

# Bacheloroppgave

**Emnekode: BI301305 og Emnenavn: Bacheloroppgave**

**Tittel: Metodeutvikling og påvisning av**

**Paranucleospora theridion, Neoparamoeba species og  
Neoparmoeba perurans ved bruk av real-time PCR og  
konvensjonell PCR.**

**Kandidatnummer 6, 8 og 9**

**Totalt antall sider inkludert forsiden: 53**

**Innlevert Ålesund, 28.05.2015**

## 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"><li>• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.</li><li>• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.</li><li>• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.</li></ul>	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å betrakte som fusk og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. <a href="#">Universitets- og høgskoleloven</a> §§4-7 og 4-8 og <a href="#">Forskrift om eksamen</a> §§30 og 31.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se <a href="#">Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver</a>	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter <a href="#">høgskolens studieforskrift</a> §30	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av <a href="#">kilder og referanser på biblioteket sine nettsider</a>	<input checked="" type="checkbox"/>

# Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veileder: Ann-Kristin Tveten og Helene Børretzen Fjørtoft

## 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 HiÅ med forfatter(ne)s godkjenning.

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

Jeg/vi gir herved Høgskolen i Ålesund 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: 28.05.2015

## Forord

Denne bacheloroppgaven ble utført av 3 studenter ved Høgskolen i Ålesund våren 2015. Vi hadde 11 uker til rådighet. Vi fikk utdelt en oppgave om å utvikle en god metode for å påvise parasittene *Paranucleospora theridion*, *Neoparamoeba species* og *Neoparamoeba perurans* ved bruk av PCR.

Vi synes det har vært utfordrende og spennende å jobbe med noe som det ikke har blitt forsket så mye på, og vi har lært mye nytt.

Vi ønsker å takke veilederne våre Ann-Kristin Tveten for god hjelp med det praktiske arbeidet og for at vi fikk låne laboratoriet hennes, og Helene Børretzen Fjørtoft for faglig og teoretisk veiledning og for å ha skaffet oss prøvematerialet. Vi ønsker også å takke alle andre lærere som har vært behjelpelig.

## Sammendrag

Målet med oppgaven var å finne en metode for å påvise parasittene *Paramucleospora theridion*, *Neoparamoeba species* og *Neoparamoeba perurans* ved bruk av real-time PCR og konvensjonell PCR. Disse parasittene forårsaker store økonomiske tap i lakseoppdrettsnæringen, og har blitt et stort problem de siste årene i Norge og i andre land verden rundt.

Det ble utført konvensjonell PCR som forsterker og påviser DNA som sluttprodukt. DNA-et blir målt ved gelelektroforese. Ved real-time PCR er det ikke sluttproduktet som blir målt, men produktet blir målt samtidig som det blir detektert.

Under det praktiske arbeidet kom vi frem til at vi måtte bruke konvensjonell PCR for å kunne påvise parasittene. For å etablere metoden ble det tilsammen brukt 37 prøver av lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og gjeller fra laks (*Salmo salar*). Optimaliseringen ble utført ved å velge konsentrasjonen av magnesiumklorid og temperaturen som ga best bånd i gelelektroforesen.

# Innhold

<b>Ordliste.....</b>	<b>1</b>
1. Innledning .....	3
1.1 Problemstilling .....	4
2. Teori .....	5
2.1 Lakselus .....	5
2.2 Parasitt .....	5
2.2.1 <i>P. theridion</i> .....	5
2.2.2 <i>Neoparamoeba spp.</i> .....	5
2.2.3 <i>N. perurans</i> .....	6
2.3 PCR .....	6
2.3.1 Konvensjonell PCR .....	8
2.3.2 Real-time PCR .....	8
2.3.3 Gelelektroforese .....	9
2.4 DNA isolering .....	9
2.5 Optimalisering .....	10
2.6 Tidligere forskning .....	10
3. Materiale og metode .....	11
3.1 Prøvemateriale .....	11
3.2 DNA isolering .....	11
3.3 Primere og probesekvens .....	12
3.4 Optimalisering og påvisning av parasitter ved bruk av real-time PCR .....	14
3.5 Optimalisering og påvisning av parasitter ved bruk av konvensjonell PCR ...	14
4. Resultat .....	15
4.1 Optimalisering .....	15
4.2 <i>Neoparamoeba spp.</i> .....	15
4.3 <i>N. perurans</i> .....	16
4.4 <i>P. theridion</i> .....	19
4.5 Sammenligning av prøvesvar .....	21
5. Diskusjon .....	22
6. Konklusjon .....	25

## Ordliste

**AE** – Elueringsbuffer

**AGD** – Amøbisk gjellesykdom

**AL** – Lyseringsbuffer

**Amplifikasjon** – Forsterkning. En mekanisme som fører til flere kopier av bestemte DNA eller RNA produkter

**Amøbe** – Forholdsvis store, encellede organismer, som er ca 0.5 mm. Finnes i havet, i ferskvann, i fuktig jord, og som snyltere hos andre dyr.

**ATL** – Buffer for lysering av vevet

**AW1** – Vaskebuffer 1

**AW2** – Vaskebuffer 2

**cDNA** – DNA som blir kopiert fra RNA

**Cyste** – Hulrom i vev eller organ

**Denaturering** – Delvis eller fullstendig ødeleggelse av den spesifikke og biologiske anordning av DNA dobbelheliks-strukturene ved oppvarming (eller proteinsstrukturene)

**Digitiform** – fingerformet

**DNA** – Deoksiribonukleinsyre. Arvestoff som kontrollerer prosessene i alle levende organismer

**DNA-hybridisering** – Paring mellom to enkelttrådede DNA-biter som er komplementære.

**DNA isolering** – Et metode for å få ut DNA eller genmaterialer fra cellene eller vevene

**DNA-polymerase** – Enzym som katalyserer syntesen av ny DNA-tråd

**dNTP** - Deoksyribonukleosidtrifosfat

**Ekstrahere** – Å få ut eller å frigjøre bestemte innholdsstoff (DNA/RNA) fra et fast eller flyttende stoff ved hjelp av nødvendige oppløsningsmidler

**Endoparasitt** – Endoparasitt er en snylter som lever inne i vertens kropp.

**Gelelektroforese** – En fremgangsmåte for å separere molekylene (DNA/RNA/Proteiner) etter deres størrelse og ladning

**Genus** - Slekt

**Fagocytter**- En gruppe celler som kan oppta og ødelegge andre celler eller mikroorganismer på en måte som minner om spising.

**In vitro** - Noe som foregår utenfor levende organismer

**Konvensjonell PCR** - Konvensjonell PCR er en standard og grunnleggende metode som brukes til identifisering av genmaterialer.

**Lysere** – Cellene sprekker

**Mamilliform** – Brystvorteformet

**Mastermix** - En ferdigblandet løsning som inneholder Taq DNA-polymerase, dNTP-er, MgCl<sub>2</sub>, primerne og templat

**Mikrosporidie** – Intracellulære encellede parasitter som kan gi sykdom i blod og vev

**Optimalisering** –Gjøre en metode så god som mulig ved å variere ulike parametre

**Organismer** –En fellesbetegnelse for levende vesener; et individ av eller en representant for en biologisk art

**PCR** – Polymerase chain reaction

**Polarrør** – Spesialisert rørformet struktur som finnes på overflaten av mikrosporidier. Brukes til å koble seg på en fremmed ende for å danne en kanal i vertscellen.

**Polymerisering**- Dannelse av polymere molekyler

**Post-PCR**- Alt som skjer etter PCR kjøring

**Pre-PCR**- Alt som skjer før PCR kjøring

**Primer** – Et kort DNA-sekvens fragment som brukes for å indusere syntese av DNA i PCR.

**Probe** – En kort RNA sekvens som har radioaktivitet

**Proteinase K** – Et enzym som nedbryter proteinene under forberedelse av DNA og RNA isolering

**RNA** – Ribonukleinsyre, en kopi av DNA

**Salinitet** – Salinitet er en betegnelse for hvor mye natriumklorid som er oppløst i vann.

**Sediment** – Bunnfall som oppstår etter en tid i en grumsete væske

**Taq polymerase** – Varmestabilt enzym som katalyserer dannelsen av et DNA-molekyl. Er blitt et viktig redskap i PCR fordi den tåler gjentatte oppvarminger til 95 °C.

**Mål-DNA** – DNA-et vi er ute etter å kopiere

**Templat** – DNA-tråd som blir kopiert

**Termosyklus** – Varmeapparat med seter til prøver. Regulerer temperaturen opp og ned i programmerte trinn.

**TissueLight2** – Maskin som brukes til å knuse vev

**Tropozoit** – Encellede parasitter i metabolsk aktiv vekstfase i verten



# 1. INNLEDNING

Hensikten med oppgaven er å undersøke om man lett kan påvise parasittene *Paranucleospora theridion*, *Neoparamoeba species*, og *Neoparamoeba perurans* i lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og på fiskegjelle fra et oppdrettsanlegg som har fått høy dødelighet på grunn av parasittene. Siden det har vært forsket lite på å utføre PCR for å finne parasitter i laks fikk vi i oppgave å prøve det ut. Vi hadde kun ett sett med primer og probe til hver parasitt til rådighet. Reagensene ble kjøpt inn av PatoGen Analyse AS. Det ble testet ut kjøring på både real-time PCR og konvensjonell PCR.

Konvensjonell PCR er en standard og grunnleggende metode som brukes til identifisering av genmaterialer. Det foregår ved DNA forsterkning og påvisning. Metoden skal være rask, enkel, reproducerbar og pålitelig. Sluttproduktet blir målt ved gelelektroforese (1).

Real-time PCR er også en metode for å påvise genmateriale. Real-time PCR eller quantitative PCR (qPCR) er en metode der mål-DNA-et blir målt i sann tid (real time). Det vil si at etter hver syklus blir DNA som har blitt kopiert og detektert målt, i stedet for å måle sluttproduktet som i konvensjonell PCR (2).

Vi valgte denne oppgaven fordi vi synes det er spennende å jobbe med PCR, og å lære om mikroorganismer og fisk som vi ikke nødvendigvis lærer så mye om ellers i studiet. Bioingeniører er kjent for å jobbe på sykehus og ha stort fokus på mennesket og pasienter, men vi synes det var spennende å utvide kompetansen og utforske en annen del som bioingeniører også kan jobbe med.

Det har vært og er fortsatt et stort problem for norsk oppdrettsnæring at dødeligheten på laks (*Salmo salar*) har økt betydelig på grunn av parasitter. Tidligere var problemet med amøbegjellesykdom (AGD) begrenset til oppdrettsanlegg i Tasmania, men nå har problemet spredt seg til andre oppdrettsområder. De siste årene har de skyldige parasittene, *Neoparamoeba perurans*, dukket opp i norske oppdrettsanlegg, og dødeligheten på laks har enkelte steder økt med opp til 2 % daglig (3). *P. theridion* er en nyoppdaget parasitt som man også mistenker forårsaker dødelighet i oppdrettsanlegg

## 1.1 Problemstilling

Kan *P. theridion*, *N. perurans* og *Neoparamoeba spp.* i lakselus og fiskegjelle lett påvises med PCR før sykdomsutbrudd?

