

Steffen Kambe Strømsnes
Robert Willoughby

MLST genotyping av husholdningsgener til *Escherichia coli* ekstrahert fra Brusdalsvatnet

Bacheloroppgave i 702BI Bachelor i bioingeniørfag
Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2019



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Bacheloroppgave

BI301305 – Bacheloroppgave

**MLST genotyping av husholdningsgener til *Escherichia coli*
ekstrahert fra Brusdalsvatnet**

10003 & 10013

Totalt antall sider inkludert forsiden: 62

Innlevert Ålesund, dato: 28.05.19

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høyskoler i Norge, jf. Universitets- og høyskoleloven §§4-7.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert	<input checked="" type="checkbox"/>

5.	Jeg/vi er kjent med at NTNU vil behandle alle saker hvor det foreligger mistanke om fusk.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten (Åndsverkloven §2).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU en vederlagsfri rett til å

gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering: ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)? ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over? ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet? ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. Jfr. Offl. §13/Fvl. §13)

Dato: 15.05.19

Forord

Denne bacheloroppgaven er gjennomført i siste semester av Bioingeniørstudiet ved NTNU i Ålesund, ved Institutt for biologiske fag i Ålesund. Oppgavestart var 18. mars og oppgaven ble levert inn 28. mai.

I denne oppgaven ble det utført analyse av *E. coli* ved hjelp av MLST. Det ble analysert og kvalitetssikret ved hjelp av endepunkts PCR og gelelektroforese. Det var ønskelig å se på hvilke sekvenseringstyper og genotyper det fantes av *E. coli* fra nærliggende vannkilder, og hva som kunne være kilden til bakteriene.

Gruppen ønsker spesielt å takke Ann Kristin Tveten for god hjelp og oppfølging under denne oppgaven, både som faglig- og prosessveileder. Gruppen ønsker også å rette en takk til Heidi Engstrøm og Magnus Løkset som har vært til hjelp med utstyr og reagenser i forbindelse med laboratoriearbeid.

Sammendrag

Escherichia coli er en gram negativ, fakultativt anaerob stavbakterie i *Enterobacteriaceae* familien. *E. coli* lever i symbiose med mennesker og andre pattedyr i deres gastrointestinale systemer, og er en opportunistisk patogen bakterie.

Urinveisinfeksjon, sepsis og diaré sykdom er tre klassiske kliniske sykdommer som *E. coli* kan forårsake.

8 renkultur prøver av *E. coli* ble rekultivert på koliform kromogent vekstmedium. DNA fra *E. coli* ble isolert, 7 husholdningsgen ble amplifisert med PCR. Amplikonene ble kvalitetssikret ved hjelp av separasjon på gelelektroferese. Prøvene ble sendt til Eurofins (Ebersberg i Tyskland) for sekvensering. Sekvensene dannet grunnlag for genotyping med MLST metode. MLST 7 gene Achtman scheme sammenlikner alleltypene til 7 husholdningsgener, og kombinasjon av disse allelene gir prøven en sekvenstype. De ulike sekvenstypene ble sammenlignet med *E. coli* MLST databasen som inneholder et stort antall eksisterende sekvenstyper. 7 av prøvene og tilhørende epidemiologiske data fantes i databasen, mens sekvenstypen til 1 prøve er ny og kun nærmeste lignende sekvenstype er identifisert. Databasen viser hvilke reservoar de andre prøvene er funnet i, hvilke land og hvilket miljø. I databasen kan man også finne ut om sekvenstypen er patogen. Sammenligningen gir en indikasjon på sekvenstypenes opprinnelse og den potensielle kontaminasjonen av drikkevannskilden som *E. coli* stammene er kultivert fra.

Analyse av sekvens, fylogenetiske trær og statistiske analyser indikerte en lav grad av polymorfisme i genene. Det viste også at prøvene er isolert tidligere fra blant annet dyr, jord, kloakk og humane kilder. Funn av *E. coli* i Brusdalsvatnet indikerer kontaminasjon av avføring fra mennesker eller dyr.

Ordliste

Adhesjon: Betegnelse for molekylær attraksjon i kontaktflater (Henge sammen eller klistre).

Allel: En variant form av et gitt gen.

Antigen: Et molekyl eller stoff som har evne til å fremkalle en immunrespons.

Amplikon: En bit av DNA/RNA som er et produkt av amplifikasjon eller replikasjon.

Autoklave: en metode for å sterilisere utstyr ved trykkoking.

Enterocytter: Epitelceller i tarm.

Enzym: Protein som katalyserer en biologisk reaksjon i en levende organisme.

Fenotype: Egenskaper hos individ som uttrykkes.

Fidelitet: Refererer til hvor presis polymerasen er til å sette inn rett base under PCR.

Fimbrier: Trådformede proteinutløpere på en bakterie sin overflate.

Flagell: Lang, bevegelig proteintråd som gjør at bakterier kan bevege seg.

Fosforylering: Tilsetning av en fosfatgruppe til et organisk molekyl.

Fylogenetisk tre: Evulusjonær slektskap mellom organismer.

Genotype: Hvilke gener og genvarianter en organisme består av.

Homologi: Gener som kommer fra en felles stamfar.

introgression: overføring av genetisk materiale mellom en art til en annen, på grunn av hybridisering mellom dem.

Kultivering: dyrking av bakterier, ofte renkultur.

Nitrogenbaser: Fire ulike som brukes i DNA: adenin, guanin, cytosin og tymin.

Nukleotider: Byggesteiner i DNA. Består av en nitrogenbase koblet på et suktermolekyl og en fosfatgruppe.

Nutrient broth: Næring som bakterier bruker for å vokse i flytende medium.

Patogen: Sykdomsfremkallende agens.

PCR: Polymerase chain reaction, en metode for å amplifisere et spesifikt gen.

Primer: Lite DNA fragment som trengs for å indusere syntese av DNA.

Primerdimer: Biprodukt i PCR, forekommer når primermolekyler hybridiserer.

Salmon Gal: kromogent stoff som avgir farge når det kløyves av spesifikke enzymer.

Serotype: Variasjon innen en art.

Symbiose: Tett samliv mellom to ulike organismer, der begge partene tjener på forholdet.

TAE-buffer: En buffer som brukes til gelelektroforese.

Taq-Polymerase: Varmestabilt enzym som katalyserer syntesen av et DNA molekyl.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	9
1.1 Bakgrunn og Hensikt	9
1.2 Problemstilling	9
2. Teori	10
2.1 Escherichia coli	10
2.2 <i>E. coli</i> og koliforme bakterier i vann	13
2.3 Kultivering av <i>E. coli</i>	13
2.4 Multilocus sekvens typing (MLST)	14
2.4.1 Kvalitetskontroll	16
2.5 Bioinformatiske verktøy	16
3. Materiale og metode	18
3.1 Bakteriekulturer og kultivering	18
3.2 Isolering av DNA	18
3.3 PCR	18
3.4 Kvalitetssikring	21
3.5 E-Gel	22
3.6 Bioinformatikk	22
3.7 Enterobase	23
4. Resultat	24
4.1 Dyrking, PCR og Kvalitetssikring	24
4.2 MLST	25
5. Diskusjon	28
6. Konklusjon	33
7. Referanser	34
Vedlegg	37

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn og Hensikt

Denne oppgaven ble valgt fordi deltakerne i gruppen hadde interesse for mikrobiologi og genteknologi. En oppgave med en god mengde laboratoriearbeid var også attraktivt.

Formålet med oppgaven var genotyping av *Escherichia coli* kultivert fra råvann, for å sammenlikne genotypene med enterodatabasen. Dette gir en indikasjon på om de er funnet andre steder, hvilke reservoar de er funnet i og om de er patogene. *E. coli* er svært relevant både som modellorganisme innen genteknologi, men også innenfor klinisk og diagnostisk mikrobiologi. *E. coli* er en av de oftest brukte mikroorganismene for å beskrive vannkvalitet i forhold til nærliggende miljø. *E. coli* kontaminasjon i vann kan føre til alvorlig sykdom og eventuelt død, det er derfor viktig med en kontinuerlig overvåkning og videre forskning for å forbedre vannkvalitet og vannsikkerhet.

1.2 Problemstilling

MLST genotyping av husholdningsgener til *Escherichia coli* kultivert fra råvann.

Delmål:

Er sekvenstypene funnet før?

Hvilken informasjon finnes om sekvenstypene som er funnet før?

Kan de være patogene?

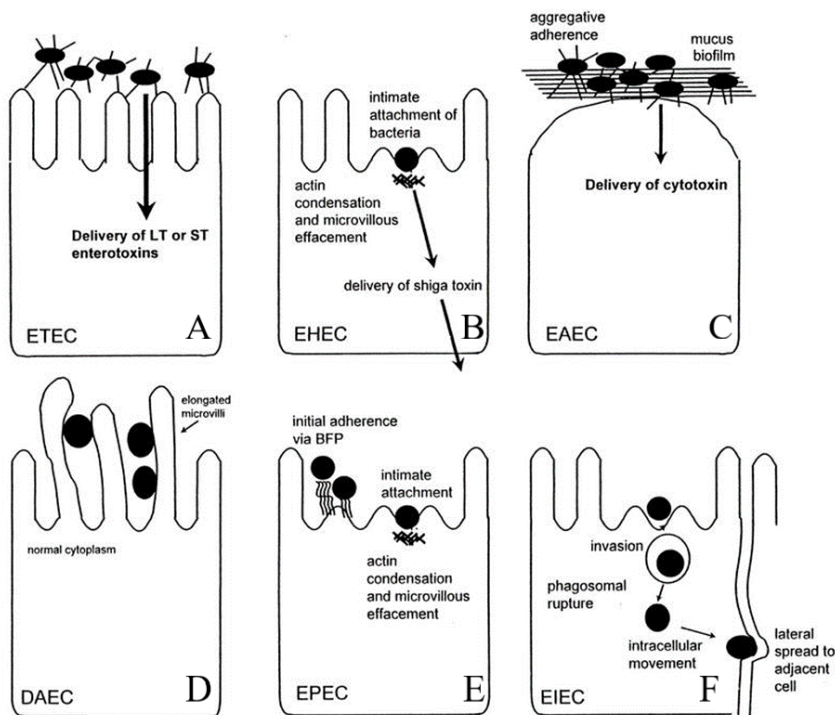
Kan man indikere kilden til kontaminasjonen?

2. Teori

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli er en gram negativ fakultativt anaerob stavbakterie i *Enterobacteriaceae* familien. Alle pattedyr har *E. coli* i sin normalflora i det gastrointestinale systemet og koloniserer tarmen bare timer etter fødselen. *E. coli* vokser best på et mangfold av mono- og disakkarider, og aminosyrer som inngår i sitronsyre-syklusen. *E. coli* har derimot problemer med å vokse på komplekse karbohydrater på grunn av mangel på essensielle enzymer (1). Mennesker og *E. coli* lever som oftest i symbiose. Det er store mengder litteratur på temaet, men det er fortsatt ikke helt forstått hvordan og hvorfor symbiosen er så vellykket. En hypotese er at *E. coli* utnytter evnen sin til å bruke glukonat bedre enn andre bakterier, som gir bakterien en metabolsk nisje (2).

E. coli har en delingstid på 20 minutter under optimale forhold og er opportunistisk patogen. Den smitter oftest igjennom kontaminert mat og vann, eller i en immunsvekket vert. Det er 3 generelle kliniske sykdommer som ofte oppstår ved infeksjon av patogene *E. coli* stammer. Det er urinveisinfeksjon, sepsis/meningitt og diaré-sykdom (3).



Figur 1 (A-F) viser hvordan de ulike patogene *E. coli* kategorier kan forårsake diaré sykdom. Det er vanlig å henvise til 6 forskjellige metoder patogene *E. coli* kan framkalle sykdom i en normal og frisk vert. Alle har unike mekanismer de bruker for å infisere enterocytene i tarmen. Merk at disse forklaringene er fra studier gjort in vitro og kan være annerledes ved en menneskelig infeksjon. Identifikasjon av spesifikke virulensfaktorer og serotyping er de vanligste metodene for klassifisering av ulike patogene stammer (4).

Bruk av serotyping blir sett på som gullstandarden for klassifisering av *E. coli*.

Ytermembranen til *E. coli* er fylt med lipopolysakkarider. Disse består av lipid A, kjerne oligopolysakkarider og O-antigen. Klassifiseringen gjøres på grunnlag av overflateantigene, der man ser på O-antigen, H-antigen (flageller) og K-antigen (kapsel).

E. coli kan være bevegelige eller stasjonære, med flageller i alle retninger. Mangel på H-antigen gjør bakterien nonmotile. Det er foreslått 180 O-, 60H- og 80K-antigener. Hvert O-antigen har en egen serogruppe, og kombinasjonen av ulike O-, - og H antigen definerer serotypen (5).

Enterotoksigene E. coli: Finnes to typer enterotoksiner, varme stabile (ST) og varme labile (LT). ETEC adherer til enterocytene i tynntarmen ved hjelp av fimbrier på overflaten til bakterien og avgir enterotoksiner. Disse vil bli tatt opp av tarmcellene og under biokjemiske reaksjoner føre til økt klorutskillelse og hemme natrium opptak. Dette gjør at vann kommer ut i tarmen grunnet osmose. Dette kan gi vandig diaré, ofte kjent som turistdiaré (figur 1-A).

Enterohemoragiske *E. coli*: EHEC uttrykker shigatoksiner (Stx) som kan gi livstruende komplikasjoner som hemolytisk uremisk syndrom, trombocytopeni og akutt renalsvikt. Bakterien vil feste seg i enterocytene i tykktarmen og ødelegge overflaten til mikrovilliene. Dette gjør at det dannes en slags plattform som bakterien fester seg opp på. Dette kan også danne lesjoner som kan gi blodig diaré (figur 1-B).

