sekvensen uppströms om *FLO1* jämförs med motsvarande sekvenser hos de övriga *FLO*-generna, matchar de till 40-50 %. Detta används som referens för att undersöka om sekvenseringsresultatet kommer ifrån en ny gen eller inte. Sekvensen nedströms om *FLO1* matchar till 92-96 % med motsvarande sekvenser hos övriga kända *FLO*-gener.

Tabell 9. Likheten mellan flankerande sekvenser från sekvenseringsresultatet och motsvarande hos flockuleringsgenerna. RV primer ger sekvens uppströms och FW primer nedströms.

Sekvenseringsresultat	Längd (bp)	<i>FLO1</i> (%)	<i>FLO5</i> (%)	<i>FLO9</i> (%)	<i>FLO10</i> (%)	<i>FLO11</i> (%)
A4 + FLO12_RV_A	496	98,2	43,4	42,5	47,4	43,3
A9 + FLO12_RV_A	729	99,5	45,3	43,3	49,7	41,5
A9 + FLO12_RV_A_2	729	99,5	45,3	43,3	49,7	41,5
J4 + FLO12_RV_J_2	428	99,5	48,0	40,1	45,3	42,7
J9 + FLO12_RV_J_2	40	100	46,0	35,7	51,1	29,8
P3 + FLO11_P_RV	505	40,9	40,7	43,6	46,3	92,8
A9 + FLO12_FW_A	725	95,4	99,6	91,4	43,4	42,4

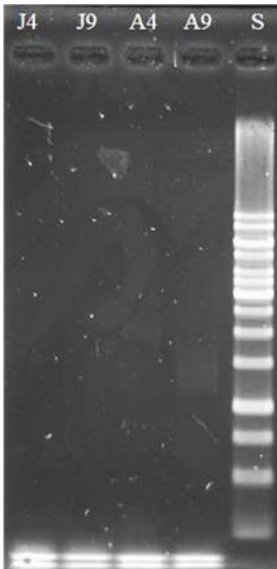
Proteinkodande gensekvensen i sekvenseringsresultatet jämfördes med övriga *FLO*-gener med hjälp av EMBOSS Needle. Likheten visas Tabell 10.

Tabell 10. Likheten mellan erhållen gensekvens och motsvarande del av övriga kända gener.

Sekvenseringsresultat	Längd (bp)	<i>FLO1</i> (%)	<i>FLO5</i> (%)	<i>FLO9</i> (%)	<i>FLO10</i> (%)	<i>FLO11</i> (%)	<i>FLO12hyp</i> (%)
A4 + FLO12_RV_A	183	100	91,3	76,8	72,3	39,7	100
A9 + FLO12_RV_A	182	98,9	90,2	75,8	71,8	41,8	98,9
A9 + FLO12_RV_A_2	241	91,7	85,1	74,7	71,0	44,8	99,6
J4 + FLO12_RV_J_2	556	87,9	85,1	84,0	55,2	42,9	99,6
J9 + FLO12_RV_J_2	435	87,1	83,3	80,2	52,0	41,8	99,3
P3 + FLO11_P_RV	94	34,9	42,4	41,1	45,8	95,8	34,9
A9 + FLO12_FW_A	114	99,1	100	100	74,2	32,5	100

5.1.5 NEGATIV KONTROLL AV IPCR

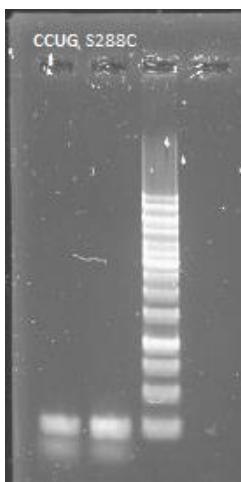
Resultatet av den negativa kontrollen på S288C med *FLO12hyp* primers syns i Figur 10. Som förväntat erhöles inga band då *FLO12hyp* inte finns i S288C.



Figur 10. Gel från den negativa kontrollen av *FLO12hyp* i S288C. S: stege enligt Figur 4.

5.1.6 *FLO1* KONTROLL I CCUG 53310

En PCR med primers specifika mot *FLO1* genomfördes på CCUG 53310 för att undersöka om *FLO1* (med sekvens från S288C) fanns i genomet, med S288C som positiv kontroll. Resultatet av elektroforesen syns i Figur 11. Från båda stammarna erhöles en PCR produkt på ca 250 bp, vilken är den förväntade längden av produkten om *FLO1* är närvarande. Sekvensering av PCR produkten visade att samma produkt erhöles från CCUG 53310 och S288C, vilket indikerar att *FLO1* finns i båda stammarna.



Figur 11. Gelresultat från PCR med *FLO1* primers. S: stege.