Delmål:

- Sammenligne real-time PCR og konvensjonell PCR
- Sammenligne sykdomsutbrudd av *P. theridion*, *N. perurans* og *N. species*.

## 2. TEORI

### 2.1 Lakselus

Lakselus er parasittiske krepsdyr som en kan finne på laks, men også på andre laksefisker. Livssyklusen deres består av åtte stadier der de skifter skall mellom hvert stadiet helt til larven har blitt en voksen lus. I de første tre stadiene flyter de fritt i vann og kan gi spredning av parasitten. Fisken blir først infisert etter at denne har festet seg til laksen. En voksen lus kan bevege seg over hele fisken, og gi skader forskjellige steder på laksen (4,5).

### 2.2 Parasitt

Parasitter er organismer som lever i vertsskap hos andre levende organismer. Parasitter blir ofte kalt for snylter fordi den ernærer seg på bekostning av andre organismer. En parasitt kan bli værende i vertsdyret livet ut, eller bare i en del av sin livssyklus (6).

#### 2.2.1 *P. theridion*

*P. theridion* er også kjent ved navnet *Desmoozon lepeophtherii*. Parasitten er en mikrosporidie som infiserer både atlantisk laks og lakselus. Parasitten gjennomgår flere utviklingsstadier i direkte kontakt med vertens cytoplasma. Parasitten gjennomgår to livssyklusstadier i laksen. Ved syklus I produserer de sporer i cytoplasmaet av fagocytter, og ved syklus II produserer de sporer i kjernen av vertens celler. Sporer ved syklus I har små og tynne vegger med et kort polarrør og kan selv være smitteførende. De store sporene innenfor cellekjernen ved syklus II har tykke vegger og lengre polarrør. De kan overføres fra laks til lus, og fra disse lusene igjen til annen laks. Parasitten gjennomgår også en del livssykluser i lakselusen før infeksjonen overføres til annen laks (7,8).

#### 2.2.2 *Neoparamoeba spp.*

*Neoparamoeba spp.* er et genus som omfatter flere beslektede arter, deriblant *Neoparamoeba perurans*. Artene har lignende egenskaper og DNA-sekvenser, men det er kun *N. perurans* som er kjent for å gi sykdom. *Neoparamoeba spp.* er kjent for å kun infisere oppdrettsfisk. De er frittlevende i marint sjøvann. De har en direkte livssyklus,

som vil si at de ikke er avhengig av en vert for å utvikle seg. Den er en ektoparasitt, som vil si at den koloniserer seg utenpå fisken, på gjellene. Høy temperatur er en risikofaktor (9).

### 2.2.3 *N. perurans*

Den parasittiske amøben *N. perurans* gir en amøbisk gjellebetennelse (AGD). Ved påvisning av AGD påviser en tilstedeværelsen av *N. perurans*, og disse navnene blir brukt om hverandre i denne oppgaven. *N. perurans* har lenge vært årsak til store tap i oppdrett av atlantisk laks i Tasmania og Australia. I Norge ga sykdommen seg til kjenne for første gang i 2006, men var siden fraværende frem til høsten 2012. Da ble sykdommen diagnostisert ved fire kjente tilfeller langs vestlandskysten av Norge. Utbrudd av AGD er temperaturassosierte, men det eksisterer lite kunnskap rundt amøbens overlevelsesrate på lave temperaturer (3,10,11).

*N. perurans* er frittlevende amøber i sjøvann. De er frittflytende i digitiform i sjøvann, og endrer seg til mamilliform når de fester seg. De fester seg vanligvis til eller i nærheten av lesjoner, og av og til fester de seg i indre lameller, vesikler eller cyster. AGD fremkalles av *N. perurans* som fester seg til normale gjelleepiteler. Etter en dag av samboerskap med infisert fisk blir tilstanden gradvis forverret over 28 dager. rRNA gen-sekvens fra denne amøben innenfor *Neoparamoeba* slekten er basert på 18S og 28S. Atlantisk laks er verten som blir mest infisert av denne typen amøbe. *N. perurans* er den eneste amøben som har blitt identifisert i forbindelse med gjellelesjoner hos laks ifølge tidligere forskning (12,13).

## 2.3 PCR

PCR står for Polymerase Chain Reaction, noe som betegner *in vitro* amplifisering av DNA. Det blir da mulig å lage et enormt antall kopier av en bestemt DNA-sekvens som man kaller for mål-DNA. PCR forsterker målnukleinsyresekvenser ved bruk av DNA-polymerase, primere og nukleotider (14,15).

Mål-DNA-et kan være en hvilken som helst nukleinsyresekvens av interesse; DNA, RNA eller cDNA. Templatet er et molekyl som inneholder den mål-sekvensen som man ønsker å påvise. Dette molekylet kan hentes fra en celle fra en person, bakterie, parasitt,

viruspartikkel eller annet, og kan brukes som templat i PCR. Ulikt mange andre molekylærbiologiske metoder er PCR en meget sensitiv metode som kun trenger en eller to molekyler for å gjennomføre hele amplifikasjonen. Templatet med mål-DNA-sekvenser får en fra DNA isolering ved å lysere cellene ved hjelp av enzymet proteinase K (16,17,18).

En primer er en kort DNA-sekvens som består av normalt 20-30 basepar. Den blir brukt som et startpunkt ved DNA syntetisering. Det finnes to forskjellige typer primere: revers primer (3' – 5') og forward primer (5' – 3'). De to primerne kan ikke være selvkomplementære og binde seg til hverandre, fordi dette vil kunne forhindre DNA amplifikasjonen senere ved elektroforesen (14,15). Revers primer skal hybridisere på den ene siden, og forward primer skal hybridisere på den andre siden av mål-DNA-et. De hybridiserer til hver sin tråd der deres 3'-ender peker mot mål-DNA-et. I reaksjonsblandingen må begge primere være der helt fra starten av (16,17).

En rekke DNA-polymeraser kan benyttes for PCR, men termostabile Taq DNA-polymerase blir mest brukt. Polymerisering er det siste trinnet ved PCR og blir utført av denne termostabile DNA-polymerasen. Da festes deoksyribonukleosidtrifosfater (dNTP) på endene av primerne for å forlenge nukleinsyrer basert på målsekvensen. Man kan tilsette dette enzymet i reaksjonsblandingen helt fra starten av uten at det blir ødelagt ved gjentatte oppvarminger til 95 °C. Taq polymerase er avhengig av magnesiumioner fra magnesiumklorid. Det er derfor veldig viktig å tilpasse konsentrasjonen i hver enkelt PCR reaksjonen. Utilstrekkelig konsentrasjon av magnesiumioner vil gi dårlig eller lite PCR produkt. Veldig høy konsentrasjon av magnesiumioner vil gi uønskede PCR produkter (1,15,16,18).

Reaksjonsblandingen foregår under temperatursyklusen med normalt 20-40 ganger av denaturering, hybridisering og polymerisering. Denaturering er å separere dobbeltråd DNA ved 94-95 °C ved 30 sekunder, slik at primerne får tilgang til templatet . Ved hybridisering synker temperaturen til cirka 50 °C. Da vil primerne binde seg til spesifikke DNA-templat. Polymeriseringen lar enzymet bevege seg langs templatet fra primeren, og syntetisere den komplementære DNA-tråden. Temperaturen må da være rundt 72 °C (18,19).

### 2.3.1 Konvensjonell PCR

Konvensjonell PCR er en standard og grunnleggende metode som brukes til kvantisering og identifisering av genmaterialer. Det foregår ved DNA forsterkning og påvisning. Metoden er rask, enkel, reproducerbar og pålitelig. Den gjennomføres i tre trinn. Denaturering ved cirka 95 °C, hybridisering ved cirka 50 °C og polymerisering ved cirka 70 °C. Det vil da bli kopiert flere millioner mål-DNA. PCR produktene blir påvist ved bruk av gelelektroforese ved å se på materialenes vandringshastighet og vandringslengde (1,19,20,21). Resultatene blir sammenlignet med positive og negative kontroller.

### 2.3.2 Real-time PCR

Real-time PCR eller quantitative PCR (qPCR) er en metode der mål-DNA-et blir målt i sann tid. Det vil si at etter hver gjennomført syklus i PCR blir DNA som har blitt kopiert og detektert målt.

Det er to prinsipper for real-time PCR som skiller seg fra vanlig PCR. For det første blir mål-DNA-oppopping detektert ved bruk av et fluoriserende stoff, og ikke i konvensjonell gelelektroforese. For det andre blir mål-DNA-oppopping målt ved hver PCR syklus i stedet for at sluttproduktet blir målt. Det blir brukt en 96 brønn mikrotiterplate, og fluorescenssignalet blir detektert og kvantifisert ved bruk av en real-time PCR termosyklus.

Real-time PCR bruker de samme komponentene som i vanlig PCR, men i tillegg brukes det probe. Probe er et fluoriserende stoff som enten er et fragment av et DNA eller RNA-molekyl og den kan være i forskjellige lengder. De er radioaktivt merket og brukes i DNA eller RNA prøver for å detektere tilstedeværelse av mål-DNA-et (2).

Real-time PCR har flere fordeler sammenlignet med konvensjonell PCR. Real-time PCR er en rask metode der det er mulig å analysere mange transkripter (gener) samtidig. Man slipper å lage gel og buffer, noe som bidrar til at metoden blir enda raskere, og en slipper å tilsette loading dye etter PCR. På grunn av at en ikke bruker gelelektroforese blir carryover forurensning redusert, og det blir dermed høyere gjennomstrømning. En ulempe med realtime PCR er høyere kostnader (2,22).

### 2.3.3 Gelelektroforese

Ved elektroforese vil negativt ladet DNA og RNA vandre mot den positive elektroden under det elektriske feltet. Separasjonen er basert på størrelse og ladning der mindre molekyler vandrer raskere enn de store.

Direkte analyser av PCR produkter ved elektroforese kan brukes til å diagnostisere tilstedeværelse av bakterier, virus, sopp eller parasitter. Mutasjoner kan gi endringer i gensekvensering for eksempel ved innsetting, sletting, rearrangering eller i antall gjentatte sekvenser. Lengde på sekvensene vil da variere, men disse fragmentene kan forsterkes ved hjelp av PCR, og lengdevariasjonen kan bli detektert ved elektroforese. PCR produktene blir spaltet med restriksjonsenzymmer og analysert ved hjelp av gelelektroforesen (19,20,21).