Enteraggregative *E. coli*: Patogenesen av EAEC er ikke helt forstått, men det innebærer binding og aggregering i mucosa i tarmen. En hypotese er at bakteriene øker slimproduksjonen slik at en biofilm kan dannes. Deretter vil cytotoxiner bli frigjort som forårsaker skade på tarmcellene og kan dermed gi vedvarende diaré (figur 1-C).

Diffusely adherent *E. coli*: Det er lite som er visst om DAEC sin patogene effekt til å frambringe diaré, men disse stammene blir definert av mønsteret av «diffuse adherence» (DA) som dekker hele celleoverflaten og skaper en slags elongering av cellen kalt “embedding” slik som på figur 1-D. Kan gi vandig diaré.

Enteropatogene *E. coli*: EPEC bindes til cellene i tarmen og uttrykker proteiner som bryter ned mikrovilliene i nærområdet. Proteinene som bakterien uttrykker vil vandre inn i cellen og danne kompleks som proteinet *intimin* kan bindes til. Videre vil bakterien interferere med cellens cytoskjelett og fosforylere celleproteiner (figur 1-E).

Enteroinvasive *E. coli*: EIEC har patogene egenskaper som er nær identiske med *Shigella spp.* Bakterien blir tatt inn i cellen der den utskiller endotoksiner og deler seg i cellens cytoplasma. EIEC kan spre seg videre ved å infisere nabocellene til den infiserte tarmcellen (figur 1-F) (3).

Siden *E. coli* har så stor genomisk variabilitet kan bakterien overleve og lykkes i mange ulike omgivelser. På grunn av disse egenskapene er *E. coli* en god bakterie å studere for forståelse av tilpasning og evolusjonær utvikling av mikroorganismer, både for kommersielle og patogene stammer (6).

2.2 *E. coli* og koliforme bakterier i vann

Kvaliteten av vann er viktig for folkehelsen, og sykdom forårsaket av kontaminert vann er en av verdens største utfordringer. Rent vann og gode sanitærforhold er et av FNs 17 bærekraftsmål for en bedre verden. Høy prevalens av fekal kontaminert drikkevann korrelerer til økt risiko for infeksjon av diaréskapende patogene bakterier. Tilstedeværelsen av *E. coli*, total og fekale koliforme bakterier i vann er en av de beste metodene for testing av avføringsforurensning i drikkevann. Grunnen er at *E. coli* som beskrevet over lever som normalflora i gastrointestinale system hos alle pattedyr, og finnes dermed i avføringen deres. *E. coli* vokser godt i tarmen til pattedyr, men betydelig dårligere utenfor det gastrointestinale systemet, noe som fører til at funn av *E. coli* i drikkevann kan tyde på fersk forurensning av feces. Kontaminasjonen kan komme fra ville dyr, nærliggende menneskelig aktivitet, avløpsvann fra oppdrett av dyr eller noe enda mer alvorlig som en kloakklekkasje (7). Dersom samme sekvenstype av *E. coli* er funnet fra flere kilder, eksempelvis både storfe og mennesker, er den ikke passende til å konkludere spesifikt hva som er kilden i det gitte tilfellet. *E. coli* har lav vertspesifisitet og replikerer i miljøet. *E. coli* har også både geografisk og temporal varibilitet (8).

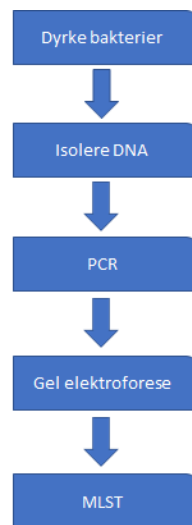
2.3 Kultivering av *E. coli*

E. coli vokser best i varmestabile forhold og kan vokse både med og uten oksygen. Bakterien kan også leve i flere måneder utenfor kroppen, som i jord under tøffe forhold. Dette gjør det lett å kultivere *E. coli* (9).

Det finnes mange metoder, men koliforme kromogene agarskåler (CCA). utnytter forskjellige enzymer som ulike bakterier har. Koliforme bakterier inneholder et enzym kalt D-galaktosidase, som kløyver salmon GAL. Dette gir en fargeforandring på skålen. *E. coli* inneholder også D-glucuronidase, som kløyver kromogent X-glucuronide. Det er dette som *E. coli* sin karakteristiske mørk blå/fiolett farge. Skålene har gunstige vekstforhold for koliforme bakterier med rett konsentrasjon natriumklorid for optimalt (10).

2.4 Multilocus sekvens typing (MLST)

MLST er en metode for å identifisere isolater av bakterielle arter ved å bruke DNA-fragmenter av flere ulike husholdningsgener. Disse genene er vanligvis 450-550 basepar lange og gjør det mulig å lage amplikon som kan sekvenseres. For hvert husholdningsgen kan de ulike bakteriestammene ha nukleotidvariasjon. Disse kan utgis som spesifikke alleler og kan dermed få en spesifikk allele-profil og totalt utgjør allelprofilene en sekvenstype. MLST blir brukt i epidemiologiske studier for å følge et patogen sin vandring i en populasjon.



Figur 2: Workflow for MLST. Figur viser de ulike trinnene som utføres for å gjøre MLST genotyping. DNA blir isolert fra bakterier. Målgener blir amplifisert med PCR. Produkter fra PCR kvalitetssikres før de sekvenseres og kan bli analysert videre med bioinformatiske verktøy.

Husholdningsgener koder for proteiner som er fundamentale for metabolske funksjoner og er dermed essensielle for cellens funksjoner. De blir transkribert kontinuerlig. Mutasjoner skjer i mindre grad i husholdningsgener enn i andre gener. Dette gir tilstrekkelig grunnlag til

bakterietyping. En stor fordel med MLST er at data fra sekvenseringen kan bli funnet på internett gratis, som dermed gir en virtuell database med nøyaktig og rask sammenlikning av stammer fra hele verden. Dette gjør MLST til en relativt billig og skalerbar metode for nukleotidsekvensering som er reproducerbar og overførbart mellom ulike laboratorier ([11](#), [12](#)).

MLST analyse av *E. coli* bruker Achtman 7 gene MLST, og disse genene er:

- adk (adenlyate kinase)
- fumC (fumarate hydratase)
- gyrB (DNA gyrase)
- icd (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase)
- mdh (malate dehydrogenase)
- purA (adenylosuccinate dehydrogenase)
- recA (ATP/GTP binding motif)

Man kan bruke sekvenseringsdata fra MLST til å sammenligne sekvenser. Fylogeni kan kun studeres med gener som har homologi. Fylogenetiske analyser estimerer evolusjonære forandringer i et antall sekvenser over et sett av mange homologe gener.

Fylogenetiske trær er et diagram som indikerer evolusjonært slektskap mellom organismer. For bakterier blir disse trærne laget på grunnlag av utvalgte DNA-sekvenser. Et fylogenetisk tre inneholder forgreninger og linjer, forgreninger viser hvor de to skiller lag og lengden på linjene sier noe om forskjellen mellom organismene ([13](#)).

PCR brukes vanligvis til amplifikasjonen av de genene man skal analysere ved MLST. PCR er et sensitivt enzymatisk assay som amplifiserer et spesifikt DNA-fragment, i en kompleks blanding av DNA-fragmenter. PCR kan brukes til amplifikasjon av DNA fra ulike vev eller organismer, blant annet mikroorganismer. Hvert PCR assay krever tilstedeværelse av templat-DNA, primere, nukleotider og DNA-polymerase ([14](#)).

2.4.1 Kvalitetskontroll

En gelelektroforese brukes for å kvalitetssikre produktet. Gelelektroforese er en av de vanligste og mest effektive metodene for å separere DNA. Separasjonen er avhengig av molekylets størrelse, ladning og form, men type buffer som brukes og konsentrasjon av agarose vil også påvirke vandringshastigheten. Fragmentene vil danne et amplikon som kan tolkes og si hvor mange basepar fragmentet har. Gelen er tilsatt Gelred, som festes til DNA og vil gjøre amplikon synlige under UV-lys. Det finnes flere metoder for gelelektroforese, både konvensjonell agarosegel og ferdige system, som for eksempel E-Gel (15).

E-Gel® SizeSelect™ 2% pre-cast agarose gel er designet for ekstraksjon av målamplikon som skal brukes videre i sekvensering. Gelen inneholder to rader med brønner. I øverste brønn pipetterer man prøver. Når amplikon fra prøven har nådd de nederste brønnene kan de pipetteres ut. Dersom man er usikker på båndlengdene eller har mange amplikon kan man bruke en DNA-ladder. Dette muliggjør ekstraksjon av akkurat det amplikonet som skal viderebehandles, og man unngår eventuelle interfererende amplikon. E-Gel inneholder en proprietær fluorescerende nukleinsyre probe som kan visualiseres med UV-lys/ Blått lys transilluminator (eksitering/ emisjon ved 490/522 nm). Gelen inneholder en proprietær fluorescerende nukleinsyre probe som kan visualiseres med blue light transilluminator (eksitering/ emisjon ved 490/522 nm) (16). Gelen inneholder SYBR® Gold som er den mest sensitive molekylære proben tilgjengelig for deteksjon av enkelt og dobbelttrådet RNA/DNA i elektroforese gel (17).

2.5 Bioinformatiske verktøy

Enterobase er et bioinformatisk verktøy og en database for analysering og visualisering av genetisk variasjon i enterobacteriaceae familien, og spesielt for *E. coli* og *Salmonella*.

Enterobase benytter ENTEROTOOLS, et sett med modulære, webbaserte verktøy som er kompatible med nåværende og fremtidens sekvenseringsteknikker, som 7-gen MLST og hel-genomsekvensering (18).

MEGA X, eller Molecular Evolutionary Genetics Analysis er et bioinformatisk verktøy som kan brukes til å analysere fylogeni og statistiske analyser av molekylær evolusjon. MEGA X

er tilgjengelige i to grensesnitt, grafisk eller kommandolinje. Bruk av statistiske metoder som Tajima's D neutrality test kan gjøres for å se om DNA-sekvensene sin evolusjon er helt tilfeldig eller om det skyldes faktorer som introgression eller demografisk ekspansjon. Resultatene for Tajima's D neutrality test kan si om frekvensen av polyformisme er høy eller lav ([19](#), [20](#)).

3. Materiale og metode

3.1 Bakteriekulturer og kultivering

8 prøver ble rekultivert fra renkultur, som i 2017 ble ekstrahert ved bruk av membran filtrering fra råvann. Prøvene har deretter blitt dyrket og lagret kjølig før de ble rekultivert på flytende medium og overført på Koliform kromogen agarskål (VWR, Belgia), vedlegg 1B viser tekniske data om medium benyttet.

Nutrient broth (Merck, Tyskland) ble laget ved å ta 8 g nutrient broth blandet i en liter dobbeldestillert vann. Glassrør ble fylt med 10 mL nutrient broth og rør ble merket. Rørene og stativet ble autoklavert før bruk.

Ved hjelp av aseptisk teknikk ble kolonier overført med 10 µL kalibrert øse. Rørene ble inkubert ved 37 °C i 18-24 timer.

3.2 Isolering av DNA

DNA ble isolert ved bruk av DNeasy blood and tissue spinnkolonner kit (Qiagen GmbH, Tyskland). Standard prosedyre ble modifisert (vedlegg 2).

I de 8 Prøvene som vokste på CCA skålene ble DNA isolert og det isolerte DNAet ble benyttet videre som DNA-templat.

3.3 PCR

Tabell 1: primere til MLST genotyping. Det er brukt 7 primerpar, en reverse og en forward for hvert av de 7 husholdningsgenene til *E. coli*. Lengden på det ferdige ampikonet er oppgitt med lengde på primere benyttet.

Primer	Sekvens (5' - 3')	Primer lengde	Allellengde	Produsent
--------	-------------------	---------------	-------------	-----------

adkF	ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG	20	536 bp	Thermo Fisher (T.F)
adkR	CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT	20	536 bp	T.F
fumC F	TCA CAG GTC GCC AGC GCT TC	20	469 bp	T.F
fumC R	GTA CGC AGC GAA AAA GAT TC	20	469 bp	T.F
gyrB F	TCG GCG ACA CGG ATG ACG GC	20	460 bp	T.F
gyrB R	ATC AGG CCT TCA CGC GCA TC	20	460 bp	T.F
icd F	ATG GAA AGT AAA GTA GTT GTT CCG GCA CA	29	518 bp	T.F
icd R	GGA CGC AGC AGG ATC TGT T	19	518 bp	T.F
mdh F	ATG AAA GTC GCA GTC CTC GGC GCT GCT GGC GGG GG	32	452 bp	T.F
mdh R	TTA ACG AAC TCC TGC CCC AGA GCG ATA TCT TTC TT	35	452 bp	T.F
purA F	CGC GCT GAT GAA AGA GAT GA	20	478 bp	T.F

purA R	CAT ACG GTA AGC CAC GCA GA	20	478 bp	T.F
recA F	CGC ATT CGC TTT ACC CTG ACC	21	510 bp	T.F
recA R	TCT CGA TCA GCT TCT CTT TT	20	510 bp	T.F

Stockløsninger på 100 μ M ble fortynnet til bruksløsninger med en konsentrasjon på 10 μ M. (5 μ L stock løsning + 45 μ L ddH₂O). Alle 14 rør ble deretter sentrifugert i 1 minutt på minispinn sentrifuge. Mastermix til totalt 10 reaksjoner ble laget til hvert av de syv husholdningsgenene i henhold til tabell 1, for de tre første PCR amplifikasjonene og tabell 2 for følgende. Prøvene og mastermix ble tilsatt i PCR strips. Negative kontroller ble inkludert i alle analyseserier.

Tabell 2: Mastermix oppskrift 1 viser hva som blir tilsatt mastermix.