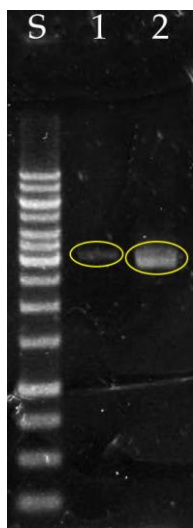
5.2 FENOTYPTEST

5.2.1 GELRESULTAT

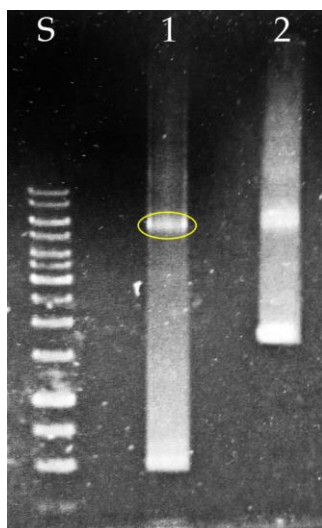
Resultatet av mutagen-PCR, som gjordes för att introducera mutationen i *FLO12hyp*, visas i Figur 12. Brunn 1 innehöll DNA-fragmentet som framställts med primers HO_A_FW och MUT_B_RV. Brunn 2 innehöll DNA-fragmentet som framställts med primers MUT_C_FW och HO_D_RV. De två inringade banden skars ut under UV-ljus och renades med illustra-kit.

I fusion-PCR sattes båda PCR fragmenten ihop och resultatet visas i Figur 13. Brunn 1 innehöll DNA-fragmentet som framställts med primer HO_E_FW och HO_F_RV. Brunn 2 innehöll DNA-fragment som framställts med primers HO_A_FW och HO_D_RV. Det inringade bandet valdes ut då det hade högre koncentration än det andra och dess PCR-produkt renades från gelen. Fragmentet skickades på sekvensering, se kapitel 5.2.2.

Colony-PCR gjordes för att verifiera att den muterade kassetten var infogad på rätt ställe och resultatet visas i Figur 14. Alla brunnar innehåller DNA-fragment från de kolonier som uppstått på agarplattorna innehållandes geneticin. Brunn 1-8 innehöll DNA-fragment som framställts med primers FLO12ATG_FW och HO_D_RV. Brunn 6-8 kom från negativa kontrollkolonier. Brunn 3 och 4 gav båda en produkt som var ca 3000 bp långt. Kolonin som gav upphov till det inringade bandet genomgick en andra colony-PCR med större reaktionsvolym (50 µl). PCR-produkten verifierades i en gelelektrofores, se Figur 15, innan den skickades på sekvensering, se kapitel 5.2.3.



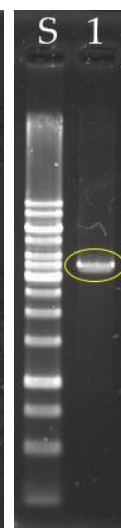
Figur 12. Gelresultat från mutagen-PCR. S: stege enligt Figur 4.



Figur 13. Gelresultat från fusion-PCR. S: stege enligt Figur 4.



Figur 14. Gelresultat från colony-PCR. S: stege enligt Figur 4.



Figur 15. Gelresultat från andra colony-PCR. S: stege enligt Figur 4.

5.2.2 SEKVENSERINGSRESULTAT 1

Resultat från fusion-PCR. Det gav matchning på 1020/1021 bp gentemot *FLO12hyp*, vilket var önskvärt (gensekvens i svart, mutation i rött).

```
CTAACTAGTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTACCAGCAGGCCAGAGGAAAAGTGGGATG
AATATAAAATTTTACCAGTATTCATTGAAAGATTCTCCACATATTCGAATGCAGCATATATGGCTTA
CCAATATGCAGACAAAGTCAAATTTGGGCTCTGTTAGTGGGCAAACGGATATATCTATCAACTATAAT
GTTCCCTTGTGTTACAACCTCAGGGACATATCAGTGCCCTCAAGAAGATTTATATGGTAATGGTAATTG
GGGATGCAAAGGAATTGGTGCTTGTCTAATAATCCAATAATTGCATACTGGAGTACTGATTTATTTG
GTTTCTATACTACCCCAACAAACGTAACCCTAGAAATGACAGGTTATTTTTTACCACCACAGACGGG
TTCTTACACATTCAAGTTTGTACAGTTGACGACTCTGCAATTCTATCAGTCGGTGGTAACGTTGCGT
TCGAATGTTGTGCACAAGAACAACCTCCAATTACATCGACAGATTTTACAATCAGTGGTATTAAGCA
ATGGAATGGAAGTCCCTGATAATATCACAGGGACTGTCTACATGTATGCTGGTTTCTATTATCCA
ATGAAGATTGTTTACTCAAATGCCGTTGCCTGGGGTACACTTCCAATTAGTGTGACACTACCAGATG
GCACTACCGTTAGTGATGACTTTGAAGGGTACGTATATACCTTTGACAACAATCTCAGCCAGTCGAA
TTGTACCATTCCAGACCCTTCAAATTATACTGCCAGTACTACAATAACTACAACCTGAGCCATGGACC
GGTACTTCCACTTCTACTTCTACCGAATTGACCACAGTCACCGGTACCAATGGCTTGCCAACCTGACGA
AACCATCATTGTTGTCAGAACACCAACAACCTGCTAGCACCATCATAACTACAACCTGAGCCATGGACT
GGCACTTCCACTTCTACTTCTACCGAATTGACCACAGTCACCGGTACCAATGGCTTGCCAACCTGATGA
AACCATCATTG
```