Gelen som blir brukt er laget av TAE buffer og agarose pulver. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. For å skille store DNA-fragmenter brukes lav konsentrasjon av agarose (23). Før prøvene blir plassert i brønnene tilsettes det loading dye i prøvene. Loading dye inneholder glyserol og markøren bromofenolblå og bidrar til at prøven synker ned i gelen (2). Mens gelen ennå er varm og i flytende form så tilsettes GelRed. GelRed er et sensitivt, stabilt, og miljøvennlig fluoriserende fargestoff som farger DNA i agorsegel. På grunn av fluorescensen kan en ta bilde ved hjelp av UV-lys.

### 2.4 DNA isolering

DNA isolering er en metode for å få DNA-et ut fra cellene fra for eksempel fersk eller frossent vev fra dyr, celler, blod eller bakterier. En knuser da vevet og løsningen lyseres i noen timer. Ved bruk av DNeasy Blood & Tissue Kit blir det totale DNA-et skilt ut. Denne metoden er uten enzymhemmere og komponenter som kan virke forstyrrende, og den passer godt for PCR. DNA isolering er nødvendig når en har vevsprøver der en skal høste ut DNA for å detektere DNA etter utført PCR (24).

## 2.5 Optimalisering

PCR-reaksjonene er ikke alltid hundre prosent effektive selv ved bruk av primere med definert sekvens. Reaksjonsbetingelsene må varieres for å forbedre effektiviteten. Hvis reaksjonen ikke er optimal produserer PCR ofte et utstryk av produkter i stedet for et definert bånd på gelen. Grunner kan være hybridiseringstemperaturen og magnesiumkloridkonsentrasjonen. For høy eller for lav hybridiseringstemperatur fører til feil sammenkobling, og optimal magnesiumkloridkonsentrasjon varierer med hver ny sekvens (18). Tiden som brukes ved hver temperatur kan også optimaliseres for spesifikke analyser. Forsterkningen av meget korte målsekvenser krever kortere inkubasjonstid enn store målsekvenser (1).

## 2.6 Tidligere forskning og påvisning med PCR av *N. perurans*, *Neoparamoeba spp.* og *P. theridion*.

Det er blitt gjort tidligere forskning på *N. perurans*, *P. theridion* og *Neoparamoeba spp.* med bruk av real-time PCR. Forskingen sier imidlertid lite om metoden som blir brukt er god, effektiv, rask eller pålitelig. Påvisning av *N. perurans* og *Neoparamoeba spp.* er komplisert fordi primerne som blir brukt er spesifisert på 18S rRNA som alle levende flercellede organismer har, og som lett kryssreagerer. Kryssreagere vil si at primerne ikke fester seg til mål-DNA-et, men til DNA som har en lignende sekvens. Påvisning av *Neoparamoeba spp.* er spesielt komplisert fordi primeren som blir brukt ikke er spesifikk nok, men den er en generell primer for alle artene i slekten. Det er derfor fortsatt mye arbeid som gjenstår for å finne en god metode for enkel og rask påvisning av disse parasittene. *P. theridion* har det ikke blitt forsket så mye på, og er et nok så nytt fenomen innenfor den norske oppdrettsnæringen. Det er fortsatt mye som er ukjent om parasittens betydningen for laks. Real-time PCR har blitt brukt for å påvise parasitten, men forskningen sier lite om metoden er god og effektiv (8,25,26).



## 3. MATERIALE OG METODE

### 3.1 Prøvematerialet

Ved prosjektstart fikk vi tildelt lus og gjeller, og dette prøvematerialet kom fra et oppdrettsanlegg på Sunnmøre og i Romsdal. De første syv lusene som ble utdelt var oppbevart i saltvann i kjøleskapet og var mistenkt for å være positive for *N. perurans*. Gjellene var også mest sannsynlig *N. perurans* positive, og disse skulle brukes som positive kontroller for prøvene som ble mistenkt var smittet av *N. perurans*. Vi fikk etter hvert tildelt seks flasker med lus og gjeller, der fire av flaskene inneholdt lakselus og to av flaskene inneholdt gjeller. Prøvetmaterialet var fiksert i etanol og oppbevart i romtemperatur. Dette var lus og gjeller fra død fisk der det var mistanke om *P. theridion*. Dødeligheten på laksen var antatt at startet 1. September 2014. Lusen som ble utdelt var fra 23. Juni 2014. Da var det etter telling en uke etter behandling med alpha max. Alpha max er et lakselusmiddel som blir brukt for å fjerne lakselus fra fisken. Fisken hadde da ingen tegn på sykdom. Resten av prøvematerialet fra både gjeller og lus var tatt 08. Oktober 2014, hovedsakelig fra død fisk. Fem lus fra hver flaske ble plukket ut, og gjellene ble skjært opp i to biter fra hver gjellebit det var i flasken. Så ble det utdelt to positive *P. theridion* kontroller som allerede var DNA-isolert. Alt det andre prøvematerialet vi har jobbet med har vi DNA- isolert selv. I vedlegg 1 er det en tabell som viser oversikt over hvilke parasitt som ble mistenkt å være i prøvene.

### 3.2 DNA isolering

Det ble brukt et kit som heter DNeasy Blood and Tissue kit. Ved bruk av dette må man være obs på at buffer ATL og buffer AL kan danne utfelling ved lagring. Ved utfelling plasserer man bufferen i et varmeskap på 56 °C til den har løst seg opp. Buffer AW1 og AW2 er konsentrert, derfor må man tilsette riktig mengde etanol (96-100%) som indikert på flasken for å få en brukbar løsning før man bruker den for første gang. Bruker man frossent vev skal det først romtempereres, og man bør unngå å tine og fryse om igjen prøvene fordi dette vil minke DNA mengden.

Man starter prosessen med å isolere DNA av vev. Gjellene ble kuttet opp i mindre biter (opp til 25 mg), mens lakselusen ble puttet rett opp i en 1,5 ml mikrosentrifuge. Både lusene og gjellene ble tilsatt en stålkule som skulle hjelpe til med å knuse vevet. Når dette var gjort ble det tilsatt 180 µl buffer ATL og hele brønnboksen ble plassert i TissueLight2, for å knuse lusen. Det ble brukt program 6 med frekvens 30 på 5 minutter. Når dette var ferdig sentrifugerte vi lett for å få ned skummet og tilsatte 20 µl proteinkinase K, mikset dette på vortex og inkuberte i 56 °C inntil det var fullstendig lysert. Vi lot den stå over natten. Etter inkubasjon og rett før vi gikk videre mikset vi med vortex i 15 sekunder. Det var flere trinn der det ble tilsatt AL, etanol, AW1, AW2 og AE buffer i hver sin omgang. Mengden varierte med hvilket reagens man skulle bruke. Blandingen ble pipettert inn i DNeasy Mini Spin kolonnen som var plassert i et 2 ml samlerør. Det ble sentrifugert på forskjellig hastighet og tid. Gjennomstrømnings- og samlerøret ble byttet ut for hver gang. AE ble tilsatt i to omganger for å økt DNA avkastning (se prosedyre for DNA isolering; vedlegg 2).

DNA-et som ble isolert ble brukt både til real-time PCR og konvensjonell PCR. Det ble til sammen DNA isolert 37 prøver.

### 3.3 Primere og probesekvens

Ved tillaging av mastermix til real-time PCR brukes både primer og probe, mens ved konvensjonell PCR brukes kun primer. Ekstrahert DNA fra lakselus og gjeller ble brukt til å innhente delvis små subenheter av rRNA sekvenser av *P. theridion* som bruker primer Nuc F (5'-CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG-3') og Nuc R (5'-TCC CAT CAA TTT CCA ACG GC-3'). Ekstrahert DNA fra gjeller ble også brukt til å innhente små subenheter rRNA sekvenser av AGD som bruker primer rRNA F (5'-GTT CTT TCG GGA GCT GGG AG-3') og rRNA R (5'-GAA CTA TCG CGG GCA CAA AAG-3').

Tabell 1: Oversikt over primer og probesekvens

Primer/probe	Sekvens	Produkt lengde	Cat No./ID No.
AGD 18S rRNA F	5'-GTT CTT TCG GGA GCT GGG AG-3'	20	A2663C05
AGD 18S rRNA R	5'-GAA CTA TCG CGG GCA CAA AAG-3'	21	A2663C06
AGD PROBE	5'-FAM-CAA TGC CAT TCT TTT CGG A-3'	19	A2768A02
<i>Neoparamoeba</i> <i>spp.</i> F	5'-CGA TC AGAT ACC GTC GTA GTC-3'	21	A2663C07
<i>Neoparamoeba</i> <i>spp.</i> R	5'-CAG CCT TGC GAC CAT ACT C-3'	19	A2663C08
<i>Neoparamoeba</i> <i>spp.</i> PROBE	5'-FAM-CTC CTT CAG TAC CTT ACG AG-3'	20	A2768A03
<i>P. theridion</i> rRNA Nuc F	5'-CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG-3'	21	A2663C03
<i>P. theridion</i> rRNA Nuc R	5'-TCC CAT CAA TTT CCA ACG GC-3'	20	A2663C04

### 3.4 Optimalisering og påvisning av parasitter ved bruk av real-time PCR

Ved kjøring av real-time PCR ble det blandet en mastermix i eppendorfrør der man tilsatte polymerase, reverse og forward primer, probe, og ioneffritt vann. Mastermixen ble overført til brønnene i en 96 PCR plate. Primerkonsentrasjonene og ionisert vann ble variert, og ved hver ny konsentrasjon hadde vi tre like paralleller i tillegg til en negativ kontroll (mastermix uten DNA). Det ble brukt egen primer og probe til AGD og til *Neoparamoeba spp.* Det ble brukt 3 positive kontroller, der samme kontroll ble brukt for AGD og *N. perurans*. Prøvene ble vortekset og sentrifugert for at alt skulle legge seg på bunnen. Så ble det kjørt optimalisering av disse på real-time PCR. Programmet hadde innledende denaturering på 95 °C på 10 minutter med første syklus. Denatureringen var på 95 °C på 20 sekunder, og hybridisering og polymerisering var på 60 °C på 60 sekunder med til sammen 45 sykluser.

### 3.5 Optimalisering og påvisning av parasitter ved bruk av konvensjonell PCR

Til konvensjonell PCR ble det blandet mastermix i et eppendorfrør som inneholdt polymerase mix, forward og reverse primere, magnesiumklorid og ioneffritt vann. Det ble brukt en 96 PCR plate der 13 µl av mastermixen ble pipettert over i hver sin brønn. 2 µl av DNA-prøvene ble pipettert ut fra oppbevaringskilden og over i PCR platen som var tilsatt mastermixen. Den negative kontrollen inneholdt kun mastermix, mens den positive kontrollen inneholdt en prøve som var positiv. Prøvene ble vortekset og sentrifugert, og så kjørt i PCR.

