



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

# Bacheloroppgave

**BI301305 - Bacheloroppgave**

**Etablering av PCR analyser til fenotyping av  
Escherichia Coli**

10013 og 10026

Totalt antall sider inkludert forsiden: 65

Innlevert Ålesund, 05.06.2017

## 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 <u>betrakte som fusk</u> 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 Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiattkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<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 og Gro Hagen Bjørnøy

## 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 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: 03.06.2017

**Antall ord: 6925**

## **Forord**

Denne bacheloroppgaven er en avsluttende del av bachelorgraden ved bioingeniørstudiet ved institutt for biologiske fag ved NTNU i Ålesund. Oppgaven handler om å etablere en PCR metode for påvising av *Escherichia coli*, og karakterisering av fenotypiske egenskaper. Oppgaven har vært svært lærerik og gitt oss mye informasjon om spennende temaer.

Vi vil rette en stor takk til Ann Kristin Tveten som har veiledet oss gjennom denne oppgaven. Hun har vært tilgjengelig for oss store deler av tiden og har alltid vært behjelpelig med alt vi har lurt på i denne perioden. Vi vil også takke Gro Hagen Bjørnøy for hennes kunnskap innenfor fagområdet som hun har formidlet videre til oss og har vært behjelpelig når det kommer til å gi oss prøvemateriale og hjelp på laboratoriet. Vi vil også rette en takk til Heidi Engstrøm for hjelp på laboratoriet.

## **Sammendrag**

Formålet med denne oppgaven er å optimalisere to PCR metoder, for å kunne skille mellom ulike typer E. coli. Metodene er etablert men de har ikke vært 100% spesifikk frem til nå (1, 2, 3). Vår hensikt er å kunne etablere disse metodene her på laboratoriet ved NTNU Ålesund.

E. coli ble kultivert fra råvann og DNA ble isolert ved hjelp av DNeasy blood & tissue kit. Disse prøvene ble analysert ved ulike PCR-metoder. Prøvene ble visualisert ved hjelp av gelelektroforese. Den beste sammensetningen ble temperaturoptimalisert og vi har skrevet tre prosedyrer på bakgrunn av resultatene.

## **Ordliste**

Antigen – molekyler som kan fremkalle en immunologisk respons

Cytotoksin – enhver substans som har en toksisk effekt på en celle

DNA-ladder – noe man kan måle størrelsen på DNA-bånd

Enzym – en biologisk katalysator

Eppendorfrør – små blandingsrør

Erlenmeyerkolbe – glasskolbe

Flagell - trådformet proteinutløper fra cellemembranen som får cellen til å bevege seg

Fylogeni – slektskapstre

Gen – en del av DNA som koder for proteiner. Rekkefølgen på tre nukleotider om gangen, koder for en bestemt aminosyre.

Genom – det totale DNA-innholdet til en organisme.

Invasivitet - når en bakterie sprer seg fra en del i en organisme til en annen del

Komplimentær – i PCR sammenheng betyr det at hvert nukleotid i en DNA sekvens, blir arrangert til sitt spesifikke nukleotid. A til T, og G til C

Lokus – angir posisjonen til et gen eller en DNA-sekvens i et kromosom

Mastermix – en konsentrert løsning som inneholder komponenter for å kunne analysere PCR

Multiplex PCR – en PCR teknikk som benytter flere primerpar i samme reaksjonsløsning

Mutasjon – forandring av et gen under en celledeling

Nukleotid – DNA-sekvensens byggesteiner. Det finnes fire forskjellige nukleotid i DNA (A - Adenin, T - Tymin, C - Cytosin, og G - Guanin.)

Patogen – sykdomsfremkallende agens

PCR – Polymerase Chain Reaction. En metode som kopierer DNA, og dobler antallet DNA for hver runde

Pili - trådlignende utvekst fra cellemembranen

Primer – en kort DNA sekvens som må feste seg til DNA før polymerase kan starte å kopiere

DNA-Sekvens - rekkefølgen på DNA nukleotider

Serotype – en gruppe bakterier innenfor en bestemt art

TAE-buffer – en buffer som blir brukt til agarose gelelektroforese

Taq polymerase – et protein som er varmestabilt og kan syntetisere nytt DNA.

Templat DNA – en DNA tråd som er utgangspunktet for DNA sekvensen, som blir klonet under PCR

Virulensfaktor – bakteriens evne til å fremkalle sykdom

Zoonose – infeksjonssykdom som kan smittes fra dyr til mennesker

## Innholdsliste

1. Innledning.....	4
1.1 Bakgrunn og Hensikt .....	4
1.2 Problemstilling.....	5
2. Teori .....	6
2.1 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	6
2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	9
2.3 Gel elektroforese.....	13
2.4 kvalitetssikring.....	15
3. Materiale og Metode .....	17
3.1 Prøvemateriale .....	17
3.2 Primere.....	17
3.3 Multiplex PCR.....	18
3.4 Gelelektroforese.....	19
3.5 Temperaturoptimalisering .....	21
3.6 MLST.....	21
4. Resultat.....	22
4.1 Multiplex PCR.....	22
4.2 Multi Locus Sequence Typing (MLST) .....	28
5. Diskusjon.....	30
6. Konklusjon .....	33
7. Referanser.....	33



# 1. Innledning

## 1.1 Bakgrunn og Hensikt

Denne oppgaven ble valgt fordi vi så at den ville gi oss mye tid på laboratoriet. Molekylærbiologi er i stor fremmarsj og det er et veldig aktuelt tema i dagens samfunn. Det å tilegne seg kunnskap innenfor dette, virket spennende og engasjerende. Det at vi kunne få lov til å bli med å gjøre en metode bedre basert på våre egne resultat var en av hovedårsakene til at valget falt på denne oppgaven.