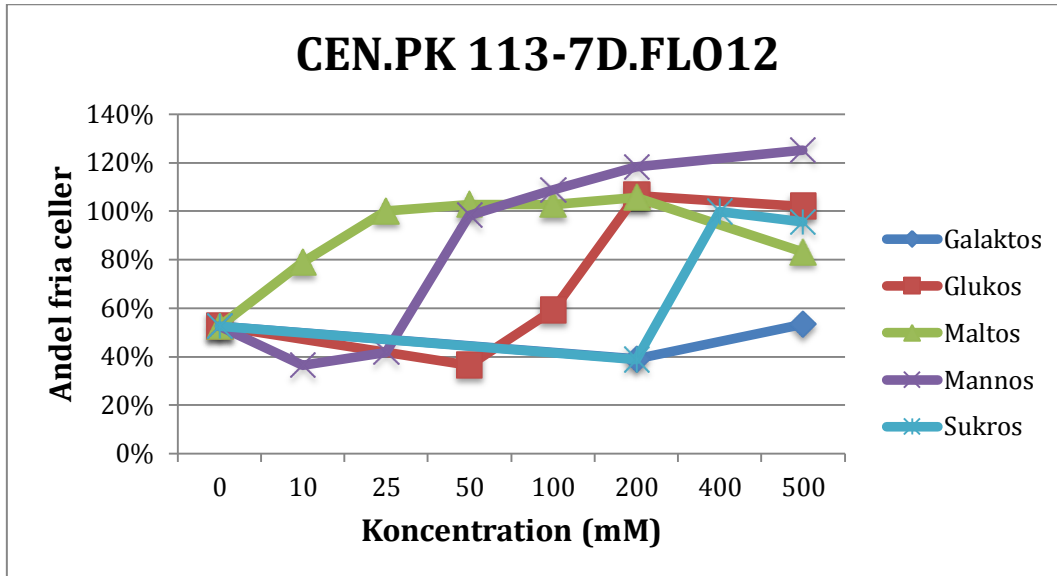
5.2.3 SEKVENSERINGSRESULTAT 2

Resultat från colony-PCR. Det gav matchning på 1000/1000 bp gentemot den tidigare sekvenseringen (gensekvens i svart, mutation i rött).

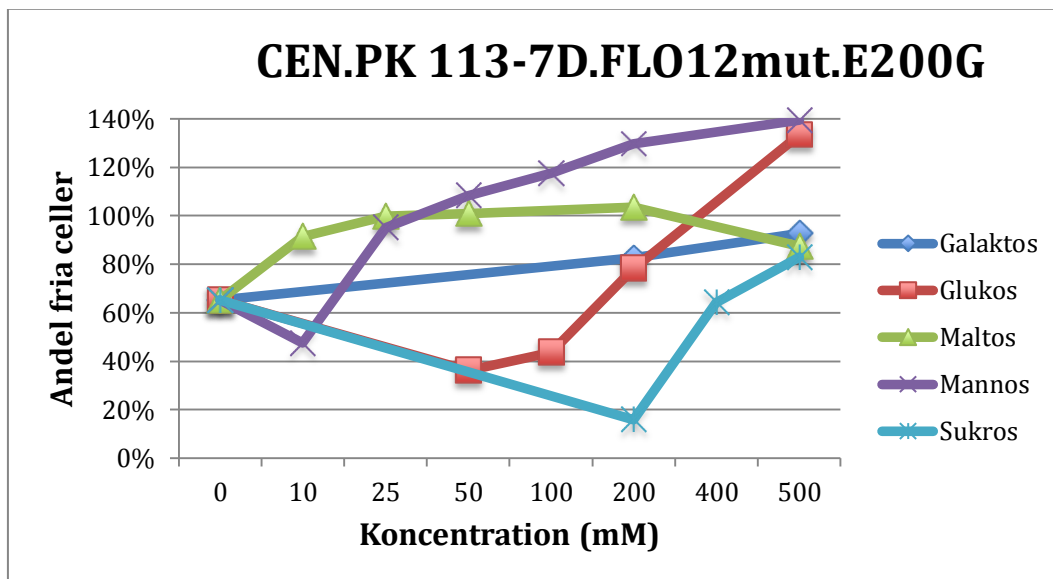
```
CTAACTAGTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTACCAGCAGGCCAGAGGAAAAGTGGGATG
AATATAAAATTTTACCAGTATTCATTGAAAGATTCTCCACATATTCGAATGCAGCATATATGGCTTA
CCAATATGCAGACAAAGTCAAATTTGGGCTCTGTTAGTGGGCAAACGGATATATCTATCAACTATAAT
GTTCCCTTGTGTTACAACCTCAGGGACATATCAGTGCCCTCAAGAAGATTTATATGGTAATGGTAATTG
GGGATGCAAAGGAATTGGTGCTTGTCTAATAATCCAATAATTGCATACTGGAGTACTGATTTATTTG
GTTTCTATACTACCCCAACAAACGTAACCCTAGAAATGACAGGTTATTTTTTACCACCACAGACGGG
TTCTTACACATTCAAGTTTGTACAGTTGACGACTCTGCAATTCTATCAGTCGGTGGTAACGTTGCGT
TCGAATGTTGTGCACAAGAACAACCTCCAATTACATCGACAGATTTTACAATCAGTGGTATTAAGCA
ATGGAATGGAAGTCCCTGATAATATCACAGGGACTGTCTACATGTATGCTGGTTTCTATTATCCA
ATGAAGATTGTTTACTCAAATGCCGTTGCCTGGGGTACACTTCCAATTAGTGTGACACTACCAGATG
GCACTACCGTTAGTGATGACTTTGAAGGGTACGTATATACCTTTGACAACAATCTCAGCCAGTCGAA
TTGTACCATTCCAGACCCTTCAAATTATACTGCCAGTACTACAATAACTACAACCTGAGCCATGGACC
GGTACTTCCACTTCTACTTCTACCGAATTGACCACAGTCACCGGTACCAATGGCTTGCCAACCTGACGA
AACCATCATTGTTGTCAGAACACCAACAACCTGCTAGCACCATCATAACTACAACCTGAGCCATGGACT
GGCACTTCCACTTCTACTTCTACCGAATTGACCACAGTCACCGGTACCAATGGCTTG
```