Reagens	Volum
Taq DNAPolymerase mastermix (VWR, Danmark)	100 μ L
Primer F (bruksløsning)	3,75 μ L
Primer R (bruksløsning)	3,75 μ L
nukleasefritt vann	62,5 μ L
Sum volum	170 μL

Til hvert PCR-rør ble det tilsatt 17 μ L mastermix og 3 μ L DNA-templat (fra DNeasy).

Til negativ kontroll ble det tilsatt 17 μ L mastermix og 3 μ L nukleasefritt vann (Qiagen GmbH, Tyskland).

Totalt volum i hvert rør skulle være 20 μ L.

Tabell 3: Mastermix oppskrift 2 viser hva som blir tilsatt mastermix.

Reagens	Volum
polymerase mastermix (Eurogentek)	125 μ L
Primer F	12,5 μ L
Primer R	12,5 μ L
nukleasefritt vann	70 μ L
Sum volum	220 μL

Til hvert PCR-rør ble det tilsatt 22 μ L mastermix + 3 μ L DNA-templat (fra DNeasy).

Til negativ kontroll ble det tilsatt 22 μ L mastermix + 3 μ L nukleasefritt vann.

Totalt volum i hvert rør skulle være 25 μ L.

Amplifikasjonen ble gjennomført ved følgende temperatur og tid.

Hva	Initiering av denaturering	Denaturering	Annealing	Elongering	Avsluttende elongering	
Temperatur	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
tid	10 min	1 min	1 min	1 min	7	∞
Antall holds/sykluser	1	35	35	35	2	

PCR-produkt ble stående på 4 °C i instrument til det ble satt i kjøleskap eller separert på gelelektroforese.

3.4 Kvalitetssikring

TAE buffer konsentrat 50X (Thermo Fisher, Litauen) ble fortynnet i dobbelt destillert vann 1:50 i batcher på 2,5L (2450mL dobbel destillert vann og 50 mL TAE 50x).

Agarosegel ble laget med 1,8 g agarose pulver (Lonza, USA) blandet med 80 mL TAE-buffer

1x i en erlenmeyerkolbe, som ble varmet på full effekt i mikrobølgeovn i 2-3 minutter til løsningen ble helt oppløst. Det ble så tilsatt 2 μ L Gelred (Biotium, USA) til agarosen. Elektroforesekarer ble tilsatt to kammer hver med 14 brønner. Når agaroseløsningen nådde 60-65 °C ble det overført til elektroforesekarer.

2 μ L PCR produkt/negativ kontroll ble tilsatt i sterile PCR-strips og tilført 1 μ L loading dye (Biorad), 2 μ L av dette ble tilsatt i brønner på agarosegelen. For analyse 3-8 ble 2 μ L produkt/negativ kontroll tilsatt direkte i gelen, ettersom den inneholdt loading dye.

Elektroforese ble utført 5 minutt på 50V etterfulgt av 45 minutt på 100V.

Etter separasjon ble ChemiDoc™ Imaging Systems (vedlegg 5) brukt til å ta bilde av gel.

Alle brønner tilsatt mastermix og DNA-templat fungerte som positiv kontroll, og mastermix tilsatt nukleasefritt vann fungerte som negativ kontroll.

3.5 E-Gel

For prøver der det var vanskelig å skille de ulike amplikonene ved hjelp av agarose gel, ble det benyttet E-Gel Ibase Power system med tilhørende E-Gel EX 2% agarose gel (Invitrogen, Israel). Det ble pipettert 20 μ L PCR produkt i brønn 1 til 8 i øverste delen av gel. Til alle resterende brønner ble det pipettert 20 μ L nukleasefritt vann.

Program-9 ble brukt som kjører spenning over gel i 20 minutt og er lagd for 2% gel. Det ble alltid benyttet et "Amber-filter" over E-gel Ibase for å begrense UV-stråling. Etter rundt 15 minutter ble UV-lampen skrudd på for å observere vandringslengden. UV-lampe ble benyttet på amplikon minst mulig ettersom UV-stråling degraderer DNA.

Når amplikonene hadde nådd brønnlinje 2 ble de pipettert ut og overført i ny PCR-strips. Amplikonene ble hentet ut etter ca. 30 minutt kjøring.

3.6 Bioinformatikk

MEGA X ble benyttet for å analysere sekvenser fra Eurofins.

Programmer som ble benyttet:

- *Edit/build alignment*

- *Construct/test neighbor-joining tree*
- *Tajima's test of neutrality*

3.7 Enterobase

Enterobase ble brukt for å sammenligne tidligere funn av samme *E. coli* typer og hvor de ble funnet. Databasen for *Escherichia/Shigella* ble brukt. Ved å trykke på *Find ST(s)* kan man søke på både alleler og ST. Det ble brukt Achtman 7 gene MLST scheme i denne oppgaven.

4. Resultat

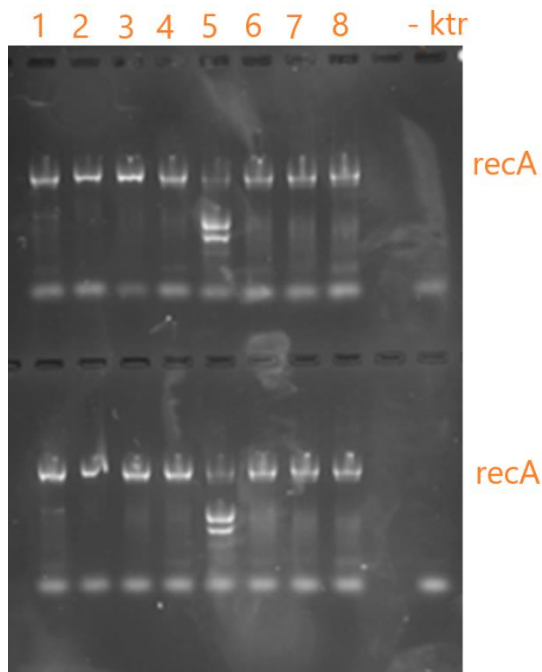
4.1 Dyrking, PCR og Kvalitetssikring

8 prøver ble kultivert, både i flytende medium og på CCA-skåler. DNAet ble isolert og dette ble brukt videre i PCR. Det ble utført PCR av alle de 8 prøvene som ble isolert, videre ble de amplifiserte prøvene overført til agarosegel som fungerer som en kvalitetssikring. For amplikon der det var vanskelig å få tydelige og gode positive resultat, ble det utført E-gel for ekstraksjon av rett amplikon. Dette ble utført til alle prøver hadde amplikon for alle 7 husholdningsgenene.

For mdh ble produktet overført og kjørt på E-Gel. Amplikonene er tydelig for alle 8 prøver (bilde 1). Produkt som gav beste amplikon for recA ble kjørt i duplikat (bilde 2). For adk og fumC viste separasjonen at det var krysskontaminasjon (vedlegg 7 – bilde 3), samme produkt ble kjørt på nytt og her var det ikke krysskontaminasjon (vedlegg 7 – bilde 4). Resultatet av separasjonen for icd og purA er vist i vedlegg 7 - bilde 15, og en kvalitetssikring av amplikon for alle icd og purA amplikon er vist i vedlegg 7 – bilde 16. Tilslutt viser vedlegg 7 – bilde 27 resultatet for gyrB som ble separert og ekstrahert fra E-gel.



Bilde 1: Viser mdh amplikoner fra analyse 1 på E-gel. Ble tidligere separert på agarosegel som var støpt på lab, som ikke ble optimal.



Bilde 2: recA som ble kjørt i duplikat. Nytt primersset benyttet, 1,5mM MgCl₂, mastermix 2.

4.2 MLST

Av de 8 prøvene som ble analysert med MLST var 7 av de kjente sekvenstyper og 1 var en helt ny. De 7 tidligere kjente sekvenstypene hadde 100% treff på alle husholdningsgen og kunne videre behandles igjennom Enterobase sine databaser (Tabell 4). Resultatene viser at sekvenseringen av husholdningsgenene er identiske hos prøve 1 & 6, prøve 4 & 8 og hos prøve 3 & 7 (figur 3). Sekvenserte stammer med samme sekvenstype er tidligere funnet i avføring fra pattedyr og fugler, matvarer og i naturen. Alle allelene hadde negativt resultat for Tajima's D neutrality test, som indikerer en lav grad av polymorfisme i genene.

Tabell 4: viser hvilke sekvenstyper de ulike prøvene hadde og hvilke allelvariasjoner som tilsvarer disse sekvenstypene. Det ble brukt Achtman 7 gene MLST for å finne ut sekvenstypen. Alle prøvene bortsett fra prøve 2 hadde 100% treff på alle gen. Prøve 2 hadde 5 nye allelvarianter og 2 ufullkomne treff.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Adk	137	888 _a	10	1	35	137	10	1
fumC	4	721*	11	107	50	4	11	107
gyrB	5	796*	4	7	22	5	4	7
icd	26	1027 _b	8	11	49	26	8	11
mdh	7	797*	8	7	37	7	8	7
purA	13	147*	8	3	41	13	8	3
recA	6	659*	128	7	191	6	128	7
Sekvenstype	6691	Ukjent (9205)	1060	401	5748	6691	1060	401

* betyr ny allel, sekvenstype gitt kan indikere nærmeste kjente sekvenstype.

a/b betyr ufullkommen treff, sekvenstype gitt kan ikke stoles på.

Tabell 5 - Selection: statistisk beskrivelse av resultat.

Tajima's D er en statistisk genetisk populasjonstest. Meningen med testen er å skille om en DNA-sekvens utvikler seg «nøytralt» eller under en ikke-tilfeldig prosess. Tajima's D blir utregnet som forskjellen mellom to målinger av genetisk variasjon, gjennomsnittet av parvise differanser og antall segregerende områder. Disse verdiene er justert slik verdiene er like i en populasjon som har nøytral evolusjon.

Gen	m	S	p_s	θ	π	D
adk	8	22	0.041045	0.015830	0.014792	-0.342986
fumC	8	56	0.104478	0.040294	0.038513	-0.238464
gyrB	8	19	0.035448	0.013671	0.010461	-1.219108
icd	8	82	0.152985	0.059003	0.047841	-1.026880
mdh	8	44	0.082090	0.031660	0.023121	-1.446621
purA	8	11	0.020522	0.007915	0.007862	-0.033124
recA	8	19	0.035448	0.013671	0.010794	-1.092590

S beskriver hvor mange steder de ulike prøvene har en variasjon på samme plass i genet.

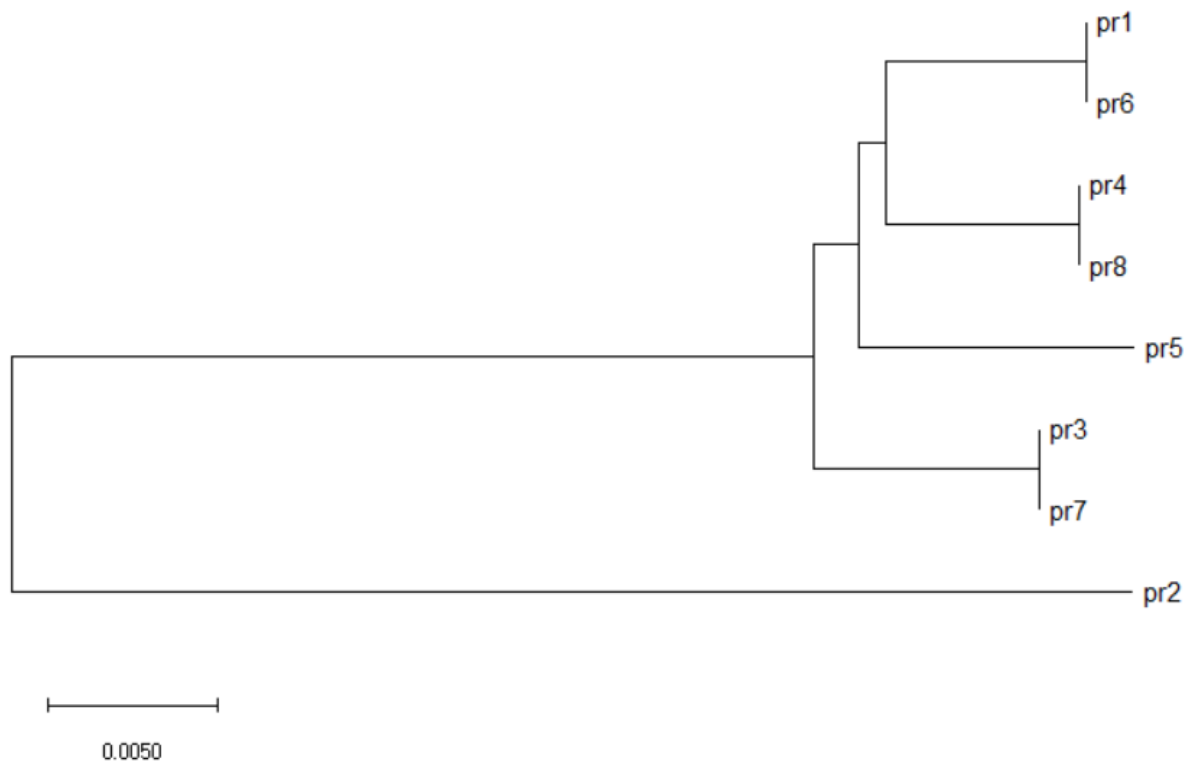
(segregerende områder)

p_s = er en variabel brukt til utrekning av nukleotid mangfold

Θ = forventet verdi for π

π = Nukleotid mangfold er en måling på genetisk variasjon og graden av alternative fenotyper i en populasjon.

D =Tajima test statistic.