Agarosegel ble laget, og loading dye ble tilsatt til alle prøvene i PCR platen. Når gelen stivnet ble det tilsatt TAE buffer, og prøvene ble overført til gelbrønnene. Det sto på spenningen i 45 min før det ble tatt et bilde av gelen.

Det ble kjørt Touchdown PCR med forskjellig konsentrasjon av magnesiumklorid og temperatur. I elektroforesen ble båndene vurdert ut ifra om de var spesifikke og rene (vedlegg 3, 4 og 5)

## 4. RESULTAT

### 4.1 Optimalisering

Det ble gjort optimalisering på både real-time PCR og konvensjonell PCR, men real-time PCR ga kun negative svar.

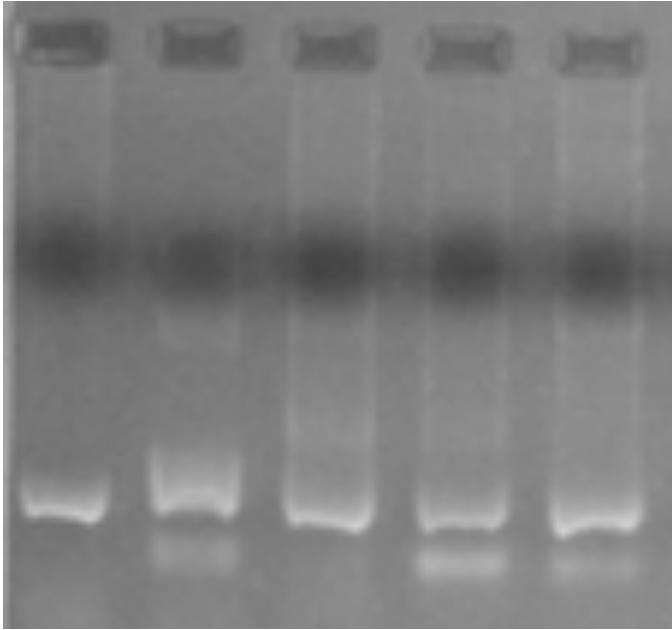
Optimalisering av AGD med konvensjonell PCR ga flere positive utslag. Vi vurderte at ved temperaturen 55 °C var båndet klarest og hadde minst mulig primerrester. Konsentrasjonen på magnesiumklorid vi vurderte til å være optimal var 0.3 µl (tabell 2 i prosedyre for optimalisering av AGD, vedlegg 3).

Ved optimaliseringen av *P. theridion* med konvensjonell PCR vurderte vi at temperaturen var optimal ved 58 °C, og magnesiumkloridkonsentrasjonen var optimal ved 0.6 µl (tabell 3 i prosedyre for optimalisering av *P. theridion*, vedlegg 4). En prosedyre ble utformet på grunnlag av disse resultatene (vedlegg 4 og 5).

### 4.2 *Neoparamoeba* spp.

Real-time PCR viste at alle prøvene som skulle blitt positive for *Neoparamoeba* spp. ble negative. Fordi den positive kontrollen ikke gikk inn ble resultatene forkastet.

I den konvensjonelle PCR ble den positive og den negative kontrollen lik. Dermed forkastet vi svarene på resten av prøvene. Figur 1 viser eksempler på hvordan noen av båndene så ut.

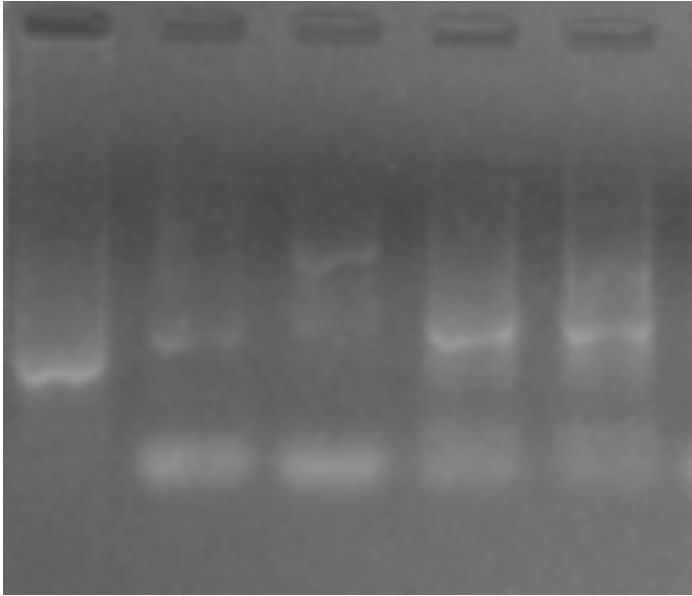


**Figur 1 Første båndet viser den positive kontrollen, det neste båndet viser den negative kontrollen. De tre neste båndene er prøver.**

#### 4.3 *N. perurans*

Real-time PCR viste at alle prøvene som skulle blitt positive for *N. perurans* ble negative. Fordi den positive kontrollen ikke gikk inn ble resultatene forkastet.

Ved konvensjonell PCR fikk vi både positive og negative utslag av *N. perurans*. Figur 2 viser eksempler på det.



**Figur 2** Det første båndet viser den positive kontrollen, mens det andre båndet viser den negative kontrollen. Det tredje båndet viser en negativ prøve, mens fjerde og femte bånd viser positive prøver.

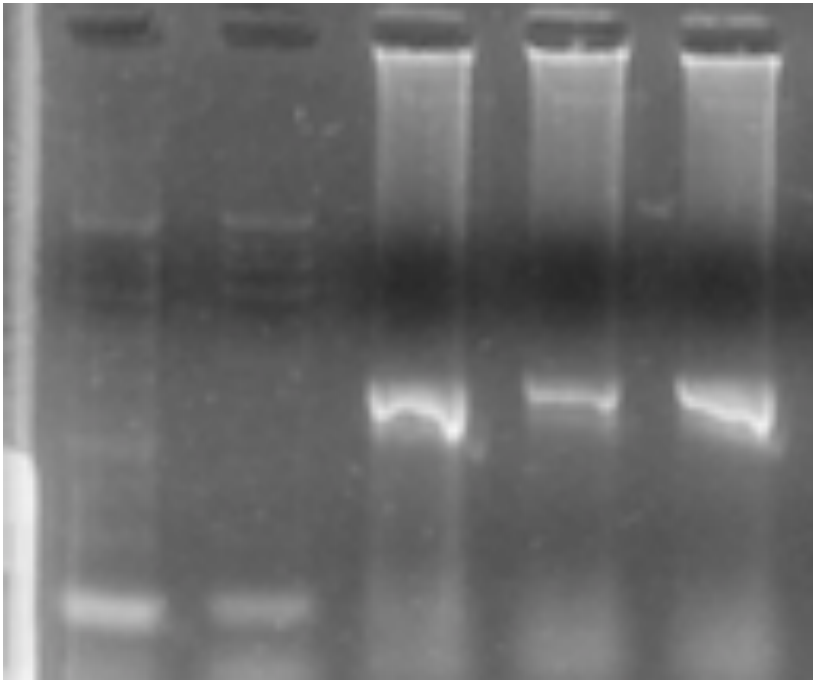
Tabell 2: Oversikt over positive og negative resultater for *N. perurans*

Prøve nummer	Parasitt	Prøve materiale	Resultat
1	<i>N. perurans</i>	Pos.kontroll	Positiv
2	<i>N. perurans</i>	Neg.kontroll	Negativ
1	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
2	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
3	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
4	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
5	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
6	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
7	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
8	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
9	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
10	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
11	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
12	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
13	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
14	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
15	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
16	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
17	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
18	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
19	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
20	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
21	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Negativ
22	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Negativ
23	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Negativ
24	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Positiv
25	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Positiv
26	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Positiv
27	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Positiv
28	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Positiv
29	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Negativ
30	<i>N. perurans</i>	Laksegjeller	Negativ
31	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
32	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
33	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
34	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
35	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Positiv
36	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ
37	<i>N. perurans</i>	Lakselus	Negativ



#### 4.4 *P. theridion*

Kontrollene ble godkjente for *P. theridion*. Figur 3 viser noen av prøvene.



**Figur 3** Det første båndet viser en svak positiv kontroll, mens det andre båndet viser en negativ kontroll. De tre neste båndene viser tre positive prøver.

Tabell 3: Oversikt over positive og negative resultater for *P. theridion*

Prøve nummer	Parasitt	Prøve materiale	Resultat
1	<i>P. theridion</i>	Pos.kontroll	Positiv
2	<i>P. theridion</i>	Neg.kontroll	Negativ
1	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
2	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
3	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
4	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
5	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
6	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
7	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
8	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
9	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
10	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
11	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
12	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
13	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
14	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
15	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
16	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
17	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
18	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
19	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
20	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
21	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
22	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
23	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
24	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
25	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
26	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
27	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
28	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
29	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
30	<i>P. theridion</i>	Laksegjeller	Positiv
31	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Negativ
32	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
33	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
34	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
35	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
36	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv
37	<i>P. theridion</i>	Lakselus	Positiv

#### 4.5 Sammenligning av prøvesvar

Tabellen viser oversikt over prøvemateriale og parasitter som var mistenkt og påvist.

Tabell 4: Sammenligning av *P. theridion* og AGD

Prøve nr	Prøve materialer	Før eller etter sykdoms-Utbrudd	Mistenk Parasitt	Påvist <i>P. theridion</i>	Påvist AGD	Påvist både <i>P. theridion</i> og AGD
1	Lakselus	Før	<i>P. theridion</i>	Negativ	Positiv	Nei
2	Lakselus	Før	<i>P. theridion</i>	Negativ	Negativ	Nei
3	Lakslus	Før	<i>P. theridion</i>	Negativ	Positiv	Nei
4	Lakselus	Før	<i>P. theridion</i>	Negativ	Negativ	Nei
5	Lakselus	Før	<i>P. theridion</i>	Negativ	Negativ	Nei
6	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
7	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
8	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
9	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
10	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
11	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
12	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
13	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
14	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
15	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
16	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
17	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Negativ	Positiv	Nei
18	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
19	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Negativ	Positiv	Nei
20	Lakselus	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
21	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
22	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
23	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
24	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
25	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
26	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
27	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
28	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Positiv	Ja
29	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
30	Laksegieller	Etter	<i>P. theridion</i>	Positiv	Negativ	Nei
31	Lakselus	Etter	AGD	Negativ	Negativ	Nei
32	Lakselus	Etter	AGD	Positiv	Positiv	Ja
33	Lakselus	Etter	AGD	Positiv	Positiv	Ja
34	Lakselus	Etter	AGD	Positiv	Negativ	Nei
35	Lakselus	Etter	AGD	Positiv	Positiv	Ja
36	Lakselus	Etter	AGD	Positiv	Negativ	Nei
37	Lakselus	Etter	AGD	Positiv	Negativ	Nei

## 5. DISKUSJON

I tidligere forskning er det real-time PCR som har blitt mye brukt for å påvise *P. theridion* og *Neoparomeba*. Vi ønsket også å bruke denne metoden til å finne en optimalisert metode for å påvise parasittene. Under optimaliseringen ble det tilsatt forskjellige konsentrasjoner av primerne i prøvene for å finne den konsentrasjonen som virket optimalt i real-time PCR. Alle resultatene ble negative, også de positive kontrollene. Fordi de positive kontrollene ikke ble positive i real-time PCR ble alle svarene forkastet. Det ble mistenkt at proben ikke fungerte. Proben er et lysfølsomt reagens og bør ikke stå lenge under dagslys. Hvis man lar proben stå lenge under dagslys når man lager mastermixen kan den bli ødelagt. En annen grunn til at kontrollene ikke gikk inn kan være at real-time PCR har en litt høyere temperatur enn det som er optimalt for primerne. For høy temperatur vil gjøre at primerne ikke fester seg, og da vil det ikke dannes mer DNA. Det kan være en forklaring på at de positive kontrollene ikke ga utslag, men ble registrert som negative. Mistanke om at primerne ikke festet seg eller at det var for lite DNA i prøvene ble avvist ved utføring av konvensjonell PCR fordi de positive og negative kontrollene gikk inn.