5.2.4 FLOCKULERINGSTEST

Mätdata med andelen fria celler vid olika sockerkoncentrationer från flockuleringstestet har sammanställts till två grafer för de olika stammarna, se Figur 16-Figur 17.



Figur 16. Resultat från flockuleringstest för CEN.PK 113-7D *FLO12hyp*.



Figur 17. Resultat från flockuleringstest för CEN.PK 113-7D *FLO12hyp* E200G.

6 DISKUSSION

För att avgöra om *FLO12hyp* är en ny gen eller inte, amplifierades de flankerande regionerna runt genen med IPCR. De erhållna PCR produkterna sekvenserades och jämfördes med motsvarande regioner hos övriga kända *FLO*-gener.

Positiv kontroll utfördes med IPCR på *FLO11* som har kända flankerande sekvenser. I Tabell 9 jämfördes de flankerande regionerna från sekvenseringen av den positiva kontrollen (P3) med sekvenserna för de andra flockuleringsgenerna. Dessa visar sig ha låg likhet, ungefär 40 %, med *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* och *FLO10*. Likheten med *FLO11* är dock hög: 95,8 % med avseende på genen och 92,8 % om de flankerande sekvenserna inkluderas. Detta tyder på att det är just *FLO11* som sekvenserats och att metoden IPCR fungerar. Sekvensen för *FLO11*, som resultatet har jämförts med, är från S288C eftersom den stammen är sekvenserad. Orsaken till att resultatet blev 92,8 % och inte 100 % kan bero på att olika stammar kan ha skillnader i gensekvens. Då CCUG 53310 är osekvenserad användes sekvensen från S288C som referens.

Som visas i Tabell 9 är likheten mellan sekvenserna uppströms om *FLO12hyp*:s och uppströms om *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* och *FLO11* 50 % eller lägre. Däremot är likheten till sekvensen uppströms om *FLO1* nära 100 %. Nedströms är likheten mellan de olika flockuleringsgenerna 92-96 % vilket gör det svårt att särskilja nedströmssekvensen om *FLO12hyp*. Därför gjordes endast sekvensering av uppströmssekvensen.

Uppströmssekvensen indikerar att *FLO12hyp* är lokaliserad till *FLO1*:s position, då de kända flockuleringsgenerna har 40-50 % likhet uppströms. Detta skulle kunna tyda på att *FLO12hyp* är en allel till *FLO1*. Dock visar Figur 11 att *FLO1* fortfarande finns i CCUG 53310:s genom. Detta indikerar att det har skett en genduplikering där flankerande regioner följt med och *FLO12hyp* har skapats som en paralog till *FLO1*. Vidare visar det negativa testet med *FLO12hyp*-primers på stammen S288C (Figur 10) att *FLO12hyp* inte är närvarande i genomet hos denna stam. Detta tyder på att *FLO12hyp* är en ny flockuleringsgen i CCUG 53310 då dess sekvens inte passar någon tidigare känd flockuleringsgen.

Möjligheten att *FLO12hyp* kan vara en rekombination av *FLO1* styrks av att *S. cerevisiae* genomet innehåller bevarade repeterade sekvenser vilka främjar homolog rekombination. De flesta av dessa repeterade sekvenser finns i gener för cellväggsprotein. Homologin i dessa regioner bidrar därför till rekombinationer mellan dessa bevarade tandem-repeterade sekvenser och orsakar därför förändringar i sekvensen och därmed fenotypen. Dessutom är speciellt *FLO1* benägen till homolog rekombination på grund av en inre instabilitet hos de repeterade sekvenserna i denna gen (Verstrepen et al., 2005).

En stor skillnad mellan Flo12p och Flo1p är att de har olika fenotyper. Det har dock visat sig att deletioner av repeterade sekvenser i *FLO1* kan åstadkomma en konvertering av fenotyp från Flo1 till NewFlo (**Liu et al., 1996**). En av de stora skillnaderna mellan *FLO1* och *FLO12hyp* är längden och antalet repeterade sekvenser. Konverteringen av fenotyp syns även tydligt när trunkerade varianter av *FLO1*, med olika antal repeterade sekvenser, undersöks för flockuleringsfenotyp (**Westman et al., 2014**). Men skillnad i längd är dock inte den enda skillnaden mellan *FLO1* och *FLO12hyp*. Det finns även skillnader i den aktiva delen av *FLO12hyp*, som binder till sockerarterna, vilket kan vara en annan orsak till de olika fenotyperna (**Westman et al., 2015**).