Formålet med denne oppgaven er å optimalisere to PCR metoder, for å kunne skille mellom ulike typer *E. coli*. Metodene er etablert men de har ikke vært 100% spesifikk frem til nå (1, 2, 3). Vår hensikt er å kunne etablere disse metodene her på laboratoriet ved NTNU Ålesund. Selv om vi optimaliserer metodene, og de fungerer bra her, så vil det være forskjeller ifra laboratorier til laboratorier. Om metoden blir brukt på andre laboratorier må metoden optimaliseres igjen.

Oppgaven ble gitt til oss den 20. Mars 2017 og innleveringsfrist var satt til 06. Juni 2017. Det ble brukt 10 dager på planlegging av å finne aktuell teori og forberedelser til lab forsøk. Vi begynte med lab arbeid den 30. Mars og ble ferdig med laboratoriearbeidet den 05. Mai. Den resterende tiden frem mot innleveringsfristen ble brukt til å skrive bacheloroppgaven. Alt av ressurser og materiale som vi trengte til laboratoriearbeidet var tilgjengelig på laboratoriet.

I teoridelen forsøker vi å gi leseren bakgrunnsinformasjon om *E. coli* og PCR metodikk. Dette for å gi leseren en forståelse for alle metodene som ble brukt i denne bacheloroppgaven. Vi vil også gi leseren en oversikt over ulike typer *E. coli* og viktigheten av å ha en metode som effektivt kan skille mellom de ulike undergruppene. Under materiale og metode tar vi for oss fremgangsmåten vi har gjort. Vi har prøvd å gjengi dette så nøyaktig som vi gjorde det, slik at lesere kan gjøre

forsøket om igjen og eventuelt forbedre metoden. Resultatet gir en oversikt over de avgjørende resultatene vi fikk og de vi kunne arbeide videre med. Diskusjonen tar for seg resultatene der vi diskuterer spesifisiteten til metoden og sammenligner med tidligere forsøk.

## 1.2 Problemstilling

Etablering av PCR metodikk for påvising av *E. Coli*, og karakterisering av fenotypiske egenskaper.

## 2. Teori

### 2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

*E. coli* er en art bakterie fra slekten *Escherichia* som er en familie av *Enterobacteriaceae*. *E. coli* er en gram-negativ stavbakterie som består av en cellevegg, en yttermembran, flageller og piler (1, s. 607). *E. coli* er en veldig lett bakterie å dyrke frem i laboratorier og er derfor en godt dokumentert bakterie (2).

*E. coli* er altså en stor og mangfoldig gruppe bakterie som alle mennesker og dyr har i den normale tarmfloraen sin. Bakterien er ikke skadelig med mindre den befinner seg utenfor tarmen, utenom enkelte patogene typer *E. coli* som kan gi alvorlige tarminfeksjoner (3). *E. coli* er en zoonotisk bakterie, noe som vil si at den kan smitte fra dyr til menneske. Mennesker kan også bli smittet fra dårlig tilberedt kjøtt og fra forurenset drikkevann (4). *E. coli* har også en del gode egenskapet og fungerer som en del av immunsystemet vårt ved å ta opp plass i tarmen slik at andre patogene bakterier ikke får plass her. Bakterien hjelper også til med fordøyelsen og produserer vitamin K (4, s.612).

Patogene *E. coli*-stammer blir kategorisert basert på hvordan de kan få frem en immunrespons hos dyr ved hjelp av antigener. Disse er O-antigen (en del av lipopolysakkarid), K-antigen (kapselen) og H-antigen (flageller). Yttermembranen til en *E. coli* celle består av millioner av lipopolysakkaridmolekyler (4, s.612).

En del av dette lipopolysakkaridet består av O-antigen og dette O-antigenet blir brukt til å serotype *E. coli*. Disse O-gruppene går fra O1 til O181. Det er enkelte unntak der noen av O-gruppene er blitt fjernet (4, s. 612).

K-antigenene blir delt i to grupper, gruppe 1 antigen og gruppe 2 antigen basert på hvor mye masse de har (gruppe 1 består av høy masse og gruppe 2 består av lav masse). Gruppe 1 antigen finner man bare i enkelte O-grupper og man deler gruppe 1 antigen i to grupper, de som har aminosukker og de som ikke har aminosukker. Gruppe 2 antigener ligner på de i gram positive

bakterier og varierer mye i sammensetningen. De deles inn basert på hvor sure komponentene deres er (4, s. 612).