Et av delmålene i denne oppgaven var å sammenligne resultatene mellom real-time PCR og konvensjonell PCR. Vi forkastet alle resultatene i real-time PCR og da ble det ikke mulig med noen sammenligning. Resultatene fra PCR blir derfor kun vurdert ut ifra den konvensjonelle metoden.

Ved innkjøringen av konvensjonell PCR fikk vi positivt utslag. Både de positive og de negative kontrollene på *Neoparamoeba spp.* ble like. Alle kontrollene og alle prøvene ble sterkt positive. Vi kunne derfor ikke godkjenne verken kontrollene eller prøvene, og vi valgte å forkaste prøvene av *Neoparmoeba spp.* En mulig årsak til at alle svarene ble positive er forurensing. En prøver så klart alltid å unngå det, men med jobbing med genmaterialet og PCR er det ikke mye som skal til for at det blir litt forurensing. En annen mulig årsak er at primerne ikke var spesifikke nok. I PCR kan det være vanskelig å detektere og differensiere artene innenfor *Neoparamoeba spp.* fordi de har lignende DNA sekvens. Men det forklarer ikke hvorfor de negative kontrollene ble positive. En tredje mulighet er at 18S rRNA kan ha kryssreagert. Svarene ble forkastet, og vi valgte å ikke gå videre med å finne en optimaliseringsmetode for å påvise *Neoparamoeba spp.*

Kontrollene på AGD og *P. theridion* ble godkjent i konvensjonell PCR. Det gjorde det mulig å sammenligne prøveresultatene med kontrollene. Båndene ved innkjøringen var utydelig og uspesifikke og det var forbedringspotensial i PCR metoden. Vi gikk derfor videre med å optimalisere metoden for å påvise parasittene. Optimalisering gikk ut på å variere magnesiumkloridkonsentrasjonen og temperaturen i PCR. Vi ønsket å oppnå å få enda renere bånd og minst mulig primerrester i gelen.

Magnesiumkloridkonsentrasjonen vi fant som var optimal for *P. theridion* var en konsentrasjon på 0.6 µl. Denne ga klareste bånd, og minst mulig primerrester. Denne konsentrasjonen ble brukt når vi varierte temperaturen i Touchdown PCR. Temperaturen vi vurderte til å være mest optimal var 58 °C. Den endelige kjøringen ble kjørt med denne temperaturen og konsentrasjonen. Prøvene ble vurdert om de var positive eller negative etter denne kjøringen. De negative kontrollene ble negative, og de positive ble veldig svakt positive. Kontrollene av *P. theridion* var de eneste kontrollene vi ikke DNA-isolerte selv. Det er mulig at forskjellig måte å utføre DNA isolering på gjorde at de positive kontrollene ble så svake i forhold til resten av prøvene. Feilkilde i DNA isolering kan være oppbevaring av fisk eller lusevev i vann. Prøvematerialet bør oppbevares i sprit fordi det er et fikseringsmiddel som vil bevare prøvematerialet i en lengre periode. En annen feilkilde kan være for varm oppbevaringstemperatur. En tredje feilkilde kan være at det går for lang tid med å analysere prøven etter opptining. Det er altså mulighet for å finne en enda mer optimalisert metode, men tiden og resursene strakk ikke til for at vi fikk mulighet til det. Metoden vi brukte i siste kjøringen er lagt med som vedlegg og er et godt utgangspunkt for påvisning av *P. theridion*, og eventuelt for videre optimalisering med konvensjonell PCR. Magnesiumkloridkonsentrasjonen vi vurderte som optimal for AGD var 0.3 µl, og temperaturen var 55 °C. Men selv ved disse betingelsene var båndene uspesifikke. Noen bånd ble sterkt positive, mens andre bånd ble opphakkert og hadde flere bånd i samme brønn. Det gjorde det utfordrende å avgjøre om prøvene var positive eller negative. Her er det forbedringspotensial for videre optimalisering.

Under metodeutviklingen ved påvisning av *N. perurans* brukte vi et sett med primer AGD 18S rRNA som er tilgjengelig hos Life Technologies Trademark, Invitrogen Custom Primers. En AGD 18S rRNA F primer med sekvensen 5'-GTT CTT TCG GGA GCT GGG AG-3' som har lengde på 20 baser, og en AGD 18S rRNA R primer med sekvensen 5'-

GAA CTA TCG CCG GCA CAA AAG-3' som har lengde på 21 baser. Disse primerne er spesial laget for *N. perurans*. De er veldig sensitive og kan lett kryssreagere med annet DNA, for eksempel fra fiskevev, lusevev eller fra fingrene våre. Det er uhyre viktig at en under arbeidsprosessen er flink til å bruke hansker og beskytter prøvene fra å bli forurenset. Et forurenset DNA-molekyl kan ødelegge hele prøveresultatet, slik at resultatene blir urene med andre DNA-bånd. Dette fører til vanskeligheter når man skal tolke positive og negative resultater. Til og med den negative kontrollen kan ha noen uspesifikke bånd hvis det blir forurenset med annet DNA.

Resultatene av *Neoparamoeba spp.* ble forkastet, og det blir derfor kun sammenligning av resultatene av *P. theridion* og *N. perurans*. Av de 37 prøvene ble 29 positive med *P. theridion* og 8 prøver ble negative. 15 prøver ble negative og 22 prøver ble positive for AGD. 18 av prøvene ble funnet positive for både *P. theridion* og AGD. Det er mulig at det kan ha skjedd en forurensning i flaskene der lusene ble oppbevart. Det er også fullt mulig at en fisk har blitt infisert av to parasitter, en infeksjon utelukker ikke en annen. Av utvalget vi hadde av fisk og lus var et stort flertall infisert av *P. theridion*. Dette er ikke et representativt forhold av hvordan smitten er i Norge, men er et tilfeldig utvalg av prøver som vi fikk utdelt.

Det ble samlet inn lakselus før og etter at laksen viste tegn til sykdomsutbrudd. Et ønske fra oppdrettsnæringer er at en lett kan påvise parasitten før fisken har begynt å bli syk. Da kan en behandle fisken for parasitten før det er for seint, og fiskeliv og penger vil bli spart. Av prøvene vi fikk utdelt var fem prøver samlet inn før sykdomsutbrudd. Ingen av disse ble påvist positiv for *P. theridion* som var mistenkt å være i lusen. Men to av disse ble påvist *N. perurans*. Ut i fra resultatene kan det se ut til at det ikke er mulig å påvise *P. theridion* før sykdomsutbrudd. Vi fikk kun utdelt fem prøver før sykdomsutbrudd. Flere prøver ville gitt et mer representativt utvalg, og en kunne i større grad utelukke sjansen for at en tilfeldigvis fikk fem fisk som ikke var smittet hvis det skulle være smittet fisk rundt. Det var ikke helt enkelt å tolke hvilke bånd som var positive og negative for *P. theridion*, og det er mulig at svake positive bånd kan ha blitt tolket som negative. Noe som var interessant var at det ble påvist *N. perurans* i to av fem prøver som ble samlet inn før sykdomsutbrudd der det var mistenkt *P. theridion*. Det ser ut til at det er mulig å påvise *N.*

*perurans* før sykdomsutbrudd, og det kan være lurt for en oppdrettsnæring som sliter med smitte å jevnlig teste for *N. perurans* for å unngå sykdom.

## 6. KONKLUSJON

Etter utført praktisk arbeid så vi at konvensjonell PCR ga et bedre resultat enn real-time PCR ved påvisning av *P. theridion* og *N. perurans*. *Neoparamoeba spp.* fikk vi verken påvist ved real-time PCR eller konvensjonell PCR. Resultatet viste at et stort flertall av prøvene var infisert med *P. theridion*, mange var infisert av *N. perurans*, mens nesten halvparten av prøvene var infisert med begge parasittene. Det var ikke alltid like lett å tolke resultatene i gelelektroforesen, og det gjenstår derfor en del utprøving for å få rene og tydelige bånd.

Til videre forskning vil vi anbefale å ta utgangspunktet i hybridiseringstemperaturen og magnesiumkloridkonsentrasjonen som vi anbefaler i prosedyren. En kan optimalisere videre ved å variere temperaturen og magnesiumkloridkonsentrasjonen opp og ned. Andre justeringer en kan gjøre er tiden produktet er i de forskjellige syklusene i PCR. Til videre forskning av *Neoparamoeba spp.* hadde det vært en fordel å hatt spesifikke primere slik at man kan finne en metode som er optimal for å påvise spesifikke arter under *Neoparamoeba*, slik som *N. perurans* som forårsaker AGD.

Det er mulig å påvise *N. perurans* før sykdomsutbrudd. Det er en stor fordel for oppdrettsnæringen som da kan behandle fisken før sykdommen slår ut. Vi kunne ikke se at det var mulig å påvise *P. theridion* før sykdomsutbrudd, men vil anbefale til videre forskning å undersøke det med flere prøver.