Oavsett om *FLO12hyp* uttrycks i CCUG 53310 eller inte är det troligt att andra *FLO*-gener uttrycks samtidigt. Detta stöds av att fenotypen för denna stam (Flo1) skiljer sig från fenotypen för en naturligt ickeflockulerande stam som har transformerats med *FLO12hyp* (NewFlo) (**Westman et al., 2015**). Fenotypskillnaden kan också bero på att en modifikation skett specifikt för CCUG 53310. Det kan vara intressant med fortsatta studier av flockulerande stammars uttryck av *FLO*-gener och deras samverkan. Exempelvis kan ytterligare PCR:er genomföras för att undersöka närvaro av övriga *FLO*-gener i CCUG 53310.

Punktmutationen E200G, där ett baspar på plats 599 muterades från adenin till guanin, infördes i *FLO12hyp* för att avgöra hur den påverkade flockuleringsfenotypen. Den första sekvenseringen som gjordes från den fusionerade kassetten visade 1020/1021 bp överensstämmelse med *FLO12hyp*. Analys av sekvenseringen visade att rätt mutation introducerats. Efter att transformationen genomförts och cellerna växt på ett selektivt medium (geneticin-agarplattor), kunde fem kolonier urskiljas. För att verifiera att de tagit upp kassetten på rätt ställe, renades dess genomiska DNA fram och amplifierades i en PCR med en primer komplementär innanför och en utanför kassetten. En produkt från denna PCR indikerar att transformationen introducerats i *HO*-lokuset. Genom en gelelektrofores från colony-PCR, som syns i Figur 14, verifierades det att kassetten tagits upp på rätt ställe i genomet i koloni 3 och 4. Den andra sekvenseringen gjordes för att säkerställa att denna kassetten fortfarande innehöll mutationen E200G. Resultatet visade 100 % likhet med föregående sekvensering. Därmed säkerställdes att vår jäststam bar på rätt mutation.

Den negativa kontroll som genomfördes under transformationen genomgick samma steg som mutanten, med undantag att ingen ny kassetten tillfördes. Denna gav upphov till tre olika kolonier på det selektiva mediet. Det skulle kunna innebära att den negativa testet kontaminerats under laborationens gång med jästceller som innehöll kassetten eftersom cellerna inte kan växa på geneticin-agarplattan utan kassetten. För att säkerställa att detta verkligen är orsaken krävs det att en colony-PCR med nya primers utförs för att se om kassetten inkorporerats i genomet.

Flockuleringstestet kan inte anses statistiskt säkerställt då endast ett test hann utföras. Som synes i Figur 16 och Figur 17 är andelen fria celler i vissa fall uppskattade till över 100 % vilket inte är rimligt. En möjlig förklaring kan vara att pipetteringen skedde för långt under menisken bland flockarna som då påverkade de uppmätta OD₆₀₀ värdena. En annan möjlighet skulle kunna vara att cellerna exploderade av osmotiskt tryck i steget då alla prover förberedes och cellerna låg i vatten. På grund av laborativ ovana (gällande flockuleringstest) utsattes cellerna för vatten i 17 timmar istället för 4 timmar, vilket först var tanken. Detta är inte optimalt då det inte är säkert att samtliga celler dör efter 5 minuter i 60 °C vattenbad. Risken finns då att cellerna förbrukar sockret i proverna så att sockerkoncentrationen inte stämmer när OD₆₀₀ mäts. Förbrukar cellerna sockret bildas det CO₂ i provröret och det bildas ett övertryck i röret, dock observerades inget övertryck när provrören öppnades. Om cellerna fortfarande lever finns det också en möjlighet att celltillväxt orsakat värden på över 100 % fria celler.

Trots att endast ett test utfördes och inga direkta slutsatser kan dras kan det vara intressant att jämföra vårt erhållna resultat med resultatet från Westman (2015). Genom att jämföra graferna från Westman (2015) med Figur 16 och 17 ser man att mannos och maltos snabbt inhiberar flockuleringen, redan vid 40 mM, vilket tyvärr skulle säga emot teorin att punktmutationen gör att jästcellerna inhiberas vid en högre sockerkoncentration. Likheter i inhiberingsbeteende kan även ses bland glukos och sukros, men fler tester hade behövt göras för att statistiskt fastställa detta.

7 SLUTSATS

FLO12hyp är en paralog till *FLO1*, vilket innebär att en genduplikering skett som sedan gett upphov till två olika flockuleringsgener. *FLO12hyp* är således en ny gen i CCUG 53310.

Från flockuleringstesterna går det inte att urskilja en fenotypskillnad efter att punktmutationen E200G introducerats. Vidare försök skulle därför behövas för att säkerställa effekten av punktmutationen.