Figur 3 viser fylogenetisk tre av alle prøvene. Den evolusjonære historien ble utledet ved bruk av *Neighbor-joining method*. Treet med gren lengde=0.0843870 er vist. Evolusjonær distanse ble kalkulert ved bruk av *The maximum Composite Likelihood method*. Grenene representerer evolusjonær historie, der grenlengden representerer tid. Nodene er der grenene samles og representerer felles stamfedre.

5. Diskusjon

Alle prøver benyttet i prosjektet ble kontrollert og rendyrket når de ble ekstrahert fra Brusdalsvatnet. Alle *E. coli* stammer var først isolert i 2017 og dyrket til renkultur på CCA medium. Amplikon fra de ulike husholdningsgenene ligger mellom 452-536 basepar. Dannelsen av primerdimere kan føre til at man får flere amplikon i gelen, men primerdimere er mye mindre enn produktlengden til de ulike husholdningsgenene. I denne sammenhengen har ikke primerdimere noe innvirkning på sekvenseringen av amplikon, men indikerer at PCR metoden ikke er optimal.

Før prøvene ble sekvensert var det viktig at alle de 7 husholdningsgenene hadde amplikon, at det ikke var doble eller uspesifikke produkt og at negativ kontroll var negativ. En kvalitetssikring av alle amplikon ble utført, der samme PCR-produkt ble overført på en ny gel. Hvis amplikon var uspesifikke kunne det tyde på lite optimal PCR metode eller forurensede reagens. Ved falsk negativ kontroll kunne det være at det nukleasefrie vannet eller mastermix var kontaminert, som medførte at hele serien ble forkastet. For Sanger sekvensering er det viktig at det ikke er flere amplikon i prøven. Ved tilstedeværelse av flere amplikon av ulik størrelse ble E-gel brukt for å ekstrahere ut målamplikon for husholdningsgen.

adk og fumC fra analyse 2 – Amplikon fra første analyse forekommer det krysskontaminasjon, amplikon er ikke velavgrenset og ulike prøver har kontaminert ulike brønner (vedlegg 7 - bilde 3). Ettersom krysskontaminasjonen har skjedd i agarosegelen er PCR produktet ikke påvirket og kunne brukes videre. For å være sikker på at amplikon var korrekt ble kvalitetskontroll utført, her ble amplikon bra (vedlegg 7 - bilde 4). Dette indikerer videre at det faktisk var krysskontaminasjon under tilføring av prøver til brønnene (vedlegg 7- bilde 3).

icd og purA fra analyse 3 – Amplikon tydelige for p1-p3 både på icd og purA (vedlegg 7 - bilde 15). Under analyse 3 ble det utført gelelektroforese for prøve 1-3 på hvert husholdningsgen, for å se hvilke som hadde blitt amplifisert. kvalitetssikring av prøve 1-8

både for *icd* og *purA* ble gjort ettersom de hadde fine resultat. Resultatene sammensvarte ved to ulike gelelektroforeser. Vedlegg 7 - bilde 16 viser kvalitetskontroll for *icd* og *purA* fra analyse 3.

mdh fra analyse 1 – Viser dannelse av noe uspesifikke amplikon, spesielt for prøve 1 (vedlegg 7 - bilde 9). Derfor ble dette PCR produktet overført og kjørt på E-gel. På E-gel ble de tydeligste DNA-fragmentene av størrelse på 452 basepar hentet ut og overført til ny PCR-strips (resultat - bilde 1). DNA-fragmentene tok lenger tid å separere enn det som var anbefalt (Invitrogen). Produsenten anbefaler ikke å kjøre gel lenger enn 15 minutt ettersom agarosegel kan «smelte». Det tok nærmere 30 minutt før DNA-fragmentene nådde brønner der de kunne ekstraheres. Fragmentene er store og spenningskilden kan ha nedsatt spenning som fører til lengre vandringstid. Prøve 8 viste ikke positivt resultat for *mdh* amplikonet på noen av analysene (vedlegg 7 - bilde 9, 12 og 20). På E-Gel var *mdh* amplikonet positivt også for prøve 8 (resultat – bilde 1). Dette kan indikere at E-Gel er bedre på å visualisere amplikon ettersom det er en mer standardisert metode. E-Gel Size Select 2% inneholder SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain, en svært sensitiv molekylær probe. Agarose gel støpt på lab oppnår ikke samme kvalitet.

gyrB fra analyse 5 – Viser uspesifikke amplikon, det er flere amplikon og amplikonene har ulik vandringstid (vedlegg 7 - bilde 18). Det kan være årsaker som: uspesifikke primere, konsentrasjon av $MgCl_2$, PCR program ikke optimalisert; spesielt annealing tid og temperatur. Ettersom amplikonene ble dårlig på agarosegel ble PCR produkt overført og kjørt på E-Gel. Amplikonene ble godt separert på E-Gel, også her måtte E-Gel kjøres i 30 minutter før amplikonene kunne hentes ut (vedlegg 7 - bilde 27).

Diverse andre geler er det uspesifikke amplikon/flere amplikon (vedlegg 7 – bilde 6, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 22 og 28 mangel på amplikon (vedlegg 7 – bilde 8, 13, 21, 23, 24, 25 og 29) eller kontaminering (vedlegg 7 – bilde 14 og 26) som har bidratt til at produkt har blitt forkastet.

recA – Mange analyser ble negative eller fikk svært uspesifikke amplikon (vedlegg 7 bilde 13,15,17,18). Ulike temperaturer på annealing, og ulik konsentrasjon av $MgCl_2$ ble også

prøvd (vedlegg 7 bilde 10, 21, 22, 23, 24 og 25). Analysene indikerer at det første primersettet som ble benyttet, ikke fungerer optimalt for målamplikon. Ny bruksløsning ble laget av en ny stockløsning med annet primerkit; recA ble amplifisert (bilde 2).

For resultatene sin del fungerte fremgangsmåte for PCR amplifikasjon og kvalitetskontroll. På grunn av vanskeligheter med å få gode målamplikon måtte det flere geler til og det måtte lages flere serier PCR produkt for å få amplikon som kunne brukes til Sanger sekvensering. Selve tillagingen og kjøring av agarosegel i elektroforesekaret er en manuell prosess sammenlignet med E-Gel der agarosegel er produsert med standardiserte prosesser. E-Gel måtte brukes for å ekstrahere rett amplikon når PCR amplifikasjon ikke var optimal.

MLST viste at prøve 1 & 6, prøve 4 & 8 og prøve 3 & 7 var parvis identiske. Prøve 2 var den som lignet minst på de andre prøvene. Bruk av *Tajima's test of neutrality* viste en $D < 0$, som tyder på overskudd av lav frekvens polymorfisme i forhold til den verdien av nukleotid mangfold som var forventet. Dette indikerer at det har vært en populasjonsutvidelse, eksempel ved en «populasjonsflaskehals».

Tidligere prøver av samme sekvenstype er funnet i avføring er fra oppdrettsdyr, mennesker, matvarer og fugler, men i tillegg i natur som i skog og på matvarer. De er alle, bortsett fra prøve 2 funnet under rutineundersøkelse for folkehelsen i USA, Europa eller i asiatiske land. Sekvenstype 1060 som prøve 3 og 7 var serotypet til O124:K72 i 2014 som potensielt kan ha en negativ effekt på tarmens barriere og de strukturelle proteinene. Bakterien har evnen til å redusere mucinutskillelsen, spesielt mucintypen Muc2. Det kan til slutt føre til at bakteriene trenger igjennom den intestinale barrieren og dermed føre til sykdom ([21](#)). Den er også blitt typet til K-12 DH10B, som blir brukt til eksperiment av gen kloning.

Prøve 4 og 8 har sekvenstype 401 og var serotypet i 2016 til O36:H35, som er en *avian pathogenic E. coli*, eller APEC. Denne infeksjonen øker dødeligheten til fjærkre, og spesielt utsatt er kyllinger. Dette kan gi systemisk infeksjon ([22](#)).

Sekvenstype 5748 som prøve 5 var har blitt serotypet i 1976 til å være O149:H9. Det er ikke mulig å konkludere hvor patogen serotypen er, siden det ikke finnes tilstrekkelig litteratur på nøyaktig denne serotypen. Tradisjonelt sett er O:H serotyping av overflate antigener på *E. coli* fundamentet i diagnostikk av patogene *E. coli* stammer. Serotypene O124:K72, O36:H35

og O149:H9 har evnen til å indusere en immunrespons.

Sekvenstype 5748 som ble serotypet i 1976 har også blitt funnet i USA de siste årene i tett skog og våtmarker, totalt sekvensert 11 ganger. Dette kan tyde på at stammen er nokså prevalent og klarer å overleve relativt bra utenfor et gastrointestinalt system, men ikke er veldig patogen.

Sekvenstype 1060 som prøve 3 og 7 er har derimot blitt sekvensert 234 ganger og er funnet i land som Colombia, Japan, USA og diverse europeiske land.

Sekvenstype 401 har blitt sekvensert 59 ganger og funnet i de samme reservoarene som de andre, men i tillegg har den også blitt funnet i kloakk. Sekvenstypen er funnet tidligere i USA, Europa og Tanzania.

Sekvenstype 6691 er tidligere funnet i USA i avføring fra okse og i edelløvskog.

Prøve 2 er unik siden det er en ny type *E. coli* som ikke er sekvensert før. Fem av de sju husholdningsgenene er til å ukjente alleler, og de to siste har ufullkomne treff. Nærmeste sekvenstype gitt er 9025, som er uthentet fra sediment i Hong Kong. Ut ifra det fylogenetiske treet ser man at det er stor genetisk drift mellom prøve 2 og de andre prøvene som ble analysert, men det viser at de fortsatt har en felles stamfar langt tilbake i tid. En mulighet kan være at dette ikke er *E. coli*, men en annen lignende bakterie i Enterobacteriaceae familien. Eksempelvis har genomet til *Citrobacter* og *Salmonella* mange likheter med genomet til *E. coli*. Denne prøven kunne vært interessant å utføre helgenomssekvensering eller serotyping på.

Siden det er funnet *E. coli* i Brusdalsvatnet kan det tyde på at vannet ble kontaminert av feces fra enten mennesker eller dyr. Det er ikke usannsynlig at dyr som er i nærheten av vannet kan forurense vannet via avføring. Det er mange husstander rett ved kanten av vannet flere plasser, spesielt nordsiden er det både hus og gårdsdrift. Blant sekvenserte prøver på Enterobase med samme sekvenstype er det flere som er resistente mot antibiotika og noen av de samme sekvenstypene er såkalte Extended spectrum betalactamase (ESBL) produsenter. Det har tidligere blitt funnet *E. coli* med CTX-M-15 genen som gir resistans mot Cefotaksim og fosA-3 genen som gir resistans mot fosfomycin av samme sekvenstype som prøve 4 og 8. Prøve 3 og 7 sin sekvenstype uttrykker ST 10 komplekset, som tidligere har vist seg å være CTX-M-15 produserende *E. coli*. Begge er tidligere blitt funnet i kloakk og vann, og mye av

de aktive komponentene til antibiotika utskilles igjennom avføring hos pattedyr. Hvis dyr som beiter rundt om vannet får antibiotika kan det forklare hvorfor noen av stammene kan potensielt være antibiotika resistent.

En mer seriøs årsak kan være en lekkasje fra kloakksystemet til vannet. Dette er uvisst, men om det er grunnen til de ulike *E. coli* sekvenstypene med resistens-gen må det tas veldig seriøst og utrettes videre.

Det må også merkes at fylogeni utledet fra MLST ikke fullstendig kan representere genomisk fylogeni. På grunn av at MLST bare bruker 7 gener, inneholder det mye mindre sekvensinformasjon enn helgenomsekvensering. Ettersom helgenomsekvensering bare blir billigere for hvert år, kan det etter hvert i fremtiden bli en bedre metode for å studere mikroevolusjon i en art. Selv om MLST har vist seg å være høyst atskillende mellom stammer og derfor relativt nyttig for undersøkelser av utbrudd og overvåkning av infeksjoner, viser tidligere studier at klyngeanalyser av bakteriestammer og bruk av MLST trær ikke alltid representerer artens ekte fylogeni og må derfor tolkes med omhu([23](#)).

6. Konklusjon

I oppgaven var målet å genotype prøvene som var ekstrahert fra Brusdalsvatnet med MLST. Av de ulike sekvenstypene var prøve 2 ukjent i Enterobase. De 7 andre prøvene har tidligere blitt sekvensert og hadde dermed kjent sekvenstype. Prøve 3,4,5,7 og 8 er tidligere serotypet og har mulighet for å være patogen. Prøve 1 og 7 er mest sannsynlig ikke patogener for mennesker og kan finnes som normalflora hos pattedyr. Siden prøve 2 ikke er sekvensert før er det vanskelig å gi en konklusjon på om den er patogen for mennesker uten videre analysering av prøven.

Det er vanskelig å si helt presis hvor de ulike *E. coli* stammene har opphav fra, men det er mest sannsynlig fra kontaminasjon og forurensing fra dyr og mennesker i nærheten.

I denne oppgaven ble det ikke sett på konsentrasjonen av *E. coli* i vann, bare hvilke typer det var. Man kan dermed ikke si i hvilken grad vannet er forurenset, bare at det mest sannsynlig kommer fra fekal kontaminasjon. Videre forskning burde undersøke hvor kontaminasjonen kommer ifra, hva konsentrasjonen av *E. coli* og andre koliforme bakterier i Brusdalsvatnet er, og hvilke andre typer *E. coli* som eventuelt finnes i vannet. Fullgenomsekvensering og serotyping av prøve 2, som er en ukjent *E. coli* type kan også være av interesse for videre forskning.