Referanseliste:

1. Walker-Daniels Jennifer, Current PCR Methods, Iowa State University, United States, original versjon 19.04.2012, oppdatert 03.09.2014. informasjon hentet 07.04.2015, tilgjengelig fra <http://www.labome.com/method/Current-PCR-Methods.html#ref2>
2. McPherson M, Møller S. PCR. 2. Ed New York og Abingdon: Taylor & Francis Group; 2006. 292 s.
3. Alarcón M, Adolfsen P,....., Ørpetveit I. Fiskehelserapporten 2014. Oslo:Verterinærinstituttet;2014
4. Hamre Lars A., Eichner Christiane, Caipang Christopher Marlowe A., Dalvin Sussie T., Bron James E., Nilsen Frank, Boxshall Geoff og Skern-Mauritzen Rasmus. The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Chalimus Stages. PLOS one, publisert 12.09.2013; USA. Hentet: 19.05.2015. Tilgjengelig på url: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073539>
5. Røsvik Inger Oline. Biologi for Akvakultur. 2. Utgave: Norge; Landbruksforlaget, 1997. 222 sider
6. Tønjum Tone. Parasitter. Store Medisinske Leksikon, Universitet i Oslo, Norge. Sist oppdatert 05.02.2015. Hentet 20.05.2015. Nettside tilgjengelig på url: <https://sml.snl.no/parasitter>
7. Nylund Stian, Nylund Are, Watanabe Kuninori, Arnesen Carl E. og Karlsbakk Egil. The Journal of Eukaryotic Microbiology: *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a Life Cycle in the salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Department of Biology, University of Bergen, Norway, nummer 57 (2), 2010, sider 95-114.
8. Sveen S., Øverland H., Karlsbakk E., Nylund A.. Disease of Aquatic organisms: *Paranucleospora theridion* (Microsporidia) infection dynamics in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* put to sea in spring and autumn. Volume 101: Norway, Publisert 10.10.2012, Sider 43-49.
9. Nowak Barbara F.. International Journal for Parasitology; Parasitic diseases in marine cage culture - An example of experimental evolution of parasites?. Volume 37, Issue 6, May 2007, side 581-588. Hentet dato:



- 26.05.2015. [doi:10.1016/j.ijpara.2007.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.01.003) Tilgjengelig url:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907000100>
10. Bridle A. R., Crosbie P. B. B., Cadoret K., Nowak B. F.. Aquaculture; Rapid detection and quantification of *Neoparamoeba perurans* in the marine environment. Volume 309, Issues 1.4, 22 November 2010, Page 56-61  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848610006253>
  11. Fakta om: Amøbegjellesykdom (AGD). Oslo: Veterinærinstituttet. Hentet 2015-02-15. Tilgjengelig fra: (<http://www.vetinst.no/Faktabank/Amoebegjellesykdom-AGD>)
  12. Young N.D., Crosbie P.B.B., Adams M.B., Nowak B.F., Morrison R.N.. *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). 26.april 2007. International Journal for Parasitology 37. Side 1469-1481. Tilgjengelig fra url: [http://ac.els-cdn.com/S0020751907001415/1-s2.0-S0020751907001415-main.pdf?\\_tid=0e619e74-d792-11e4-9b76-00000aacb361&acdnat=1427798483\\_3a7d172531dd077799f7b656f7bfe073](http://ac.els-cdn.com/S0020751907001415/1-s2.0-S0020751907001415-main.pdf?_tid=0e619e74-d792-11e4-9b76-00000aacb361&acdnat=1427798483_3a7d172531dd077799f7b656f7bfe073)
  13. Adams M. B. and Nowak B. F.. Journal of Fish Disease; Amoebic gill disease: sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Tasmania, Australia; Blackwell Publishing ltd, 2003. Sider 601-614.
  14. Sjøberg Nils Olav. Molekylær genetikk; Genteknologi – humant DNA. 3. Utgave. Oslo, Norge: Vett & Viten AS; 2002. 225 sider.
  15. Sjøberg Nils Olav. Molekylær genetikk; Genteknologi – humant DNA. 4. Utgave. Oslo, Norge; Vett & Viten AS; 2006. 333 sider.
  16. Wilson Keith, Walker John. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6<sup>th</sup> Edition. New York, USA; Cambridge University Press; 2005. 783 sider.
  17. Hughes S. and Moody A.. Methods Express: PCR. 1. Utgave. England, UK; Scion Publishing Ltd, 2007. 348 sider.
  18. New England, BioLabinc, hentet 29.04.2015, 16:00. Url: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>
  19. P. C. Turner, A. G. McLennan, A. D. Bates & M. R. H. White. Instant Notes: Molecular Biology. 2. Utgave. Guildford, UK: BIOS Scientific Publishers Limited, 2000. 346 sider.

20. Rodak Bernadette F., Fritsma George A., Keohane Elaine M.. Hematology: Clinical Principles and Applications. Fourth Edition. St. Louis, Missouri: Saunders, an imprint of Elsevier Inc, 2012. 864 s.
21. Burtis Carl A., Ashwood Edward R., Bruns David E.. Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry. Sixth Edition. St. Louis, Missouri: Saunders, an imprint of Elsevier Inc, 2008. 952 s.
22. Case, Funke, Tortora. Microbiology An Introduction 11. Ed USA: Pearson: 2013. 818 s.
23. ABF prosedyre, intern prosedyre, avdeling for biologiske fag.
24. DNeasy Blood & Tissue Handbook. Qiagen. Juli 2006. 59 s.  
<https://www.qiagen.com/no/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>
25. Paranucleospora theridion. Ålesund: PatoGen A; hentet 2015-05-20.  
<http://www.patogen.no/default.aspx?menu=88&id=93>
26. Frinugelli E., Gordon A. W., Graham D. A., Rodger H., Welsh M. D. Detection of *Neoparamoeba perurans* by duplex quantitative Taqman real-time PCR in formalin-fixed, paraff-embedded Atlantic salmonid gill tissues. Journal of Fish Diseases 2012. Blackwell Publishing Ltd, UK. s 14. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01395.x

## Vedlegg 1

Tabell med oversikt over prøvematerialet og parasitter som er mistenkt.

Prøve- nummer	Prøve- materialer	Dato innsamlet	Innsamlingssted	Lagrings- væske	Mistenkt Parasitt
1	Lakselus	23.06.14	Oppdrettsanlegg på Sunnmøre	Sprit	<i>P. theridion</i>
2	Lakselus	23.06.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
3	Lakselus	23.06.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
4	Lakselus	23.06.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
5	Lakselus	23.06.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
6	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
7	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
8	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
9	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
10	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
11	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
12	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
13	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
14	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
15	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
16	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
17	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
18	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
19	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
20	Lakselus	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
21	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
22	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
23	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
24	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
25	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
26	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
27	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
28	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
29	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
30	Laksegjeller	08.10.14		Sprit	<i>P. theridion</i>
31	Lakselus	Mars 2015	Romsdalsfjorden	Saltvann	AGD
32	Lakselus	Mars 2015		Saltvann	AGD
33	Lakselus	Mars 2015		Saltvann	AGD
34	Lakselus	Mars 2015		Saltvann	AGD

35	Lakselus	Mars 2015		Saltvann	AGD
36	Lakselus	Mars 2015		Saltvann	AGD
37	Lakselus	Mars 2015		Saltvann	AGD

## **Vedlegg 2: Prosedyre for DNA isolering**

### **1. Hensikt**

Hensikten med prosedyren er å få ut mest mulig DNA fra lakselus eller vev.

### **2. Omfang**

Prosedyren omfatter amplifisering av DNA isolat fra lakselus eller vevsprøver for å få økt DNA avkastning.

### **3. Bakgrunnsinformasjon**

I laboratoriearbeid er isolering av hele genomet til en organisme en standardprosedyre når en driver forskning på ulike typer organismer. En trenger biologiske prøver å isolere DNA-et fra, det kan være celler fra ulike typer vev. For å isolere DNA-et må en først ødelegge cellene slik at DNA-et som ligger i cellekjernen, blir tilgjengelig. Dette blir gjort ved å blande cellene med buffer som ødelegger cellemembranene, som består av fett. En må tilsette enzym som ødelegger proteina i cellen, slik at DNA-et som kommer ut av cellekjernen ikke blir ødelagt av cellens enzym. Til slutt må en skille DNA-et fra alt det andre i cella slik at en sitter igjen med en løsning som bare inneholder DNA. Dette gjør en ved å tilsette alkohol (f.eks etanol). DNA-et samler seg da i sjikt mellom alkoholen og resten av løsningen. Dette DNA-et kan en så løse i en egna væske (en buffer) som holder DNA-et i løsningen og gjør det stabilt.

### **4. Utstyr og reagens**

- Buffer
- Varmeskap
- Etanol
- Vev: Lakselus og gjeller
- Tissuelight2
- ATL buffer
- AL buffer
- Mikrosentrifugekopp
- Kule

- Proteinase K
- Vortex
- Sentrifuge
- DNeasy Mini spin kolonne
- Pipette
- Pipettespisser
- Spinnekolonne
- Samlingsrør
- Gjennomsstrømningsrør
- AW1 buffer
- AW2 buffer

## **5. Analyseprinsipp**

Prinsippet går ut på at en knuser vevet og lar prøvene lyses ved å bruke proteinase K. Bufferen er tilpasset for å gi optimale forhold til DNA-binding. Det som er lysert går inn i DNeasy Mini Spin kolonnen eller DNeasy 96 platen. Under sentrifugering blir DNA-et selektivt bundet til DNeasy membranen som forurensningene passerer forbi. Gjenstående forurensning og enzym hemmere er fjernet i to effektive vaskesteg og DNA blir da eluert i vann eller buffer klar til bruk. DNeasy rensed DNA har A260/A280 rotasjon av 1,7-1,9 og absorbans scann viser en symmetrisk peak på 290 nm som bekrefter høy renhet. DNeasy membranen kombinerer bindingsegenskaper av en silicabasert membran med enkel mikrospin teknologi eller med Qiagen 96-brønner-plate sentrifugeringssystem. DNA adsorberer i DNeasy membranen i tilstedeværelse av høy konsentrasjon av salt, som fjerner vann fra hydrerte molekyler i løsning. Buffer forholdene i DNeasy Blood & Tissue kit er designet til å la spesifikke DNA adsorbere til silica membranen, og for optimal fjerning av kontaminerte og enzymhemmere.

## **6. Kvalitetskontroll**

Finne ut om vi har fått DNA ved å kjøre prøver i PCR mot positiv og negativ kontroll. Er noen positive har vi fått ut DNA.

## 7. Fremgangsmåte

### Ting å gjøre før man starter:

1. Buffer ATL og Buffer AL kan danne utfelling ved lagring. Om nødvendig varm opp til 56°C til utfellingene har løst seg opp.
2. Buffer AW1 og buffer AW2 er konsentrert. Før vi bruker den første gang tilsettes riktig mengde etanol (96-100%) som indikert på flasken for å få en brukbar løsning.
3. Forvarm et varmeskap til 56°C for å bruke i steg 5.
4. Hvis man bruker frossent vev må den først romtempereres. Unngå å tine og fryse om igjen prøvene på grunn av at dette vil minke DNA størrelsen.