H-antigenet er en del av bakterien sine flageller og hjelper til med å bevege bakterien. Det finnes 53 forskjellige typer H-antigen (4, s.612).

Patogene *E. coli* kan deles inn i forskjellige grupper avhengig av sykdomsforløp og virulensfaktorer. De mest kjente gruppene er EHEC, ETEC, EPEC og EIEC.

#### *STEC (Shigatoksinproduserende E. coli)*

STEC blir ofte kalt for verotoksinproduserende *E. coli* eller VTEC. Shigatoksinproduserende *E. coli* har den egenskapen at de kan produsere en eller to cytotoxiner som er Stx1 og Stx2 (4, s.617). STEC lever normalt i mage- og tarm-regionen hos dyr, og det er spesielt fra kyr, mennesker blir smittet fra (5).

#### *EHEC (Enterohemoragiske E. coli)*

Enterohemoragiske *E. coli* er navnet på de humanpatogene variantene av STEC (shigatoksin produserende *E. coli*)(4, s.613). Enterohemoragiske *E. coli* kan deles inn i forhold til shigatoksin (stx), serotype (o-gruppe) og andre virulensfaktorer. Enterohemoragiske *E. coli* kan gi diare, oppkast og hemolytisk uremisk syndrom (HUS) (6). Klassifiseringen av EHEC når det kommer til HUS eller lavvirulent *E. coli* gjøres hovedsakelig på bakgrunn av stx-profilen. Shigatoksinet forekommer i to varianter, stx1 og stx2. Intimin som er kodet fra eae-genet er tilstede i mange HUS-assosierte EHEC (6). Den mest kjente serotypen som går innunder enterohemoragiske *E. coli*, er O157:H7 som er kjent for navnet "hamburgerbakterien" etter å ha forårsaket matforgiftning i dårlig tilberedt kjøtt (6).

#### *EIEC (Enteroinvasive E. coli)*

EIEC er en patogen bakterie som ligner veldig på *Shigella* når det kommer til sykdomsforløp. Bakterien invaderer epitelceller i tarmen og sprer seg videre til nærliggende epitelceller. Infeksjonen gir som regel mild diare, men kan forårsake blodig diare, magesmerter og feber (3).

For å kunne påvise EIEC så ser man etter et gen som koder for invasivitet. Dette genet finnes også hos *Shigella*, så for å kunne skille mellom EIEC og *Shigella*, må man dyrke bakterien etter påvisning av gen for så å sende isolatet til referansepåvisning (4, s.616).

#### *EPEC (Enteropatogene E. coli)*

Enteropatogen *E. coli* var den første erkjente gruppen med *E. coli* som ga diare. Dette skjedde etter et stort utbrudd på 1940-tallet da det ble påvist at det var *E. coli* som stod bak spedbarns enteritt på institusjoner (9). Et av EPEC sitt kjennemerke er at den fester seg på epitelceller og ødelegger mikrovilli i prosessen. Den fester seg til epitelceller ved hjelp av intimin som er et protein som er kodet fra eae-genet (4, s.613).

#### *ETEC (Enterotoksigene E. coli)*

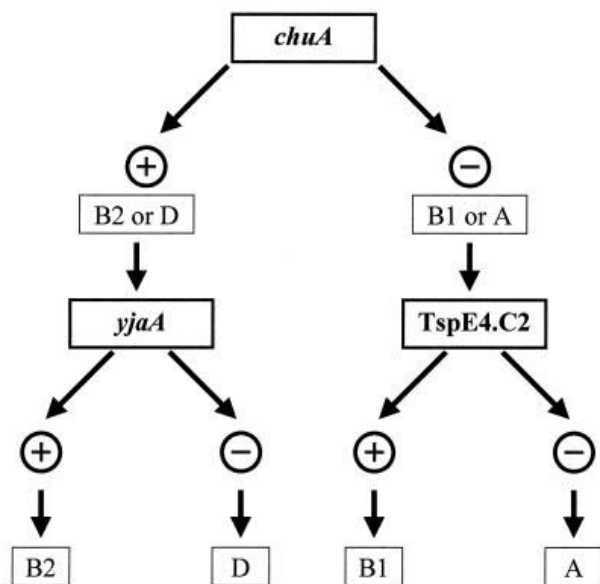
Enterotoksigene *E. coli* er en patogen bakterie som gir diare i både mennesker og dyr.

Enterotoksigene *E. coli* invaderer ikke epitelet men produserer toksiner som er varmelabil eller varmestabil (6).

#### *Fylogeni*

*E. coli* kan deles inn i fem forskjellige fylogenetiske hovedgrupper. Disse fylogenetiske gruppene er dannet på grunnlag av ECOR (*Escherichia coli* Collection of Reference). Der har man en samling av stammer med *E. coli* fra mennesker og stammer med *E. coli* fra pattedyr fra forskjellige steder i verden. Disse hovedgruppene er A, B, (B1, B2) C, D og E (4, s.611).