8 KÄLLOR

- ALBERTS, B. 2008. *Molecular biology of the cell*, s.20. New York, Taylor & Francis.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M. & NEGRO, M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol*, 101, 4851-61.
- CHIN, C. S., CHUANG, J. H. & LI, H. 2005. Genome-wide regulatory complexity in yeast promoters: separation of functionally conserved and neutral sequence. *Genome Res*, 15, 205-13.
- GOOSSENS, K. & WILLAERT, R. 2010. Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 32, 1571-85.
- HO, S. N., HUNT, H. D., HORTON, R. M., PULLEN, J. K. & PEASE, L. R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77, 51-9.
- KATJU, V., FARNSLOW, J. C. & BERGTHORSSON, U. 2009. Variation in gene duplicates with low synonymous divergence in *Saccharomyces cerevisiae* relative to *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 10, R75.
- KAWAI, S., HASHIMOTO, W. & MURATA, K. 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs*, 1, 395-403.
- KITADA, T. 2011. The role of histone modifications in telomere elongation and epigenetic gene switching at subtelomeric heterochromatin in *Saccharomyces cerevisiae*.
- LIU, H., STYLES, C. A. & FINK, G. R. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 144, 967-78.
- NIJKAMP, J. F., VAN DEN BROEK, M., DATEMA, E., DE KOK, S., BOSMAN, L., LUTTIK, M. A., DARAN-LAPUJADE, P., VONGSANGNAK, W., NIELSEN, J., HEIJNE, W. H., KLAASSEN, P., PADDON, C. J., PLATT, D., KÖTTER, P., VAN HAM, R. C., REINDERS, M. J., PRONK, J. T., DE RIDDER, D. & DARAN, J. M. 2012. De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. *Microb Cell Fact*, 11, 36.
- OCHMAN, H., GERBER, A. S. & HARTL, D. L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120, 621-3.
- SILVER, J. & KEERIKATTE, V. 1989. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J Virol*, 63, 1924-8.
- SOARES, E. V. & MOTA, M. 1997. Quantification Of Yeast Flocculation. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 93-98.
- TRIGLIA, T., PETERSON, M. G. & KEMP, D. J. 1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, 16, 8186.
- VERSTREPEN, K. J., JANSEN, A., LEWITTER, F. & FINK, G. R. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet*, 37, 986-90.
- VERSTREPEN, K. J. & KLIS, F. M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*, 60, 5-15.
- WESTMAN, J. O., MAPELLI, V., TAHERZADEH, M. J. & FRANZÉN, C. J. 2014. Flocculation causes inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* for second-generation bioethanol production. *Appl Environ Microbiol*, 80, 6908-18.
- WESTMAN, J. O., NYMAN, J., MANARA, R., FRANZÉN, C. J. & MAPELLI, V. 2015. Characterisation of Flo12p, a NewFlo phenotype flocculation protein in *Saccharomyces cerevisiae*. [opublicerat].
- WESTMAN, J. O., TAHERZADEH, M. J. & FRANZÉN, C. J. 2012. Inhibitor tolerance and flocculation of a yeast strain suitable for second generation bioethanol production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15.

BILAGA 1

Sekvenseringsresultat IPCR 1

A4 + FLO12_RV_LA (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
ATTGCCCTCACAAAGAAATTTGGGAAGTGCGTAGAACAGGTAAGGGTTGTTACTACAGAGGTATT
GTGGAAACCTTCTACAGTACTTCGGAATACACCTAAAAGGTTGTTGGATGCTAAATTTAGCAAAA
GTCCTTTTTAGTCACTATTAGGCTTGTAAAGTCTGAAATGTTGAAAAGGCACTCAAAAGATA
AATCAACAATCAGCATTAAACGGCACAGTTGAAAGAGTCAACCACTTGAAATTAGCTCGGTTATCA
AATATAATTATCTCTGGTAAAGAGCTCTGCAGCAGGGTTAATCTATTTCGCATACTTACGCTGTAG
GAACATTTTTATTATTAGGATCCGACTACTGCCTACATATTTATTTCGGAAGGCATGATGTCGAAA
TTTTTGACCTTATAAAAAGGAACATATTTCACTCTTGCTCGTTTGATGTAAGCTCTCTCCGGGTTT
TTATTTTTAATCTTGTACCAGTAAACAGAACATCCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTATATGT
TTTTGGCAGTCTTTACACTTCTGGCACTAACTAGTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTA
CCAGCAGGCCAGAGGAAAAGTGGGATGAATATAAATTTTTACCAGTATTCATTGAAAAGATTCCTC
CACATATTCGAATGCAGCATATATGGCT
```

A9 + FLO12_FW_LA (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
GGATCTAGTACAGCTTCTTTAGAAAATTTCAACGTATGCTGGCAGTGCCAACAGCTTACTGGCCGG
TAGTGGTTTAAAGTGTCTTCATTGCGTCTTATTGCTGGCAATTATTTAAATAAAATTCGCGTCTTTT
TACGTATCTGTGTATCTTTTCTTTGCTAAATATACGCTGGCATGAATTATTTTTAACTGTTTCTTC
TCCATACTTTCAAATATTCAAATTTGAACATAAATGATAATCTTGCCTTCTATTTTGAAAAAGTA
GATATGTGTATCATAAAGAAAACGTTACTATTATTGTCTTAGGCAACAAAAATCCATGAAAAAGAA
TTTTACCCTTATCGATACCATTTGATTTATTTTATTTATTTAATTTTTTTTTTTTTGGTTTAT
ATCCTGCAACAACACTTCGAATTCATTCGATATTTTATAAGTTACAACATAACACTTATAGAAA
CCGATGTATGAGTACTTATTATTAACGAGGAAAAATGGCCTATTTTGTTTAGCAATTAATGAACC
ATCGCAATTTTTGCTTTAAACAATTATTGCCATTTTCAGTAGTACTAACGTAAGATCTAGTGTGGT
TCGCTTAGGATGTTTTGAGTAGAAATCTGCTTACATGCCACACGCACTTGAACCTTGAAT
AATGGGGATAATTAGTTATTTAAAGTATGGGCTTGTCTTTTATATTTTGAATCTTTTGCAC
TAGTATTTAAAATATCAGCAGAGGCGTAAAAGTGCACCAAAATTTGTAACACTACTTGCCTTA
AAATTGATACTTCGTACTTGACATATTCAAAAGGGTCCAAGTATAGA
```