**Vev:** Gjellene kuttes opp i mindre biter ( opp til 25 mg). Lakselusen taes rett opp i en 1,5 ml mikrosentrifuge.

### Arbeidsbeskrivelse:

1. Tilsett en lus eller en bit av en gjelle i en mikrosentrifuge kopp, tilsett så en kule.
2. Tilsett 180 µl buffer ATL. Plasser hele boksen i TissueLight2, og knus lusen. Program 6 med 30 frekvens på 5 min.
3. Sentrifuger lett for å få ned skummet
4. Tilsett 20 µl proteinase K, mix med vortex og inkuber i 56°C inntil det er fullstendig lysert (kan stå over natten uten negativt følger) . Vortex 15 s rett før steg 5
5. Tilsett 200 µl buffer AL. Mix prøvene godt med vortex etter at buffer er tilsatt.
6. Tilsett 200 µl etanol (96-100 %). Mix godt med vortex.
7. Pipeter all blandingen inn i DNeasy Mini spin kolonne plassert i et 2 ml samlerør. Sentrifuger ved 8000 rpm i 1 min. Kast gjennomstrømnings og samlerøret.
8. Plasser spinnekolonnen i en ny 2 ml samlerør. Tilsett 500 µl Buffer AW1. Sentrifuger i 1 min ved 8000 rpm. Kast gjennomstrømnings og samlerøret
9. Plasser spinnekolonnen i ett nytt 2 ml samlerør, tilsett 500 µl Buffer AW2 og sentrifuger i 3 min ved 14,000 rpm. Kast gjennomstrømnings og samlerøret.
10. Overfør spinnekolonnen til en ny 1,5 eller 2 ml mikrosentrifugerør.

11. Eluer DNA ved å tilsette 100 µl Buffer AE i midten av spinnekolonne membranen.

Inkuber i 1 min i romtemperatur (15-25C). Sentrifuger i 1 min ved 8000 rpm.

Anbefalt: Repeter steg 11 for økt DNA avkasting

## **8. Feilkilder**

- Forurensning
- Feil ved pipettering
- Utfelling i ALT

## **9. Resultatvurdering**

Ved inkubering skal vevet bli fullstendig lysert for å få ut alt DNA som er mulig, før man kan jobbe videre med den flytende prøve. Etter utført arbeid skal DNA-et være eluert. Så kjøres prøvene i PCR, og resultatet blir sammenlignet med kontroller.

Kilde: Genteknologi på naturfagrommet. Oslo: Bioteknologirådet; hentet 2015.05.03.

2014.07.02 <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/genteknologi-pa-naturfagrommet/>



## **Vedlegg 3: Prosedyre for optimalisering av AGD**

### **1. Hensikt**

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre PCR for påvisning av AGD.

### **2. Omfang**

Det skal i følge prosedyren bli gjort mangfoldiggjøring av DNA isolat fra lakselus eller vevsprøver til PCR for å påvise AGD.

### **3. Bakgrunnsinformasjon**

Mangfoldiggjøring av DNA fragmenter fra AGD

Syklisk reaksjon som gjennomføres i tre trinn:

Denaturering (95°C) – skiller DNA helix

Hybridisering (55°C) – Primer fester seg til DNA

Polymerisering (72°C) – DNA tråd syntetiseres, optimal temperatur for polymerase

I tillegg kreves en denaturerings tid før syklusene startes for å aktivisere enzym aktiviteten.

### **4. Utstyr og reagens**

Utstyr som trengs for å utføre prosedyren, samt alle reagens som trengs for å gjennomføre analysen:

Hansker

Eppendorfrør

Polymerase

MgCl<sub>2</sub>

Primer forward

Primer reverse

ddH<sub>2</sub>O

PCR plate

Templat DNA

Pipette

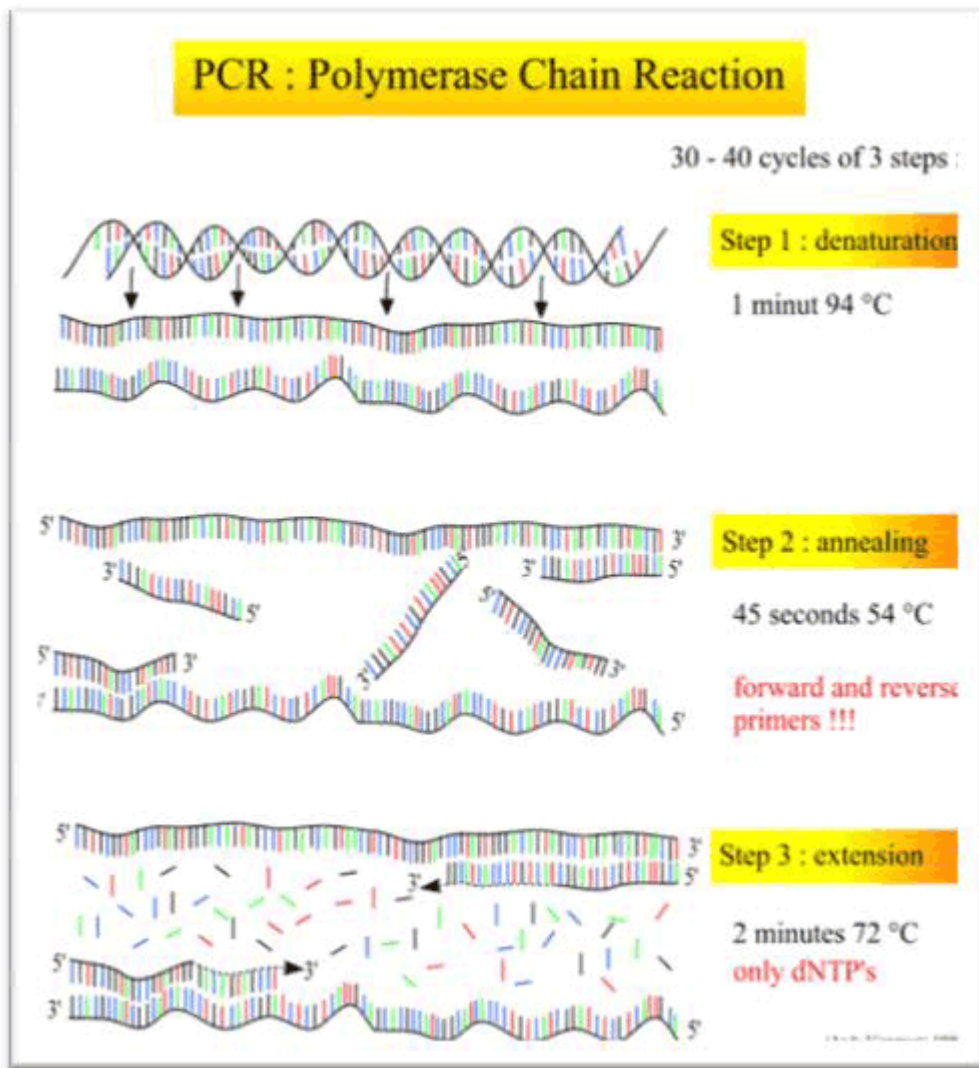
Pipettespisser

PCR strips

Sentrifuge

PCR maskin

## 5. Analyseprinsipp



## 6. Kvalitetskontroll

Analysen kvalitetssikres gjennom bruk av positiv kontroll som er laget av DNA isolert fra lakselus eller gjeller.

## 7. Primer

Primer til AGD:

AGD F 18S rRNA 5'-3' GTTCTTTCGGGAGCTGCTGGGAG

AGD R 18S rRNA 5'-3' GAACTATCGCCCGGCACAAAAG

## 8. Arbeidsbeskrivelse

I optimaliseringen varieres magnesiumkloridkonsentrasjonen og ionefritt vann.

Anbefalt tabell å bruke for best optimalisering er tabell 2.

1. Regn ut og bland mastermiks til \_\_\_\_ antall prøver etter følgende tabell:  
Volumet på mastermiks varierer ut i fra hvor mye prøvemateriale vi velger å bruke: Multipliserer «per reaksjon» med så mange prøver vi velger å bruke.

Tabell 1: Tillaging av mastermiks 1 for AGD.

Komponent	Startkonsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2X	7,5 µl		1 X
Primer fwd (5')	10 µl	1,5 µl		1 µl
Primer rwd (3')	10 µl	1,5 µl		1 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µl	0,0 µl		2,0 mM
dH <sub>2</sub> O	nukleasefritt	2,5 µl		-
Totalvolum		13 µl		

Tabell 2: Tillaging av mastermiks 2 for AGD.

Komponent	Startkonsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2X	7,5 µl		1 X

Primer fwd (5')	10 µl	1,5 µl		1 µl
Primer rwd (3')	10 µl	1,5 µl		1 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µl	0,3 µl		2,0 mM
dH <sub>2</sub> O	nukleasefritt	2,2 µl		-
Totalvolum		13 µl		

Tabell 3: Tillaging av mastermiks 3 for AGD.

Komponent	Startkonsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2X	7,5 µl		1 X
Primer fwd (5')	10 µl	1,5 µl		1 µl
Primer rwd (3')	10 µl	1,5 µl		1 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µl	0,6 µl		2,0 mM
dH <sub>2</sub> O	nukleasefritt	1,9 µl		-
Totalvolum		13 µl		

2. Fordel 13 µl mastermiks til hvert PCR rør, mastermiksen holdes avkjølt ved å plassere stativet på en boks med is under pipettering.
3. Tilsett 2 µl templat DNA til hvert rør på en PCR plate/PCR rør. Husk å merke godt hvilket templat DNA som tilsettes i hvert rør. **IKKE TIL NEGATIV KONTROLL!**
4. Negativ kontroll skal kun bestå av mastermiks som en intern kontroll på at ikke mastermiksen har blitt forurenset av DNA.
5. Vortex lett og spinn ned på plate-sentrifuge
6. Analyseres med følgende program:

<b>Reaksjon</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Tid</b>	<b>Antall sykluser</b>
Innledende denaturering	95 °C	10 min	1 syklus
Denaturering	95 °C	30 sek	35 sykluser
Hybridisering	55-62 °C	30 sek	
Polymerisering	72 °C	60 sek	
Polymerisering	72 °C	10 min	1 syklus

## 9. Feilkilder

- Feil ved pipettering
- Forurensing

## 10. Resultatvurdering

Resultatet vurderes ved å sette prøvene i agarose gel med elektrisk spenning, og så ta bilde av DNA-vandringen. Prøvene sammenlignes med positiv og negativ kontroll.

## Vedlegg 4: Prosedyre for optimalisering av *P. theridion*

### 1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre PCR for påvisning av *P. theridion*.

### 2. Omfang

Det skal i følge prosedyren bli gjort mangfoldiggjøring av DNA isolat fra lakselus eller vevsprøver til PCR for å påvise *P. theridion*.

### 3. Bakgrunnsinformasjon

Mangfoldiggjøring av DNA fragmenter fra *P. theridion*.