Bruker man Assay 1, hvor man kan påvise chuA, yjaA og tspE4, kan man bruke et bestemmelsestre, for å avgjøre hvilken fylogenetisk gruppe man kan tildele en bakterie (1).



Figur 1. Figuren skiller mellom fire av de fylogenetiske undergruppene til *E. coli*: A, B1, B2, og D. Om et gen gir positivt utslag på elektroforesen, går man etter den pilen som peker på "+". Om en et gen gir negativt utslag, går man etter pilen som peker mot "-". Til slutt skal man sitte igjen med en av de fire undergruppene som svar (1).

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en sensitiv metode som bruker DNA polymerase sin egenskap, som er å danne komplementære DNA tråder, fra templat tråder (10). DNA polymerase klarer kun å kopiere DNA, om den har 3'-ende sin frie OH<sup>-</sup> gruppe tilgjengelig på grunn av dette så må man ha med en primer i reaksjonsløsningen (10). Når primeren er festet på templattråden, kan polymerasen starte kopieringen fra primeren sin frie OH<sup>-</sup> gruppe (10). PCR blir gjentatt i flere sykluser, hvor antall DNA tråder teoretisk blir doblet for hver runde (10). Om man gjør dette nok sykluser ender man opp med rikelig av identiske DNA tråder (10). Man kan også bruke primere som er spesifikke for bestemte gen, om man vet hvilke primere man trenger, for da vil primerne feste seg på sine komplementære sekvenser, på hver sin side av det ønskede genet man vil replikere(7). Da ender man opp med kopier av et spesifikt gen, istedenfor kopier av et helt genom (10).

### *Komponenter i en PCR reaksjonsmik*

Templat DNA: Dette er prøve DNA som inneholder sekvensen man er ute etter å replikere (8).

DNA polymerase: Dette er enzymet som står for å arrangere komplementære nukleotider til templat-tråder fra primere (10). I PCR brukes *taq* DNA-polymerase, på grunn av sin evne til å tåle høye temperatur forandringer (10).

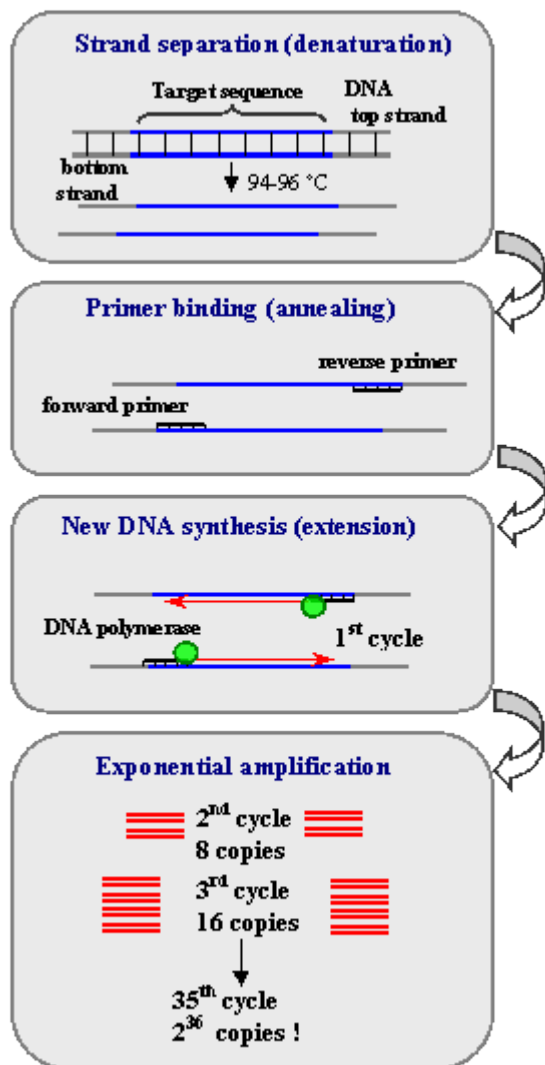
Primer: En kort enkeltrådet DNA bit som er komplementær til enden på målsekvensen. Primere brukes i par. En primer til hver DNA tråd, siden en primer passer til 5' - 3' tråden, mens den andre primeren passer til 3' - 5' tråden (10). Primerne i løsningen skal heller ikke ha komplementære 3' ender til hverandre, om de har det, vil de feste seg til hverandre og danne primer dimers, som kan gi utslag på elektroforesen (10).

Nukleotider (dNTP): dNTP er nukleotider som må være tilstede i reaksjonsmiksen for at polymerasen skal ha byggesteiner til å lage nytt DNA av (11).

MgCl<sub>2</sub>: Magnesium fungerer som en kofaktor for polymerase. Jo mer magnesium man har i reaksjonsmiksen, jo mer produktiv blir polymerasen. Men har man i for mye, så blir svaret mindre spesifikt (10).