A9 + FLO12_RV_LA (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
CCTATTTACATTAAGTTGGAAAAATTTCCCTTTTTCCCTAATAAGGTGGAGCTTTTGGCTTCCA
GTATGCTTTCACGGAATTATTTCTCATGTACATTTAGCTCCATTTCCAGTGCCTCCGATAGGGAGG
CATCATGGTACTACCGTGACGGAGAATACGTAGGCTGACTTTTTCGTCAGTTTGTGTCCGTTTAC
AAAATTGGTGAATGAATTCTAGCCTCCTCTGCTCATTAAATGTCCTCACAAGAATTTGGAAGTGC
GTAGAACAGGTAAGGGTTGTTACTACAGAGGTAATGTTGGAACCTTCTACAGTACTTCGGAATACA
CCTAAAAGGTTGTTGGATGCTAAATTTAGCAAAAAGTCTTTTTAGCTCACTATTAGGCTTGTAAA
GTCTGAAATTTGTTGAAAGGCACTCAAAAGATAAATCAACAATCAGCATTAAACGGCACAGTTGAA
AGAGTCAACCACTTGAATTTAGCTCGGTTATCAAATATAATTATCTCTGGTAAAGAGCTCTGCAG
CAGGGTTAATCTATTCGCATACTTACGCTGTAGGAACATTTTATTATTAGGATCCGACTACTGCCT
ACATATTTATTCGGAAGGCATGATGTCGAAAAATTTTGGAGCTTATAAAAAGGAACATATTTCACTC
TTGCTCGTTTGATGTAAGCTCTTCCGGGTTCTTATTTTTAATCTTGTACCAGTAAACAGAAC
ATCCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTATATGTTTTTGGCAGTCTTTACACTTCTGGCACTAACTA
GTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTACCAGCAGGCCAGAGGAAAAGTGGGATGAATAT
AAATTTTTACCAGTATTCATTGAAAAGATTCCTCCACATATTCGAATGCAGCATATAGGCT
```


Sekvenseringsresultat IPCR 2

A9 + FLO12_RV_AL_2 (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
CCTATTTACATTAAAGTTGGAAAAATTCCTCTTTTTCTTAATAAGGTGGAGCTTTTGGCTTCCA
GTATGCTTTCACGGAATTATTCTCATGTACATTTAGCTCCATTTCCAGTGCCTCCGATAGGGAGG
CATCATGGTACTACCGTGACGGAGAATACGTAGGCTGACTTTTTCGTCAGTTTGTGTCCGTTTAC
AAAATTGGTGAATGAATTCTAGCCTTCTCTGCTCATTAAATTGCCTCACAAGAATTTGGAAGTGC
GTAGAACAGGTAAGGTTGTACTACAGAGGTATTGTGGAACCTTCTACAGTACTTCGGAATACA
CCTAAAAGGTTGTTGGATGCTAAATTTAGCAAAAAGTCTTTTTAGCTCACTATTAGGCTTGTTAAA
GTCTGAAATTGTTGAAAGGCACTCAAAAGATAAAATCAACAATCAGCATTAAACGGCACAGTTGAA
AGAGTCACCCACTTGAAATTAGCTCGGTTATCAAATAAATTATCTCTGGTAAAGAGCTCTGCAG
CAGGGTTAATCTATTTCGCATACTTACGCTGTAGGAACATTTTATTATTAGGATCCGACTACTGCCT
ACATATTTTATTCGGAAGGCATGATGTCGAAAATTTTGGAGCTTATAAAAAGGAACATATTTCACTC
TTGCTCGTTTGATGTAAGCTCTTCCGGGTTCTTATTTTTAATTCTTGTCCAGTAAACAGAAC
ATCCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTATATGTTTTGGCAGTTTTTACACTTCTGGCACTAACTA
GTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTACCAGCAGGCCAGAGGAAAAGTGGGATGAATAT
AAATTTTACCAGTATTCAATTGAAAGATTCCTCCACATATTCGAATGCAGCATATATGGCTTACCA
ATATGCAGACAAAGTCAAATTGGGCTCTGTTAGTGGGCAAACGGATATATCTA
```