Syklisk reaksjon som gjennomføres i tre trinn:

Denaturering (95°C) – skiller DNA helix

Hybridisering (58°C) – Primer fester seg til DNA

Polymerisering (72°C) – DNA tråd syntetiseres, optimal temperatur for polymerase

I tillegg kreves en denaturerings tid før syklusene startes for å aktivisere enzym aktiviteten.

### 4. Utstyr og reagens

Utstyr som trengs for å utføre prosedyren, samt alle reagens som trengs for å gjennomføre analysen:

Hansker

Eppendorfrør

Polymerase

MgCl<sub>2</sub>

Primer forward

Primer reverse

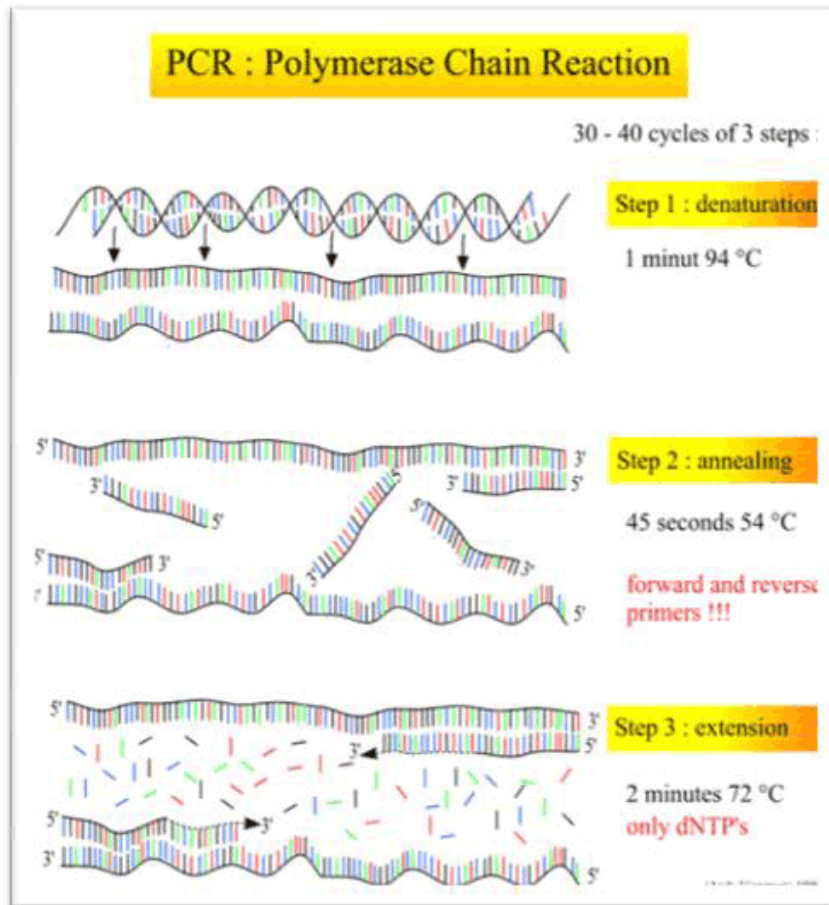
ddH<sub>2</sub>O

PCR plate

Templat DNA

Pipette  
Pipettespisser  
PCR strips  
Sentrifuge  
PCR maskin

## 5. Analyseprinsipp



## 6. Kvalitetskontroll

Analysen kvalitetssikres gjennom bruk av positiv kontroll som er laget av DNA isolert fra lakselus eller gjeller.

## 7. Primer

Primer til *P. theridion*:

NucF *P. theridion* rRNA 5'-3' CGGACAGGGAGCATGGTATAG

NucR *P. theridion* rRNA 5'-3' TCCCATCAATTTCCAACGGC

## 8. Arbeidsbeskrivelse

I optimaliseringen varieres magnesiumkloridkonsentrasjonen og ionefritt vann.

Anbefalt tabell å bruke for best optimalisering er tabell 3.

1. Regn ut og bland mastermiks til \_\_\_\_ antall prøver etter følgende tabell:  
Volumet på mastermiks varierer ut i fra hvor mye prøvemateriale vi velger å bruke: Multipliserer «per reaksjon» med så mange prøver vi velger å bruke.

Tabell 1: Tillaging av mastermiks 1 for *P. theridion*.

Komponent	Startkonsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2X	7,5 µl		1 X
Primer fwd (5')	10 µl	1,5 µl		1 µl
Primer rwd (3')	10 µl	1,5 µl		1 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µl	0,0		2,0 mM
dH <sub>2</sub> O	nukleasefritt	2,5 µl		-
Totalvolum		13 µl		



Tabell 2: Tillaging av mastermiks 2 for *P. theridion*.

Komponent	Startkonsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2X	7,5 µl		1 X
Primer fwd (5')	10 µl	1,5 µl		1 µl
Primer rwd (3')	10 µl	1,5 µl		1 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µl	0,3 µl		2,0 mM
dH <sub>2</sub> O	nukleasefritt	2,2 µl		-
Totalvolum		13 µl		

Tabell 3 Tillaging av mastermiks 3 for *P. theridion*.

Komponent	Startkonsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2X	7,5 µl		1 X
Primer fwd (5')	10 µl	1,5 µl		1 µl
Primer rwd (3')	10 µl	1,5 µl		1 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 µl	0,6 µl		2,0 mM
dH <sub>2</sub> O	nukleasefritt	1,9 µl		-
Totalvolum		13 µl		

2. Fordel 13 µl mastermiks til hvert PCR rør, mastermiksen holdes avkjølt ved å plassere stativet på en boks med is under pipettering.
3. Tilsett 2 µl templat DNA til hvert rør på en PCR plate/PCR rør. Husk å merk godt hvilket templat DNA som tilsettes i hvert rør. IKKE TIL NEGATIV KONTROLL!
4. Negativ kontroll skal kun bestå av mastermiks som en intern kontroll på at ikke mastermiksen har blitt forurenset av DNA.
5. Vortex lett og spinn ned på plate-sentrifuge
6. Analyseres med følgende program:

<b>Reaksjon</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Tid</b>	<b>Antall sykluser</b>
Innledende denaturering	95 °C	10 min	1 syklus
Denaturering	95 °C	30 sek	35 sykluser
Hybridisering	55-62 °C	30 sek	
Polymerisering	72 °C	60 sek	
Polymerisering	72 °C	10 min	1 syklus

## **9. Feilkilder**

- Feil ved pipettering
- Forurensing

## **10. Resultatvurdering**

Resultatet vurderes ved å sette prøvene i agarose gel med elektrisk spenning, og så ta bilde av DNA-vandringen. Prøvene sammenlignes med positiv og negativ kontroll.

## **Vedlegg 5: Prosedyre for gelelektroforese**

### **1. Hensikt**

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre deteksjon av PCR produkter med 2 % agarosegel farget med GelRed™.

### **2. Omfang**

Prosedyren gjelder for PCR produkter laget ved laboratoriet på Høgskolen i Ålesund.

### **3. Bakgrunnsinformasjon**

Biokjemisk teknikk som benytter et elektrisk felt til å separere organiske molekyler. DNA fragmenter blir skilt på grunnlag av størrelse og ladning.

Det finnes to hovedtyper av gelmateriale som brukes ved separasjon av DNA:

polyakrylamid og agarose. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. For å skille store DNA-fragmenter brukes lav konsentrasjon av agarose.

### **4. Utstyr**

Loading dye

Agarose pulver

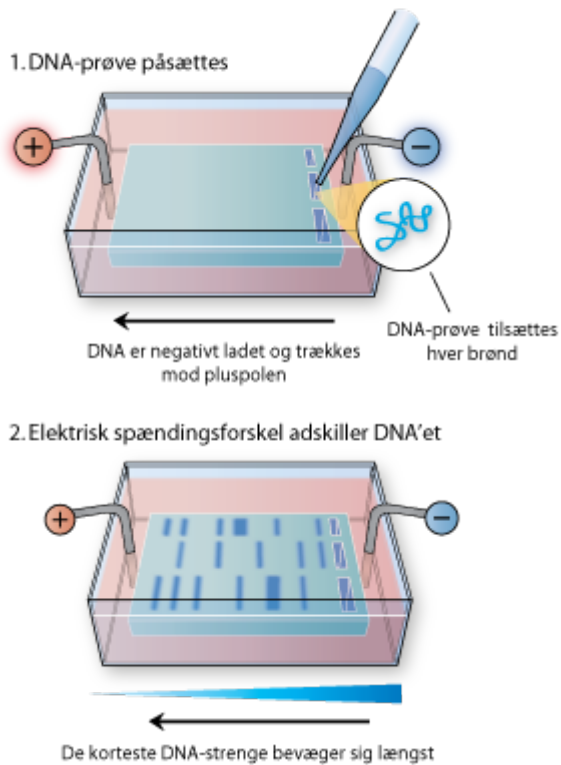
1x TAE buffer

GelRed™

Erlendmeyer kolbe

Termometer

## 5. Analyseprinsipp



Bilde 1. Prinsipp for gelelektroforese. DNA prøve tilsettes. Den negative DNA tråden vandrer i den elektriske spenningen mot den positive polen.

## 6. Kvalitetskontroll

Positiv og negativ kontroll fra PCR analysen

## 7. Prøvemateriale

PCR produkt

## 8. Fremgangsmåte

1. Vei opp: 1,8g Agarose
2. Mål opp: 80 mL 1x TAE buffer

3. Blandes i en 500 mL erlenmeyerkolbe
4. Kokes ved fullstyrke i mikrobølgeovn i 2 minutter
5. Ta forsiktig ut → OBS!! Kan sprutkoke ved omrøring
6. Rør forsiktig om og sjekk at all agarose er oppløst
7. Tilsett 1,0 µl GelRed. Rør forsiktig om slik at fargestoffet fordeler seg likt i væsken
8. Kjøles ned til 65 °C
9. Overfør agarose til gelkar, sett i kammer og la stivne
10. Tilsett 1 µl loading dye (LD) til 3 µl PCR prøve.
11. 3 µl prøve tilsettes brønnene
12. La stå med spenning 45 min ved 100V
13. Overfør fra elektroforesekar til UV lampe og ta bilde

## 9. Feilkilder

Skjev gel

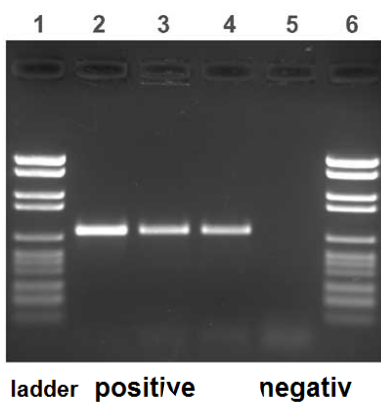
Feil buffer

Variierende spenning

Feil ved pipettering

Luftbobler i gelen

## 10. Resultatvurdering



Bilde 2. Bildet illustrerer positive og negativ prøver ved siden av kontrollen (ladder).