7. Referanser

1. Conway T, Cohen PS. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr*. 2015;3(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185077>.
2. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123-40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040260>.
3. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):142-201. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457432>.
4. Kaper JB, Nataro JP. Diarrheagenic *Escherichia coli*. American Society for Microbiology,; 1998. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=121379_cm0180008003.jpg
5. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(3):382-403. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16594963>.
6. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. In: Dobrindt U, Hacker JH, Svanborg C, editors. *Between Pathogenicity and Commensalism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 3-32. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F82_2012_303
7. Kaplan ES, Karahan AG. The determination of *E. coli* levels and pathotypes in water sources around Isparta province Turkey. *Environ Monit Assess*. 2018;190(11):653. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30338386>.
8. Paruch L, Paruch AM, Buseth Blankenberg A-G, Bechmann M, Mæhlum T. Application of host-specific genetic markers for microbial source tracking of faecal water contamination in an agricultural catchment. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*. 2015;65(sup2):164-72. Available from: <https://doi.org/10.1080/09064710.2014.941392>.
9. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J*. 2011;5(2):173-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574458>.

10. Lange B, Strathmann M, Ossmer R. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Lett Appl Microbiol*. 2013;57(6):547-53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23952651>.
11. Maiden M. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual review of microbiology*. 2006 60. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>.
12. Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T, et al. Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):1076-80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199778>.
13. Tronsmo A. Klassifisering av mikroorganismer In: Bærheim J, editor. INNFØRING I MIKROBIOLOGI. Sehesteds gate 3 0164 Oslo: Universitetsforlaget 2016. p. 164-5.
14. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399825>.
15. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012(62). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546956>.
16. Thermo Fisher Scientific. E-Gel® Technical Guide 2014 [Available from: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/egelguide_man.pdf?fbclid=IwAR2Rbx-1tLwziSCgjtYgG30fXyxK3HHD_wmYGYcHRs0VUOITsHpGj0BdcYg#page=62&zoom=100,0,66].
17. Invitrogen. SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain -, Molecular Probes: Thermo Fisher Scientific; 2006 [Available from: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp11494.pdf?fbclid=IwAR0ArsYI7gxanV9jeXbzYv1VLRrBP3xgtWtAKIkFIFCJR3CLaj5enSXUKso>].
18. Alikhan N-F, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLOS Genetics*. 2018;14(4):e1007261. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007261>.
19. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29722887>.
20. Momeni SS, Whiddon J, Cheon K, Moser SA, Childers NK. Assessment of two multilocus sequence typing (MLST) schemes available for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2015;60(12):1769-76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26439181>.

21. Ren X, Zhu Y, Gamallat Y, Ma S, Chiwala G, Meyiah A, et al. E. coli O124 K72 alters the intestinal barrier and the tight junctions proteins of guinea pig intestine. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:468-73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28779708>.
22. Antao EM, Glodde S, Li G, Sharifi R, Homeier T, Laturus C, et al. The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microb Pathog.* 2008;45(5-6):361-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848980>.
23. Tsang AKL, Lee HH, Yiu S-M, Lau SKP, Woo PCY. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. *Scientific Reports.* 2017;7(1):4536. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04707-4>.

Vedlegg

Bakgrunnsinformasjon

Prøvene måtte kultiveres på nytt grunnet vanskeligheter med å skille kolonier på CCA skålene (overvekst tett vekst.) Skålene ble oppbevart kjølig over lengre tid.

Prøvene skulle inneholde diverse stammer *E. coli*, de måtte håndteres med forsiktighet grunnet potensiell infeksjonsfare.

- Inokulasjonsøse.
- CCA fungerte som en kvalitetskontroll i dette forsøket.
- Geleelektroforese fungerte også som en kvalitetskontroll.

Ved å gi en bakterier de rette vekstvilkår, næring og rett fysikalsk miljø, vil bakteriene kunne vokse og formere seg. Dyrking kan gjøres ved å så ut eller tilføre bakterier på et vekstmedium som inneholder de rette substansene for det man ønsker å dyrke.

Flytende medium - Bakterier kan formere seg fritt, bakdel er at det kan vokse mer en art.

CCA - Kromogen Coliform agar - Selektivt kromogen agarmedie for deteksjon og telling av *E. coli* og andre koliforme bakterier i vann.

- Bruk en steril øse til å ta en koloni over i det flytende mediet, beveg øsen forsiktig fram og tilbake for å tilføre hele kolonien.
- Drypp en dråpe fra det flytende mediet på den kromogene skålen. Bruk sterilt utstyr.
- La skålen inkubere 18-24 timer i 35 grader celsius $+2\text{ C}$.

Vedlegg 1A: Dyrking/kultivering av prøver

Hensikt

Hensikt med prosedyre er å sikre rett gjennomføring av dyrking/kultivering av *E. coli* prøvene.

Bakgrunnsinformasjon

Prøvene måtte kultiveres på nytt grunnet vanskeligheter med å skille kolonier på CCA skålene (overvekst tett vekst.) Skålene ble oppbevart kjølig over lengre tid.

Prøvene skulle inneholde diverse stammer *E. coli*, de måtte håndteres med forsiktighet grunnet potensiell infeksjonsfare.

Utstyr og reagens

- Kromogen Coliform Agar (CCA).
- Flytende medium (Nutrient broth).
- Inokulasjonsøse.
- Inkubator.
- Pipette.
- Bunsenbrenner.
- Sprit til desinfeksjon.
- Autoklave.

Kvalitetskontroll

- CCA fungerte som en kvalitetskontroll i dette forsøket.
- Geleelektroforese fungerte også som en kvalitetskontroll.

Prinsipp for dyrkning

Ved å gi en bakterier de rette vekstvilkår, næring og rett fysikalsk miljø, vil bakteriene kunne vokse og formere seg. Dyrking kan gjøres ved å så ut eller tilføre bakterier på et vekstmedium som inneholder de rette substansene for det man ønsker å dyrke.

Flytende medium - Bakterier kan formere seg fritt, bakdel er at det kan vokse mer en art.

CCA - Kromogen Coliform agar - Selektivt kromogen agarmedie for deteksjon og telling av *E. coli* og andre koliforme bakterier i vann.

Analyseprinsipp

kromogene skåler utnytter forskjellige enzymer som ulike bakterier har.

koliforme bakterier inneholder et enzym kalt D-galaktosidase, som kløyver salmon GAL. Dette gir en fargeforandring på skålen. *E. coli* inneholder også D-glucuronidase, som kløyver kromogent X-glucuronide. Det er dette som *E. coli* sin karakteristiske mørk blå/fiolett farge.

Fremgangsmåte

Fra CCA → Flytende medium

- NB! Utfør alle steg i Lafbenk.
- Sørg for at utstyret er autoklavert og sterilt.
- Tilsett næringsmediumet til kolben som skal brukes.

- Bruk en steril øse til å ta en koloni over i det flytende mediet, beveg øsen forsiktig fram og tilbake for å tilføre hele kolonien.
- Inkuber 24-48 timer 35 \pm 2 grader celsius.

Fra flytende medium til CCA

- Drypp en dråpe fra det flytende mediet på den kromogene skålen. Bruk sterilt utstyr.
- Så ut på hele skålen.
- La skålen inkubere 18-24 timer i 35 grader celsius \pm 2 C.

Forholdsregler i forbindelse med behandling av potensielt patogene mikroorganismer:

- Ha en ren og skitten sone, og oppretthold sonene.
- Arbeid aseptisk.
- Vær påpasselig med hygiene og desinfisering.
- Håndtere avfall korrekt.
- Bruk hansker i LAFbenk.
- Oppretthold sikkerhet i laboratoriet.
- Autoklaver alt som ikke er engangsutstyr.

Feilkilder

- Feilmerking av prøver.
- Mangel på bruk av aseptisk teknikk.
- Andre bakterier kan i noen tilfeller vokse i symbiose med *E. coli* selv på CCA.

Vedlegg 1B – Koliform kromogen agar



Reference: 175452ZA Technical Data Sheet
 Product: CCA COLIFORMS CHROMOGENIC AGAR (ISO)

Specification

Solid, selective and differential culture medium for the detection and enumeration of total coliform and *E. coli* in water samples by the membrane-filtration technique acc. to ISO.

Presentation

	Packaging Details	Shelf Life	Storage
30 Prepared Plates 55 mm Plates for filtration purposes with: 9 ± 1 ml	1 box containing 3 plastic bags with 3 RD-PACK. Each package contains 10 plates of 55 mm.	5 months	2-25°C

Composition

Composition (g/l):	
Enzymatic digest of casein.....	1.00
Yeast extract.....	2.00
Sodium chloride.....	5.00
Di-sodium hydrogen phosphate.....	2.70
Sodium dihydrogen phosphate dihydrate.....	2.20
Tryptophan.....	1.00
Sodium pyruvate.....	1.00
Tergitol® 7.....	0.15
Sorbitol.....	1.00
6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside.....	0.20
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronic acid.....	0.10
IPTG.....	0.10
Agar.....	13.00

Description /Technique

Description

The combined action of peptone, pyruvate and sorbitol allow rapid colony growth in this phosphate buffered medium, which also permits simple recovery of sublethal thermally injured coliforms. Sodium chloride provides the correct osmotic environment necessary for growth. The selectivity is attained, partially, by the Tergitol® 7, which inhibits the growth of Gram positive bacteria and some Gram negative without effecting the coliform bacteria. The culture medium was formulated without antibiotics for water samples with low bacterial background flora. The colonial differentiation is due to the chromogenic mixture, composed of two enzyme substrates: 6-chloro-3-indoxyl-β-D-galacto-pyranoside (Salmon[®]-GAL) and 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronide (X-Glucuronide). The first one is cleaved by the characteristic enzyme found in coliforms, β-D-galactosidase and gives a salmon-red colour to the coliform colonies. The second chromogenic substance is cleaved by the β-D-glucuronidase enzyme characteristic of *E. coli* and turns the colonies of these bacteria a blue colour. *E. coli* has the two enzymes and cleaves both chromogenic substances giving dark blue to violet colonies. Total coliforms are the sum of *E. coli* colonies plus salmon-red colonies. The IPTG enhances the metabolism of chromogenics. Other Gram negative bacteria produce colourless colonies except some that possess glucuronidase activity (but not galactosidase) and they produce light blue to turquoise colonies. To confirm the *E. coli* colonies in this medium a small amount of tryptophane is included verifying indol production: coat the blue-violet colonies with a drop of Kovacs Reagent. If the reagent turns a cherry-red colour in a few seconds this confirms the production of indol and hence the presence of *E. coli*.

When the Chromogenic Agar for Coliform is used with the membrane filter method, the colour and growth of the colonies can be modified by the characteristics of the membrane filter. It is advisable to perform validation of the membrane filter type used.

Limitation of the procedure:

The production of β-galactosidase, although common to all the coliforms, varies from one strain to another being influenced by the temperature and incubation time. At temperatures above 37 ° C its production decreases, causing a loss of reddish color intensity, while the bluish tones in the strains of *Escherichia coli* are accentuated.

If the membrane filtration method is used, it must be taken into account that the nature and characteristics of the filter membrane used also influences the size and color of the colonies grown on this culture medium.

Technique The technique of inoculation used in these plates is the membrane filtration technique (MF) according to the various harmonized pharmacopoeias and applicable ISO norms. The water sample is filtered through a membrane filter of 0,45 μm of pore diameter validated according to the ISO Standard 7704:1985. The membrane is then placed on the surface of the CCA medium avoiding entrapment of air bubbles between the membrane and agar surface. The petri dish with the membrane is incubated for 18-24 hours at 36 ± 2°C. If in 18 h there is growth of red or colourless colonies, extend the incubation until 24 h to include late reactions of β-galactosidase or β-glucuronidase. Count β-galactosidase positive colonies and β-glucuronidase negative colonies (all colonies coloured from salmon-rose to red) as Coliform bacteria not-*E. coli*. Count β-galactosidase positive colonies and β-glucuronidase positive colonies (all colonies coloured from deep blue to violet) as *E. coli*.

Total Coliform count is obtained by the addition of the salmon-rose to red colonies plus the deep blue to violet colonies. Calculate the concentration of Coliform bacteria and *E. coli* in 100 mL from the initial volume of water filtered and the number of characteristic colonies counted on the membrane. The results are expressed as Colony Forming Units per millilitre (CFU/mL).



Reference: 175452ZA

Technical Data Sheet

Product: CCA COLIFORMS CHROMOGENIC AGAR (ISO)

Quality control

Physical/Chemical control

Color : Pale yellow pH: 6.8 ± 0.2 at 25°C

Microbiological control

Inoculate: Practical range 100±20 CFU; Min. 50 CFU (Productivity).

Microbiological control according to ISO 11133:2014

Aerobiosis. Incubation at 36 ± 2°C, reading at 18-24 h

Microorganism

Escherichia coli ATCC® 8739, WDCM 00012

Escherichia coli ATCC® 25922, WDCM 00013

Citrobacter freundii ATCC® 43864, WDCM 00006

Ps. aeruginosa ATCC® 10145, WDCM 00024

Enterococcus faecalis ATCC® 19433, WDCM 00009

Enterobacter aerogenes ATCC® 13048, WDCM 00175

Growth

Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies

Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies

Good (≥70%) Salmon to red colonies

Good - Colourless

Inhibited

Good - Mauve

Sterility Control

Incubation 48 hours at 30-35°C and 48 hours at 20-25°C: NO GROWTH

Check at 7 days after incubation in same conditions

Bibliography

- ADAMS, M., R. GRUBB, S.M. HAMER & A. CLIFFORD (1990) Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β-glucuronidase activity. Appl. Environ. Microbiol. 56:2021.
- ISO 7704 Standard (1985) Water Quality - Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses.
- ISO 9308-1: 2014/Amd.1:2016(E) Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- KILIAN, M. & P. BÜLOW (1976) Rapid Diagnostic of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84:245-251.
- ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- MANAFI, M & W. KNEIFEL (1989) A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliform and *E. coli* in water. Zentralbl. Hyg. 189:225-234.
- UNE-EN ISO 11133 (2014). Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua.-Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- TURNER, K.M., L. RESTAINO & E.W. FRAMPTON (2000) Efficacy of Chromocult Coliform Agar for coliform and *Escherichia coli* detection in Foods. J.Food Protect. 63(4):539-541.