J4 + FLO12_RV_J_2 (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
TGAACCTTCTACAGTACTTCGGAATACACCTAAAAGGTTGTTGGATGCTAAATTTAGCAAAAAGTC
TTTTTTAGCTCACTATTAGGCTTGTTAAAGTCTGAAATTGTTGAAAGGCACTCAAAAGATAAATC
AACAAATCAGCATTAAACGGCACAGTTGAAAGAGTCACCCACTTGAAATTAGCTCGGTTATCAAATA
TAATTATCTCTGGTAAAGAGCTCTGCAGCAGGGTTAATCTATTTCGCATACTTACGCTGTAGGAAC
ATTTTATTATTAGGATCCGACTACTGCCTACATATTTATTTCGGAAGGCATGATGTCGAAAATTTT
GAGCTTATAAAAAGGAACATATTTCACTCTTGCTCGTTTGATGTAAGCTCTTCCGGGTTCTTATT
TTAATTCTTGTCCAGTAAACAGAACATCCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTATATGTTTTTGG
GCAGTCTTTACACTTCTGGCACTAACTAGTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTACCAGC
AGGCCAGAGGAAAAGTGGGATGAATATAAATTTTTACCAGTATTCAATTGAAAGATTCCTCCACAT
ATTCGAATGCAGCATATATGGCTTACCAATATGCAGACAAAAGTCAAATTGGGCTCTGTTAGTGGG
CAAACGGATATATCTATCAACTATAATGTTTCCTTGTTTACAACCTCAGGGACATATCAGTGCCC
TCAAGAAGATTTATATGGTAATGGTAATTGGGGATGCAAAGGAATTGGTGCTTGTCTAATAATC
CAATAATTGCATACTGGAGTACTGATTTATTTGGTTTCTATACTACCCCAACAAACGTAACCCTAG
AAATGACAGGTTATTTTTACCACCACAGACGGGTTCTTACACATTCAAGTTTGCTACAGTTGAC
GACTCTGCAATTCTATCAGTCGGTGGTAACGTTGCGTTTCAATGTTGTGCACAAGAACAACCTCC
AATCC
```

J9 + FLO12_RV_J_2 (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
TATTTTTAATTCTTGTCCAGTAAACAGAACATCCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTATATGTT
TTTTGGCAGTTTTTACACTTCTGGCACTAACTAGTGTGGCCTCAGGAGCCACAGAGGCGTGCTTA
CCAGCAGGCCAGAGGAAAAGTGGGATGAATATAAATTTTACCAGTATTCAATTGAAAGATTCCTC
CACATATTCGAATGCAGCATATATGGCTTACCAATATGCAGACAAAGTCAAATTGGGCTCTGTTA
GTGGGCAAACGGATATATCTATCAACTATAATGTTTCTTGTGTTACAACCTCAGGGACATATCAG
TGCCCTCAAGAAGATTTATATGGTAATGGTAATTGGGGATGCAAAGGAATTGGTGCTTGTCTAA
TAATCCAATAATTGCATACTGGAGTACTGATTTATTTGGTTTCTATACTACCCCAACAAACGTAAC
CCTAGAAATGACAGGTTA
```

P3+FLO11_RV_P för positiv kontroll (gensekvens i rött, flankerande i svart):

```
TGCTGGGAAAACCTTCGTGTAAGGGTTAGGCTGAGATTTATCTAGAGAAATGTGGGTCATCTTT
TTAGGTCCGTTCTCTTCTGGTGAGGTAACCTTTACAAAAATGTCATAGAGTTACCAATTGGGATTC
AAGGCATCATCGCAATATACTTCGTTCTTTTACGGAGAAATTAAGCTCTTTCTACTTTGAATTAAC
TGTTAGACTTGTCTTATCTGAGGAATGTCCGTGTTCAAATTAATAAAAAATTTAGGGCAGTTTTAT
TTACCTTAACAAATATGTTCAAGCATGTACGTTACTGCGCTCTCTTCTAGTTCAAGAACGGATAAC
TCATAGACTTACCAGTACAAGTTGTTGAAGGGTTCCCAATTGATAAAAAAGGATCTTTTGCTTCC
TAAAAATAACGTATAAAAAAGCACCTATTCATCAGTTATACTCCCTCATCATGTTGTGGTTCTAAT
TAAGAAATATCCTTTTGTAGGCCTCAAAAAATCCATATACGCACACT ATGCAAAGACCATTCTACT
CGTTATTTGGTCTTTTCGTTCTATTTAACTCAGCTTTGGGTTTTCCAAGTGCAGTACTAGTTCCTAGA
GGACCTC
```

FLO1 kontroll

CCUG + FLO1_RV (gensekvens)

```
TTCATCAACGAACCTTACCATTGACGGTATCAAGCCATGGGGTGGAAAGTTTCCACCTAATATCGAA
GGAACCGTCTATATGTACGCTGGCTACTATTATCCAATGAAGGTTGTTTACTCGAACGCTGTTTCTTG
GGTACACTTCCAATTAGTGTGACACTTCCAGATGGTACCAGTAAAGTATGACTTCGAAGGGTCG
C
```

S288C + FLO1 (gensekvens)

```
CCAGGCCCTTGCCGGGCATCTGTCGTATCATCAACGAACCTTACCATTGACGGTATCAAGCCATGGG
GTGGAAGTTTCCACCTAATATCGAAGGAACCGTCTATATGTACGCTGGCTACTATTATCCAATGAA
GGTTGTTTACTCGAACGCTGTTTCTTGGGGTACACTTCCAATTAGTGTGACACTTCCAGATGGTACCA
CTGTAAGTATGACTT
```