#### *varmesyklus*

PCR prosessen foregår inne i en varmeblokk som helt enkelt endrer temperaturen til prøvene, inndelt i en initierende denatureringsfase, 25 – 35 sykluser med denaturering, hybridisering og elongering, og til slutt en avsluttende elongering før temperaturen blir kjølt ned.



Figur 2. Figuren illustrerer hva som skjer i PCR reaksjonsmiksen inne i en varmeblokk (11). Det første steget illustrerer denaturering, det andre bildet illustrerer hybridisering, det tredje bildet illustrerer elongering, og det siste bildet illustrerer hvordan DNA-produktet doubles i antall etter hver syklus.

Denaturering:

Reaksjonsmiksen blir varmet opp til en temperatur (94-98°C (10)) som vil bryte hydrogenbindingene mellom dobbeltrådet DNA, slik at dobbeltråden deles til to enkeltråder.

Hybridisering:

Temperaturen i reaksjonsmiksen blir senket til en temperatur (52-58°C, kan utvides til 45-65°C



(10) , som gjør det mulig for de spesifikke primerene, å feste seg på den sekvensen som er komplementær til sin egen sekvens. Er temperaturen høyere, blir det vanskeligere for primere, å feste seg til templatet, men primeren blir mer spesifikk (10).

Elongering:

Temperaturen økes til en temperatur (70-80°C (10)) som er optimal for at DNA polymerasen kan feste komplementære nukleotid til enkeltråden med DNA, fra 3' enden til primeren. Etter denne prosessen har antall DNA tråder økt eksponentielt for hver syklus (11). Alle tre stegene i syklusen blir gjentatt i samme rekkefølge rundt 25 – 35 sykluser (10), slik du teoretisk sett ender opp med milliarder av DNA biter i reaksjonsmiksen (11).

### *Multiplex PCR*

Multiplex PCR er en PCR metode hvor man bruker flere primerpar i samme reaksjonsmikse, istedenfor bare ett par. Når man har flere primerpar i samme reaksjonsmikse, blir optimalisering vanskeligere, på grunn av at man da har flere variabler å forholde seg til. Hver primer har sitt reaksjonsforhold som er optimalt, slik at jo flere forskjellige primere man har å forholde seg til, jo vanskeligere blir det å finne ett reaksjonsforhold som fungerer for alle. Når man har en optimalisert Multiplex PCR metode, har man en billigere og raskere metode å analysere flere gener samtidig med, siden man bruker færre brønner, reagenser og minutter på å analysere alt på en gang (9).

### *Touchdown PCR*

Touchdown PCR er en PCR metode der man har konstant denaturerings- og elongerings-temperatur, men man gradvis endrer annealing-temperatur (13). Det vil si at man starter varmesyklusen med en start denaturering noen minutter og videre til 25 – 35 sykluser med

denaturering, annealing, og elongering (10). Annealing temperaturen i touchdown PCR skal starte relativt høyere i forhold til temperaturen som antar passer til primerene, og for hver syklus skal temperaturen synke med 1°C (man kan velge mer eller mindre endring per syklus). Etter omtrent 10 sykluser, skal annealing temperaturendringen stoppe, og holder konstant temperatur resten av syklusene (13). Da har man på en av annealingtemperaturene truffet den mest optimale temperaturen som er både spesifikk og effektiv, slik at det på et tidspunkt i nedtrappingen ble dannet et godt utgangspunkt av spesifikke DNA tråder, som gjør at det er lettere å kopiere flere DNA biter ved lavere og mindre optimale annealingtemperaturer (13).

Touchdown PCR er veldig nyttig når det kommer til å optimalisere reaksjonsmikstil PCR. Ved hjelp av touchdown PCR kan man fokusere på å finne det beste mulige blandingsforholdet i reaksjonsmiksen, mens man analyserer med touchdown PCR. Etter at man har funnet ut det, så kan man i ettertid starte en egen temperaturoptimalisering med den optimale løsningen, ved å prøve forskjellige hybridiseringstemperaturer til man finner den mest spesifikke (13). Dette gjør optimaliseringen til en billigere og raskere prosess (10).