Vedlegg 2 DNeasy

Hensikt

Hensikten med DNeasy blood and tissue er å isolere DNAet til *E. coli* prøvene.

Prosedyre

Forhåndsregler:

PBS kreves i steg 1.

Vortex skal utføres ved å puls vortexe i 5-10s.

Forhåndsbehandling for gram-negative staver

1. 3-4 bakteriekolonier ble tilsatt i 180 μ L buffer ATL.
2. Dette ble så tilført 20 μ L Proteinase K.
3. Så ble det inkubert på 56°C i 2 timer.

Viderebehandling:

4. Tilsett 200 μ L buffer AL, vortex godt, inkuber på 72 °C i 10 minutter.
5. Tilsett 200 μ L etanol (96-100%), vortex godt.
6. Pipetter løsning fra steg 3 over til DNeasy mini spin column som er plassert i 2 ml samletube. sentrifuger 1 min på 6000G (8000 RPM) eller mer. kast samletube og 'flow through'.
7. Plasser DNeasy mini spin i en ny 2ml samletube - tilsett 500 μ L buffer AW1, sentrifuger i 1 min på 6000G. Kast samletube og 'flow through'
8. Plasser DNeasy minispinn i en ny 2ml samletube - tilsett 500 μ L buffer AW 2. Sentrifuger på 20 000 G (14000 RPM). Kast samletube og 'Flow through'
9. Plasser DNeasy mini spin kolonna i en ren 1,5 eller 2 ml mikrosentrifuge tube → pipetter 200 μ L buffer AE rett inn i DNeasy membran → inkuber i romtemp i 1 min → Sentrifuger 1 min på 6000G eller mer
10. For max utbytte, gjenta steg 7, 1 gang, men tilfør 40 μ L AE buffer istedenfor 200.

Under lyseringsdel.

- Unngå for stor start materiell, slik at lysering kan skje effektivt.
- Ved gjenstående pellet → Forleng inkubasjonstid på 56 °C, eller øk proteinase K til 40 ul.

Under vaskedel.

- Unngå at etanol blandes ved å ta over i nytt rør og sentrifugere 1 min @13000 RPM.
- Vær sikker på at du tar i AW1 før AW2. AW2 brukes i romtemperatur.

Vedlegg 3: Fremgangsmåte ved tillaging av PCR produkt

Hensikt

Hensikten er å amplifisere de 7 ulike husholdningsgenene. Amplikonene skal kvalitetssikres, deretter bli sekvensert.

Bakgrunnsinformasjon

PCR er en enzymatisk amplifiseringsmetode. PCR gjør at ulike gener kan massekopieres ved hjelp av primere og nukleotider. Metoden er veldig spesifikk så lenge man har rett primere til DNA.

utstyr/reagens

- VWR DNA Polymerase mastermix (1,5mM mgCl₂ - dNTPs - Tris-HCl)
Primere - forward og reverse.
- adk
- fumC
- gyrB
- icd
- mdh
- purA
- recA
- Dobbeldestilert vann/ nukleasefritt vann
- Automatpipette med filterspisser. (0-10 µL, 10-200 µL, 200-100 µL)
- Eppendorfrør med stativ
- PCR strips med stativ og lokk

Analyseprinsipp:

PCR er en termosyklisk reaksjon som skjer i tre steg:

- Denaturering: varmer opp slik at hydrogenbindingene mellom trådene brytes og DNA blir til enkeltråder.
- Annealing: De to ulike primerene festes på hver sin tråd. Primerene er spesifikke for et sted på hver sin tråd.

- Extension: Taq polymerase syntetiserer en ny tråd utifra primeren av frie nukleotider i løsningen. Taq polymerase bruker enkel tråden som mål.

Dette skjer mellom 25-35 ganger slik man får milliarder av amplikon.

Kvalitetskontroll :

Har med positive og negative kontroller i hver kjøring.

Fremgangsmåte:

- Lag mastermix
- Merk alle prøverør med nr og merk kontroller.
- Fordel 20/22 μL til hvert rør.
- tilsett 3 μL templat DNA til hvert rør. Alle rør skal ha templat DNA bortsett fra NEGATIV KONTROLL.
- Tilsett prøve 1 til rør 1, prøve 2 til rør 2 osv.
- Vortex og spinn lett.
- Til negativ kontroll brukes bare master mix for å sjekke om master mixen er kontaminert.

Om prøven ikke skal analyseres med en gang på gelen kan den settes i kjøleskapet på 4 C.

Vedlegg 4: Fremgangsmåte ved tillaging og bruk av Agarose gel farget med GelRed™

Hensikt

Hensikt er å lage en gel som er optimal for separasjon ampliconene for de ulike husholdningsgenene, dette fungerer som en kvalitetskontroll.

Bakgrunnsinformasjon

Gelelektroforese er en av de mest vanlige metodene for å separere DNA. Separasjonsteknikken er avhengig av molekylets størrelse, ladning og form. For DNA vil størrelsen være avgjørende for hvor langt de ulike fragmentene vil vandre. Gelen er av agarose som danner en matriks med små porer som DNA-et kan vandre gjennom. Jo mindre molekylet er jo fortere vil det vandre.

Utstyr/reagens

- Fast agarosepulver
- 1x TAE Buffer
- GelRed™
- Automatpipette med 0-10uL filterspiss
- Mikrobølgeovn
- Loading dye
- Elektroferesekar
- Gelkar
- Kam til å lage brønner med
- UV kamera.

Analyseprinsipp

DNA er negativt og vil vandre mot den positive polen under spenning. Jo større DNA fragmentet er jo mer friksjon vil det danne og dermed vandre mindre. Fragmentene vil danne et amplicon som kan tolkes og si hvor mange basepar fragmentet har.

Gelen er tilsatt Gelred, som festes til DNA og vil gjøre bandene som dannes synlige under UV lys.

Framgangsmåte

1. Bland 1,8g Agarose med 80 mL 1x TAE buffer i en 500 mL erlenmeyerkolbe.
2. Kok så blanding på full effekt i 2-3 minutt i mikrobølgeovn.
3. Ta ut av mikrobølgeovn. Rør og sjekk at alt agarose er oppløst. Vær obs på at løsning kan sprutkoke ved omrøring.
4. Tilsett 2 μ L Gelred til løsning.
5. Rør om, fordel fargestoff likt i væske.
6. Kjøøl ned.
7. Legg autoklave teip rundt sidene på gel.
8. Overfør agarosegel til gelkar og sett i kammer \rightarrow La stivne.
9. Tilsett TAE buffer til gelkar slik den dekker hele agarosegelen.
10. Tilsett 3 μ L prøve til brønnene.
11. Sett på spenning 50V i 5 Min.
12. Øk spenning til 100V i 45 Min.
13. Overfør fra elektroforesekar til UV lampe.
14. Ta vare på bilder og tolk resultat.

Vedlegg 5

Chemidoc imaging system

Følgende protokoll ble brukt:

1. New protocol --> New single channel
2. Trykk på application fanen --> Select --> nucleic acid --> Gelred
3. Enter image area = 15.0 x 11.2
4. Software will automatically optimize the exposure time for "faint band's" ble mest brukt, men også "intense" dersom det ga klarere bilde.
5. Highlight saturated pixel's var haket av i begynnelsen, men fjernet det etter hvert, siden det egentlig bare var i veien.
6. Nederste skuff av instrument ble så åpnet --> Gel ble plassert omtrent i midten --> skuffe ble lukket.
7. Trykte så "position gel" --> åpnet "instrumentdør" og plasserte gel i midten av alignment grid.
8. Trykk 'run protocol'.
9. Juster bildets high, low og gamma for best mulig observasjon.
10. Screenshot bildet med screenshot knapp og lagre bildets rådata med save knapp.

Vedlegg 6 E-Gel

Hensikt

E-Gel brukes til å isolere målamplikon under dårlig optimalisert PCR analyse eller ved fragmentert DNA separasjon.

Bakgrunnsinformasjon

E-Gel Size Select 2% agarose er ferdig støpt agarosegel med elektroder og molekylære DNA prober som er klar til bruk. Gelen er pakket inn i en UV-transparent kassett som beskytter det, og tillater observasjon av amplikon i sanntid. Man unngår tillaging av buffer, støping av gel, tilsetning av probe/fargestoff og de ulike manuelle stegene som man utfører under konvensjonell tillaging av agarosegel. Gel er klar til bruk slik den er, man trenger kun å tilsette prøvemateriale og deionisert vann. Hovedformålet med *E-Gel size select 2% agarose* er ekstraksjon/purifikasjon av DNA som skal sekvenseres. Resolusjon mellom 50bp –1kbp.

E-Gel® IBase™ Power System er et automatisert, programmerbart og letthåndterlig instrument som simplifiserer elektroforese, systemet er designet for bruk av tilhørende ferdigstøpt agarosegel som *E-Gel Size Select 2% agarose*. Instrumentet fungerer både som base for gel elektroforesen og som strømforsyning.

Bakgrunnsinformasjon er hentet fra Thermo Fisher sin E-Gel manual. Tilgjengelig på:

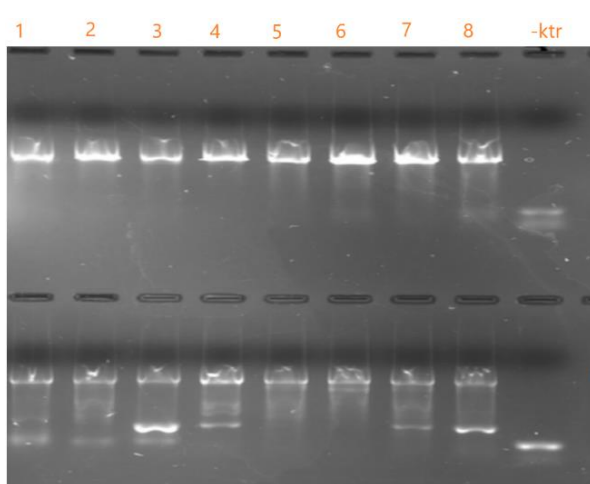
1. Bruk samme prøvemengde i alle prøvebrønner, bruk deionisert vann i tomme brønner.
2. Tilsett 500-700 ng prøve; 50-200 ng DNA per bånd mer, 20-400ng er akseptabelt men kan kreve to fraksjoner.
3. Tilsett 20-25 μ L prøvevolum til hver brønn, mindre kan føre til dårlige DNA fragment.
4. DNA prøver kan forberedes i de-ionisert vann, men helst loading buffer.
5. fortynn prøver dersom de har høge saltnivå.

Loading av E-Gel

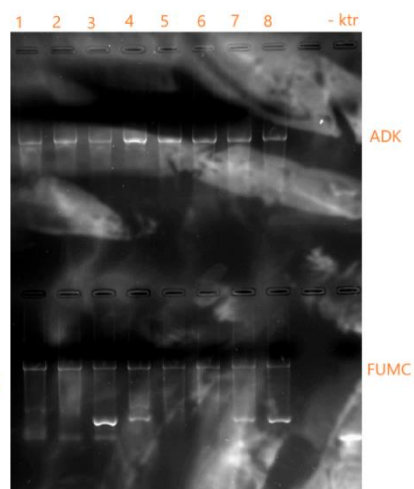
1. Plug inn *ibase* instrument.
2. Ta gel ut av pakke og fjern kammer.
3. Plasser *E-Gel base* over instrument. Bruk oransje briller eller *amber cover* over brønner for å se DNA fragment/amplikon.
4. Velg \rightarrow Run CloneWell \rightarrow Skriv inn estimert "run time to reference line" i Run Time table \rightarrow Trykk "Go" på Ibase instrument.
5. Følg med på gel regelmessig, trykk go igjen når båndet du er interessert i har migrert til referanselinjen.
6. Når båndet når referanselinjen tilsetter du sterilt vann for å fylle de nederste brønnene.
7. Trykk "go" og kjør gel

Vedlegg 7: Bilder av Agarosegel og E-Gel

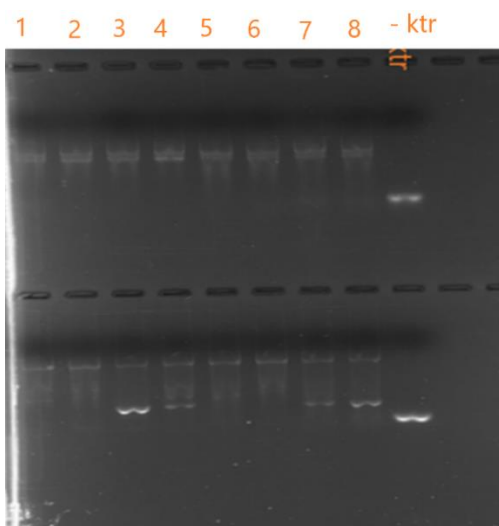
Tilleggsinformasjon: Når ikke annet er oppgitt er annealing temperatur 56°C brukt og det er kjørt 35 PCR sykluser. I analyse 0-3 er mastermix oppskrift 1 brukt. I analyse 3-10 er mastermix oppskrift 2 brukt.