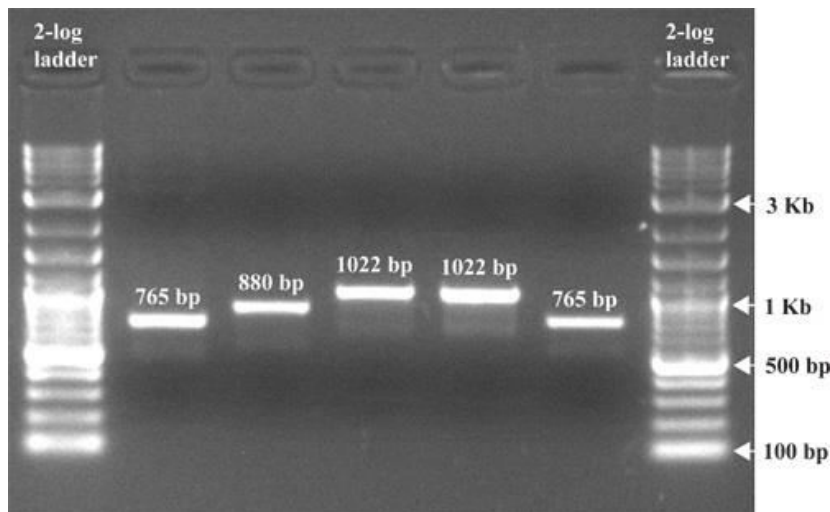
### 2.3 Gel elektroforese

Gel elektroforese er en metode som gjør det mulig å separere DNA biter fra 100 til 25000 basepar i lengde (11). Agarose gel består av 1x TAE-buffer, Gelred, L- og D-galaktose enheter. galaktose enhetene danner et nettverk av ikke kovalente bindinger, som gjør at gelen har porer, og størrelsen på porene avgjør hvor lett DNA kan passere. Det vil si at jo høyere konsentrasjon med agarose som er i gelen, jo mindre og tettere blir porene (14).

For å separere DNA, pipetteres det i brønner på den siden av gelen med negativ pol, på grunn av at DNA er negativt ladet (14). Dette gjør at når det blir tilført strøm i gelen, så vil det negativt ladde DNAet bevege seg mot den siden av gelen med positiv pol (14). De korte DNA bitene vil lettere passere gjennom porene, på grunn av mindre motstand, mens de større bitene gir høyere friksjon, og vil dermed bevege seg tregere (14). På samme måte vil større porer i gelen gi mindre

motstand, og mindre porer gi større motstand, slik at høy konsentrasjon på gelen vil gjøre det lettere å separere mindre DNA tråder, mens lav konsentrasjon vil gjøre det lettere å separere større DNA tråder (14).

For å avgjøre lengden på en DNA prøve, må man sammenligne prøven med en DNA standard, også kalt ladder (14). Denne standarden inneholder en blanding av DNA biter med forhåndsbestemte størrelser, så man må alltid ha med ladder for å kunne sammenligne den med prøve DNAet for å kunne finne ut størrelsen til prøve DNAet (14).



Figur 3. Viser gelelektroforese med en DNA-standard på venstre og høyre side av gelen. Mellom dem er fem prøver med DNA, hvor man ser hvordan man kan bestemme størrelse basert på hvor langt båndene vandrer i gelen (14).

For å kunne se DNA båndene er det viktig at Gelen er farget med riktig farge. Avleseren visualiserer DNA bitene etter separasjon ved hjelp av UV lys (14). Derfor brukes EtBr eller Gelred<sup>T</sup>, fordi det gjør at DNA trådene blir farget på vei gjennom porene i gelen. Da er DNAet lesbart i UV-avleseren (14).

### *Multilocus sekvenstyping (MLST)*

MLST er en PCR metode man bruker for å type forskjellige locus. Metoden karakteriserer isolater fra mikrober ved å bruke DNA sekvenser, fra gener som blir brukt til å opprettholde enkle og grunnleggende cellefunksjoner. MLST er en PCR-metode som måler forskjellen i DNA-sekvensene i husholdningsgenene og karakteriserer disse stammene ut i fra deres alleliske profiler.

Metoden involverer flere analyseringer med PCR, hvor man bruker primere som amplifiserer nøye utvalgte gen, etterfulgt av sekvensering av disse genene (13). Når man har sekvenseringsdataen, kan man bruke bioinformatikk, for å sammenligne dataen med referansegen fra en database med flere referansegen.

MLST er en metode som er basert på metoden multilocus enzym elektroforese (MLEE). MLEE er en metode som er basert på prinsippet om at mutasjoner i gener som koder for bakterielle metabolske enzymer, kan detekteres ved forskjeller i enzymenes evne til å vandre ved elektroforese (14).

### *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)*

MEGA er et bioinformatisk- verktøy som man kan bruke til å justere analysere sekvensere, beregne baseparfrekvenser, formatere til fasta-filer og konstruere fylogenetiske trær (<http://www.megasoftware.net/mega41.html> ).

## 2.4 kvalitetssikring

Kvalitet har med oppfyllelse av krav, behov og forventninger å gjøre. I forsøk er det viktig å ha med kontroller. Dette er enten en positiv kontroll, negativ kontroll eller begge deler. En positiv kontroll er en kontroll som du vet skal slå positivt ut på og som man kjenner til verdien av. En negativ kontroll er en kontroll som man vet skal slå ut negativt på. Om det da skulle bli negativt i

den positive kontrollen og positivt i den negative kontrollen så vet man at det har skjedd en forurensing eller at blandingsforholdet er feil.

### 3. Materiale og Metode

#### 3.1 Prøvemateriale

Gruppen fikk tildelt 17 ulike prøver som ble kultivert direkte fra råvann, ifra drikkevannet i Ålesund. Disse prøvene var ferdig målt konsentrasjon på og isolert ved hjelp av et DNeasy blood and tissue kit. Prøvene skulle være renkultur av *E. coli*. Gruppen hadde tilgang til mer prøvemateriale om det skulle bli mangel på det vi hadde. Prøvematerialet var fryst ned første gangen, men ble lagret i kjøleskap etter dette.