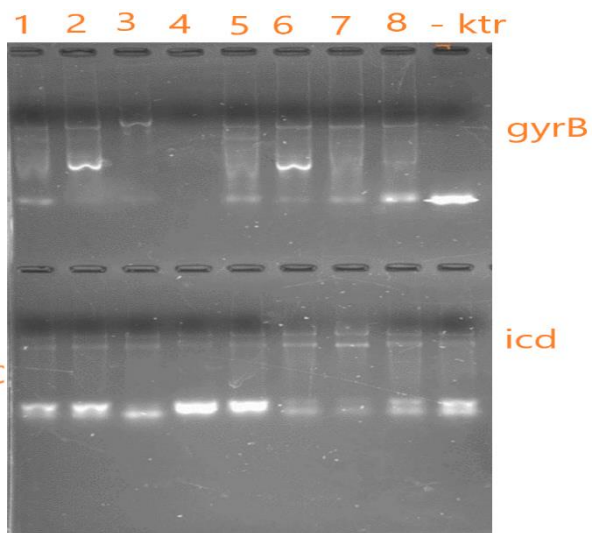
Bilde 3 (mastermix 1, annealing 56°C, analyse 2)



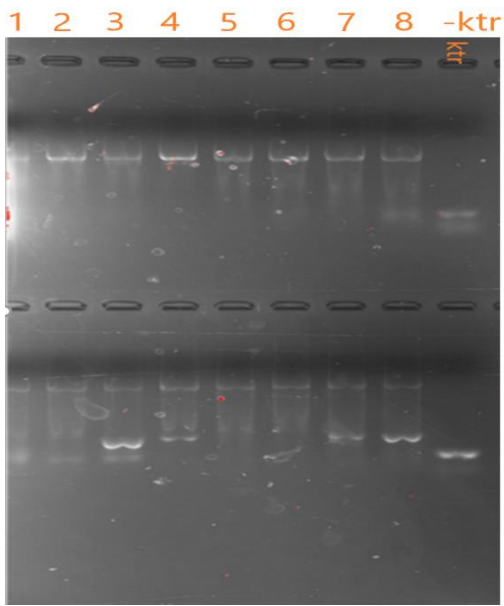
Bilde 4 (analyse 2, kvalitetskontroll adk og fumC)



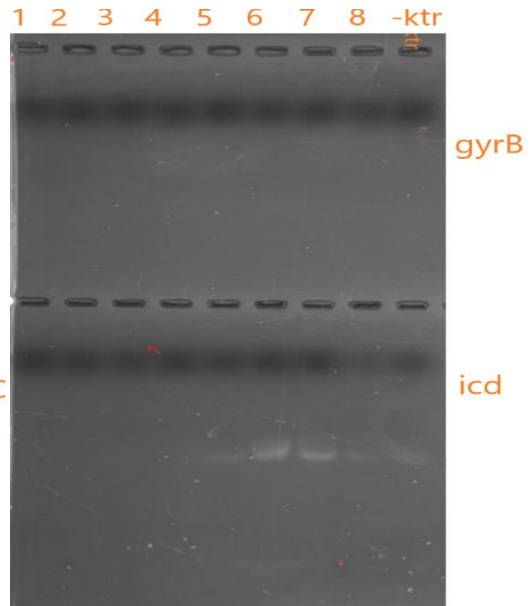
Bilde 5 -analyse 0



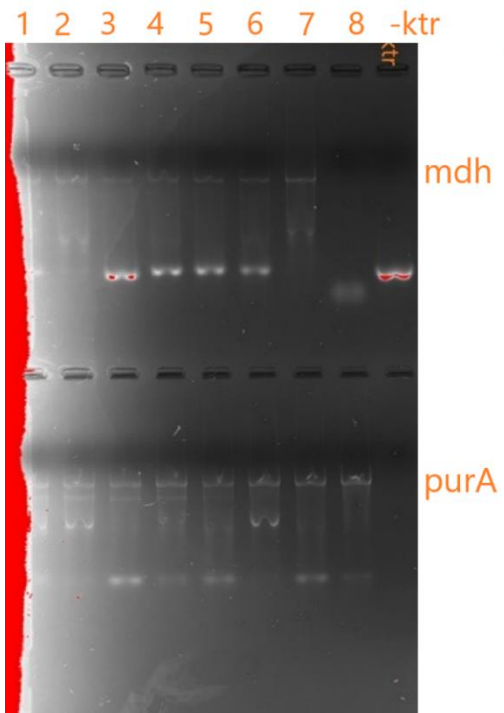
Bilde 6 - analyse 0



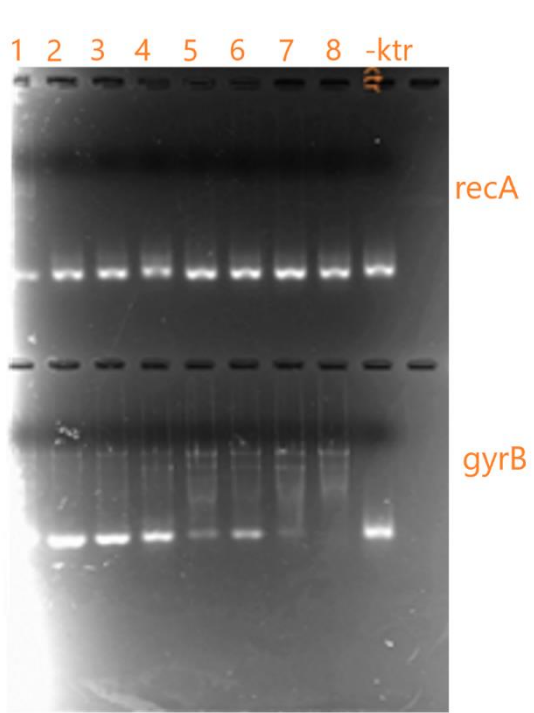
Bilde 7 (annealing 58°C analyse 1)



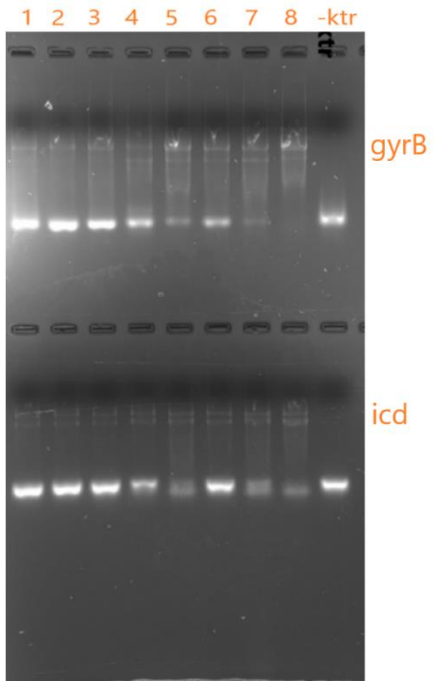
Bilde 8 (annealing 58°C analyse 1)



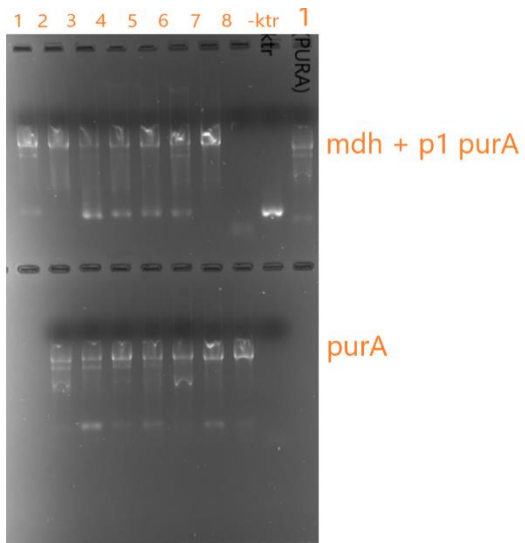
Bilde 9 (annealing 58°C analyse 1)



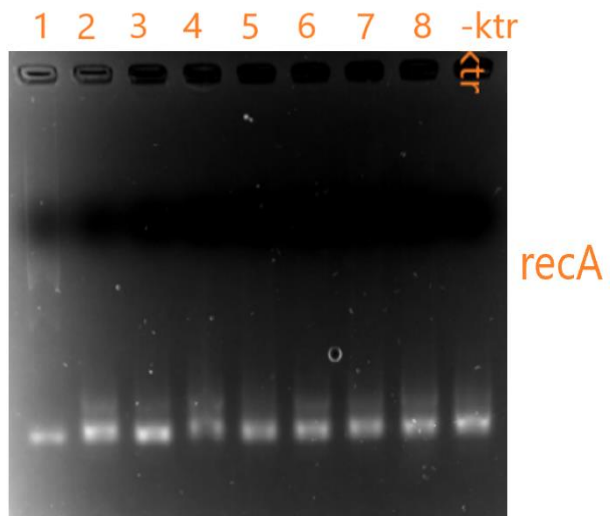
Bilde 10 (annealing 58°C analyse 1)