#### 3.2 Primere

Tabell 1. Multiplex PCR Assay 1: Invitrogen av Thermo Fisher Scientific. Primerparene i tabellen er designet for amplifisering av tre gen, og blir brukt for å skille mellom fire fylogenetiske undergrupper av *E. coli*. Disse primerne er også blitt brukt til denne typen karakterisering tidligere (1). Tabellen viser primerne parvis med en forward- (F), og en revers- (R) primer. Man får også se sekvens og lengde på primer, etterfulgt av lengden på PCR-produktet til primersettet oppgitt i basepar (bp).

Primer	Sekvens (5' - 3')	Lengde	Produktlengde
chuA1F	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	20bp	279bp
chuA1R	TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	20bp	
yjaA 1F	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	20bp	211bp
yjaA 1R	ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	21bp	
TspE4C2 1F	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA	20bp	152bp
TspE4C2 1R	CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	20bp	

Tabell 2. Multiplex PCR Assay 2: Invitrogen av Thermo Fisher Scientific. Primerparene I tabellen er designet for amplifisering av fire forskjellige gen. Hvor hvert av genene koder for hver sine virulente egenskaper I sammenheng med *E. coli*. Disse primerne er blitt brukt til denne typen karakterisering tidligere (2). Primerne er arrangert parvis, hvor man har en forward (F) og en reverse (R) primer til samme genet. lengde på primer og PCR-produktets lengde er oppgitt i antall basepar (bp).

Primer	Sekvens (5' - 3')	Lengde	Produktlengde
stx1F	ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC	23bp	180bp
stx1R	AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	21bp	
stx2F	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	21bp	255bp
stx2R	TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	22bp	

eaeAF	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	20bp	384bp
eaeAR	CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	20bp	
hlyAF	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	21bp	534bp
hlyAR	AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T	22bp	

Tabell 3. Multilocus sequence typing: Invitrogen av Thermo Fisher Scientific. Primerparene I tabellen er designet, for å amplifisere syv av *E. coli* sine gen. Primerne er arrangert parvis, hvor hvert par har en forward- (F) og en reverse- (R) primer, til samme gen. Lengden til primer og PCR-produkt, er oppgitt i antall basepar (bp).

primer	Sekvens (5' - 3')	lengde	produktlengde
adkF	ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG	20bp	583bp
adkR	CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT	20bp	
fumCF	TCA CAG GTC GCC AGC GCT TC	20bp	806bp
fumCR	GTA CGC AGC GAA AAA GAT TC	20bp	
gyrBF	TCG GCG ACA CGG ATG ACG GC	20bp	911bp
gyrBR	ATC AGG CCT TCA CGC GCA TC	20bp	
icdF	ATG GAA AGT AAA GTA GTT GTT CCG GCA CA	29bp	878bp
icdR	GGA CGC AGC AGG ATC TGT T	19bp	
mdhF	ATG AAA GTC GCA GTC CTC GGC GCT GCT GGC GG	32bp	932bp
mdhR	TTA ACG AAC TCC TGC CCC AGA GCG ATA TCT TTC TT	35bp	
purAF	CGC GCT GAT GAA AGA GAT GA	20bp	816bp
purAR	CAT ACG GTA AGC CAC GCA GA	20bp	
recAF	CGC ATT CGC TTT ACC CTG ACC	21bp	780bp
recAR	TCG TCG AAA TCT ACG GAC CGG A	22bp	

### 3.3 Multiplex PCR

Først ble det isolerte DNAet tilsatt i eppendorfrør. Rørene ble merket godt slik at det ikke skjedde en pipetteringsfeil i noen av brønnene. Eppendorfrørene ble sentrifugert og mixet i vortexmixeren i 5-6 sekunder hver.

Det måtte lages flere ulike mastermixer. Mastermixene skulle inneholde primere, MgCl<sub>2</sub>, polymerase og nukleasefritt vann. Det skulle lages til to forskjellige typer assay: assay 1 og assay

2. Assay 1 inneholdt primerene, ChuA.1, ChuA2, YjaA.1, YjaA2, TspE4C2.1 og TspE4C2.2. Assay 2 inneholdt primerene, Stx1, Stx2, hlyA og eaeA.

Til hvert assay ble det laget 9 forskjellige mastermixer. Mastermixene varierte i konsentrasjon til  $MgCl_2$  og primere. Det ble laget mastermix med tre forskjellige konsentrasjoner  $MgCl_2$  og disse var; 1,5mM, 2,0mM og 2,5mM. Innenfor hver av disse ble det laget tre forskjellige konsentrasjoner med primere, og disse var; 0,75 $\mu$ m, 1,0 $\mu$ m og 1,5 $\mu$ m. Volum som skulle oppi hvert PCR ble satt til 25 $\mu$ l. Siden det var 17 prøver og 2 negative kontroller så ble hver mastermix ganget med 20, så hver mastermix fikk et volum på 500 $\mu$ l (for å se alle de ulike blandingsforholdene se vedlegg 2). Når mastermixene var ferdig blandet, ble de sentrifugert og mixet i 5-6 sekunder hver.