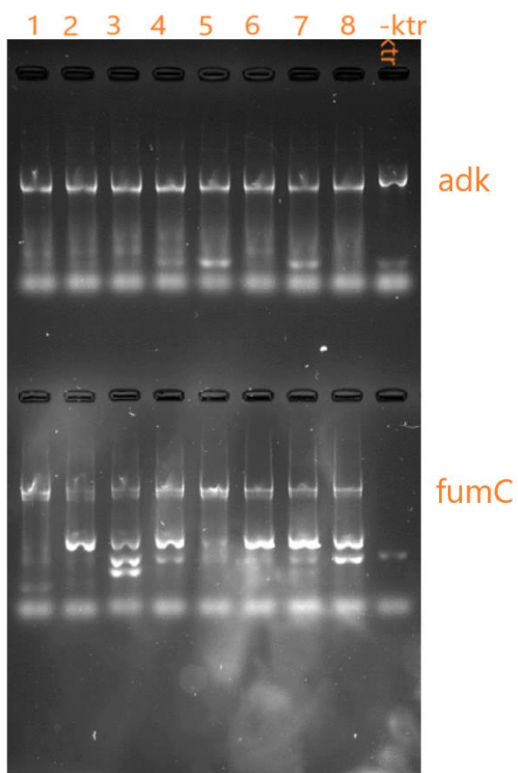
Bilde 11 - analyse 2



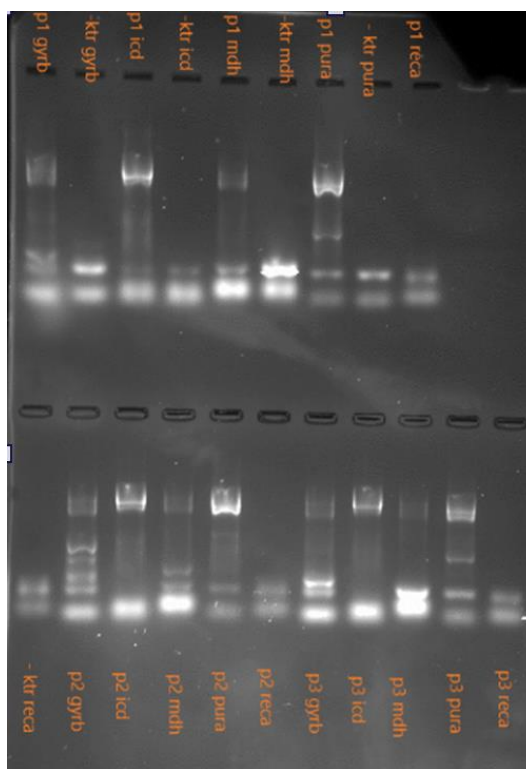
Bilde 12 - analyse 2



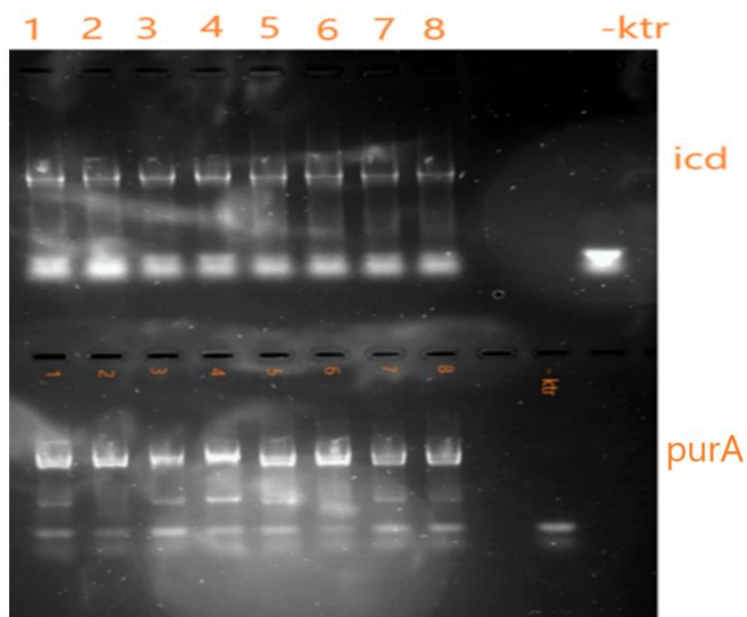
Bilde 13 - analyse 2



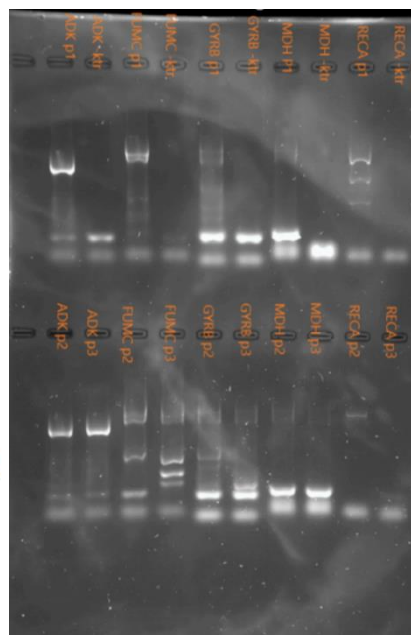
Bilde 14 - analyse 3



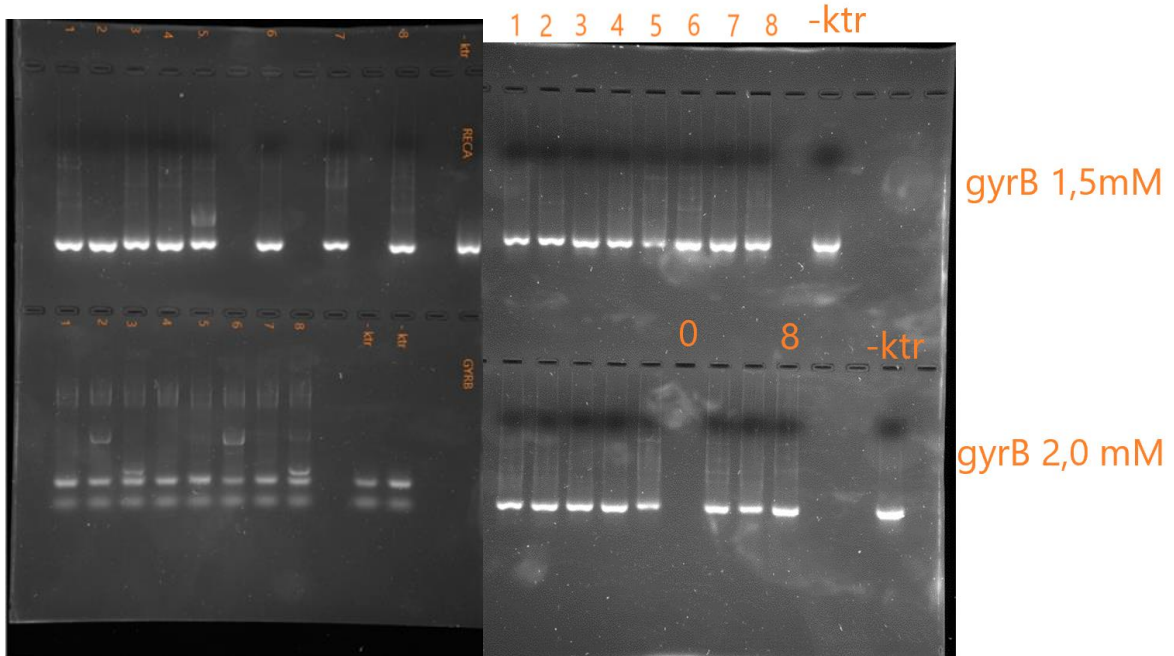
Bilde 15 - analyse 3



Bilde 16 (kvalitetskontroll for PURA og ICD analyse 3)

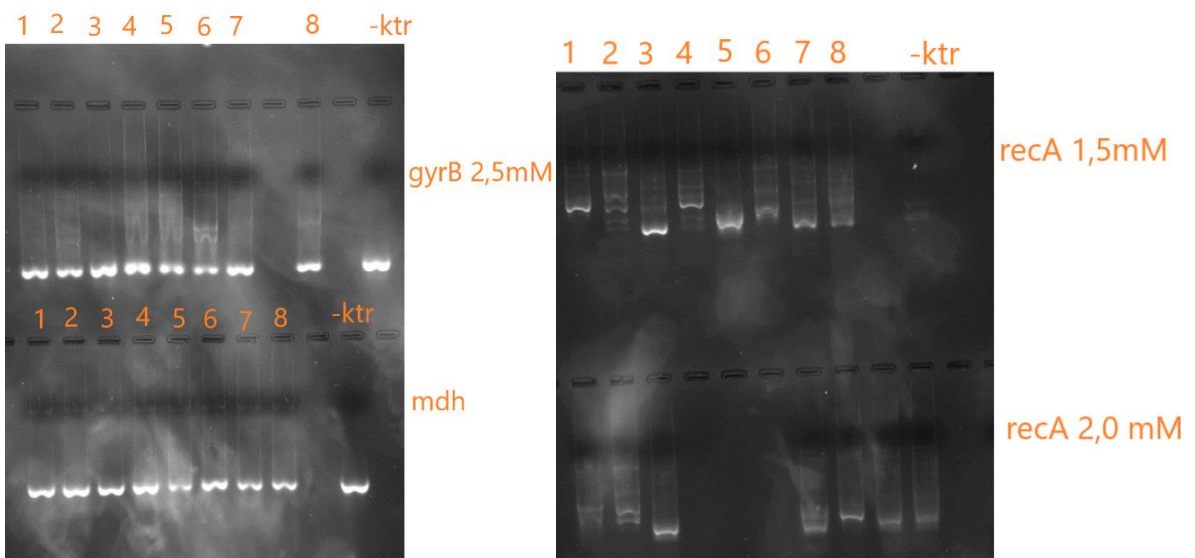


Bilde 17 - analyse 4



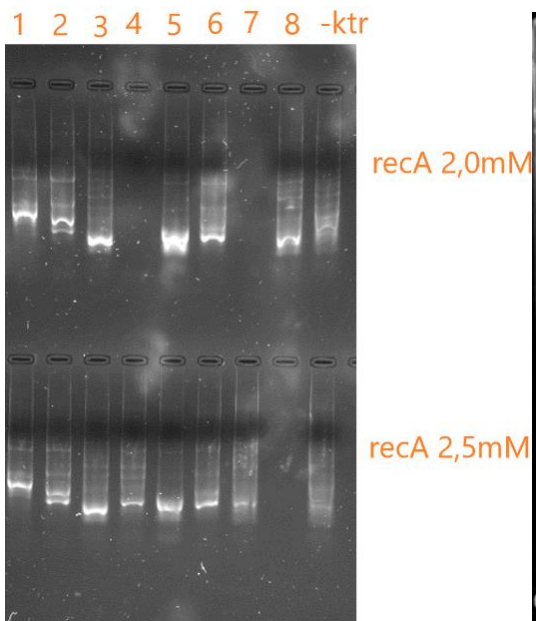
Bilde 18 - analyse 5

Bilde 19 (analyse 6 annealing 58°C)

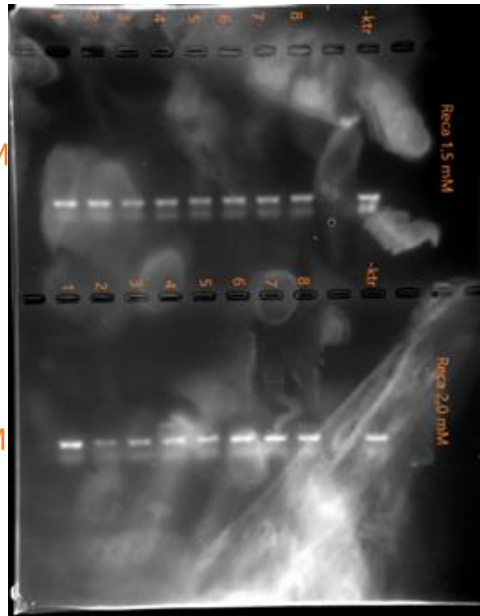


Bilde 20 (analyse 6)

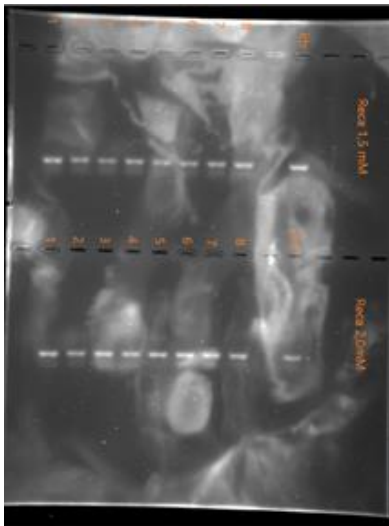
Bilde 21 (analyse 6)



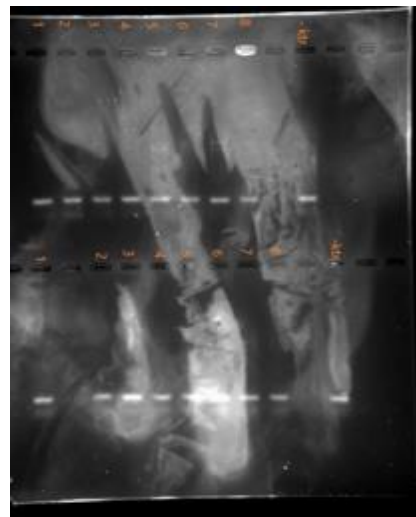
Bilde 22 - analyse 6



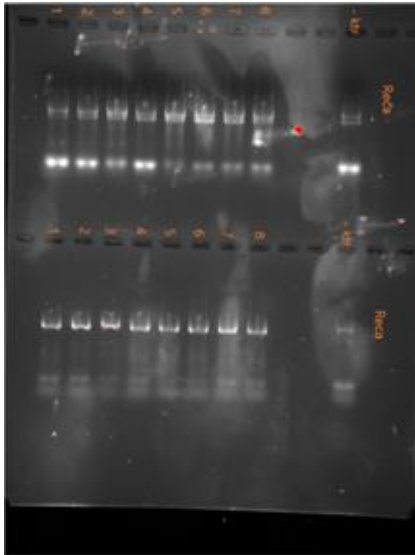
Bilde 23 -analyse 7



Bilde 24 (analyse 8, annealing 58°C).



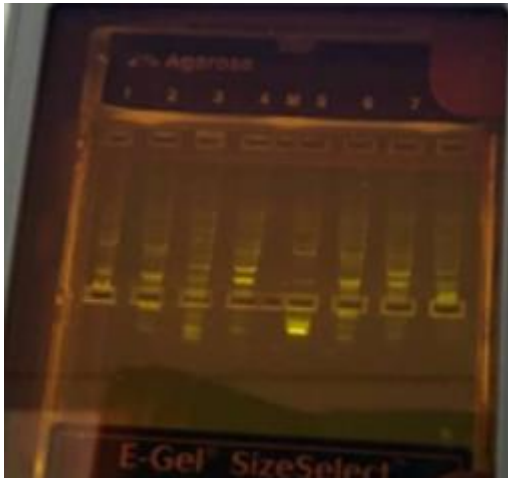
Bilde 25 recA 2,5mM MgCl₂ topp = 56°C annealing. Bunn = 58°C - analyse 8



Bilde 26 (topp = analyse 9 recA, 1,5mM, vwr mastermix.)
(bunn = analyse 9 recA, 1,5mM, goldstar 2x mastermix)



Bilde 27 (gyrB amplicon fra analyse 5, bildet tatt er ca 12 min, hentet ut fra E-Gel etter ca 30 min)



Bilde 28 (recA amplikon fra analyse 6)



Bilde 29 (recA fra analyse 4)

Vedlegg 8

Tabell 8: Viser resultat for prøver som ble sendt til Tyskland. += Gen påvist. -= Gen ikke påvist.

	ADK	FUMC	GYRB	ICD	MDH	PURA	RECA
Prøve 1	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 2	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 3	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 4	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 5	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 6	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 7	+	+	+	+	+	+	+
Prøve 8	+	+	+	+	+	+	+

Vedlegg 9 MLST resultat

Tabell 9: Prøve 1

Sequence Type: 6691

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_137
fumC	100	100	469	469	0	fumC_4
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_5
icd	100	100	518	518	0	icd_26
mdh	100	100	452	452	0	mdh_7
purA	100	100	478	478	0	purA_13
recA	100	100	510	510	0	recA_6

Tabell 10: Prøve 2

Nearest ST: 9205

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	71.46	73.13	504	536	112	adk_888?*
fumC	98.72	100	469	469	0	fumC_721*
gyrB	99.78	100	460	460	0	gyrB_796*
icd	85.52	86.49	448	518	1	icd_1027?*
mdh	99.78	100	452	452	0	mdh_797*
purA	99.37	100	478	478	0	purA_147*
recA	99.41	100	510	510	0	recA_659*

Notes: *? alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

- * **recA**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.
- ?* **adk**: Imperfect hit, ST can not be trusted!
- * **purA**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.
- * **fumC**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.
- * **mdh**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.
- * **gyrB**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.
- ?* **icd**: Imperfect hit, ST can not be trusted!

Tabell 11: Prøve 3

Sequence Type: 1060

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_10
fumC	100	100	469	469	0	fumC_11
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_4
icd	100	100	518	518	0	icd_8
mdh	100	100	452	452	0	mdh_8
purA	100	100	478	478	0	purA_8
recA	100	100	510	510	0	recA_128

Tabell 12: Prøve 4

Sequence Type: 401

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_1
fumC	100	100	469	469	0	fumC_107
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_7
icd	100	100	518	518	0	icd_11
mdh	100	100	452	452	0	mdh_7
purA	100	100	478	478	0	purA_3
recA	100	100	510	510	0	recA_7

Tabell 13: Prøve 5

Sequence Type: 5748

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_35
fumC	100	100	469	469	0	fumC_50
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_22
icd	100	100	518	518	0	icd_49
mdh	100	100	452	452	0	mdh_37
purA	100	100	478	478	0	purA_41
recA	100	100	510	510	0	recA_191

Tabell 14: Prøve 6

Sequence Type: 6691

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_137
fumC	100	100	469	469	0	fumC_4
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_5
icd	100	100	518	518	0	icd_26
mdh	100	100	452	452	0	mdh_7
purA	100	100	478	478	0	purA_13
recA	100	100	510	510	0	recA_6

Tabell 15: Prøve 7

Sequence Type: 1060

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_10
fumC	100	100	469	469	0	fumC_11
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_4
icd	100	100	518	518	0	icd_8
mdh	100	100	452	452	0	mdh_8
purA	100	100	478	478	0	purA_8
recA	100	100	510	510	0	recA_128

Tabell 16: Prøve 8

Sequence Type: 401

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
adk	100	100	536	536	0	adk_1
fumC	100	100	469	469	0	fumC_107
gyrB	100	100	460	460	0	gyrB_7
icd	100	100	518	518	0	icd_11
mdh	100	100	452	452	0	mdh_7
purA	100	100	478	478	0	purA_3
recA	100	100	510	510	0	recA_7