Alle prøvene skulle oppi PCR-rør. Disse rørene har en rekke på 8. Man måtte altså ha 3 rekker for hver blanding mastermix. Det ble tilsatt 22,5 $\mu$ l mastermix i hvert PCR-rør og 2,5 $\mu$ l DNA slik at total mengde i hvert rør ble 25 $\mu$ l. I de negative kontrollene ble det kun tilsatt mastermix og ingen DNA.

Prøvene ble så gjort klar for PCR-analyse og det ble analysert 3 sett med prøver for hver PCR-analysering. PCR programmet som ble brukt var touchdown PCR. Temperaturene som ble benyttet ved annealing var fra 58°C – 52°C.

### 3.4 Gelelektroforese

For å lage agarosegel begynte man med å lage 1xTAE buffer. Blandingsforholdet mellom 1xTAE-bufferbuffer og destillert vann skulle være 1:50. Det vil si at lager man en 2L blanding så tar man 1960ml destillert vann og 40ml 1xTAE. For å lage agarosegel så ble det blandet agarosepulver med 1xTAE-buffer. Det ble tilsatt 1,6 gram agarosepulver og 80 ml 1xTAE-buffer oppi en erlenmeyerkolbe. Dette ble så satt i en mikrobølgeovn, og dette ble analysert på maksimal temperatur i minimum 2 minutter til pulveret hadde løst seg opp. Man må være



forsiktig når man tar erlenmeyerkolben ut fra mikrobølgeovnen siden det kan sprutkoke. Når det hadde sluttet å koke så ble det tilsatt 1,2 µl med gelred og dette ble blandet forsiktig. Gelen skulle nå kjøles, noe som tok cirka 15 minutter. I mellomtiden ble karene som gelen skal være i gjort klar. Bunnen av karet ble teipet slik at blandingen med gel ikke rant utenfor og ble liggende i ro til gelen stivnet. Når gelen nådde en temperatur på 65°C så ble gelen tilsatt i karet. Her skulle den stå til den stivnet, noe som tok mellom 15-20 minutter. Når gelen ble helt oppi, ble det tilsatt to kammer som skulle lage brønner i gelen. Det ble brukt 2x14 kammer, slik at det ble 28 brønner. Når gelen var ferdig stivnet skulle den få en grå/blå farge. Når gelen så hadde stivnet ble teipen fjernet og karet med gele ble lagt oppi elektroforesekaret. I elektroforesekaret ble det tilsatt 1xTAE buffer slik at den så vidt dekket gelen. Kammene ble så fjernet på en rolig og forsiktig måte slik at brønnene ikke ble ødelagt. Når kammene var fjernet var det viktig å se at alle brønnene var dekket helt med buffer.

DNA-prøvene ble så hentet fra enten PCR-maskinen eller i kjøleskap der de lå lagret. Det ble blandet DNA-prøver med loading dye. Eppendorf-rør ble merket og det ble først tilsatt 2µl loading dye i hvert rør. Etter det ble det tilsatt 2µl prøve-DNA i hvert rør. Det hadde ingenting å si hva man tilsatte først, men om det ble tilsatt prøve-DNA først og så loading dye, så var det viktig å passe på at det ikke blir carryover, om det ble brukt samme pipettespiss ved pipettering av loading dye. Dette ble så sentrifugert og mixet i 5-6 sekunder. Når dette hadde blitt blandet så tok man 2µl av denne blandingen og tilsatte de respektive brønnene (se vedlegg 4, for oppsett). Det var viktig å ha en god armstilling slik at man traff skikkelig oppi brønnene. Om man ikke treffer kan det flyte utover i elektroforesekaret og spolere andre resultater i de andre brønnene. I fire av brønnene ble det tilsatt ladder, dette for å kunne se hvor mange basepar DNA-trådene hadde.

Det ble analysert to elektroforesekar om gangen. I disse elektroforesekarene har man en pluss pol, og en minus pol. Spenningskilden ble satt på begge polene og ved hjelp av bufferen så ga dette prøvematerialet vårt vandringssegenskaper. DNAet vil da vandre mot minuspolen.

Når prøvene er ferdig i PCR-maskinen skal man tilsette loading dye. Man blander prøvemateriale og loading dye i eppendorfrør. 2µl loading dye og 5µl prøvemateriale i hvert eppendorfrør. Dette blandes og sentrifugeres. Når dette er gjort tilsetter man 2µl av denne blandingen oppi sin respektive brønn. Det ble analysert to elektroforesekar om gangen. Man har en pluss pol og en minus pol i hvert kar og DNA-fragmentene vil alltid gå mot minuspolen. Strømkilden ble satt til 50 volt i 10 minutter, før den ble økt til 100 volt i 50 minutter.

Da dette var ferdig ble geleen overført til UV-kameraet slik at man fikk tatt bilde av DNA-fragmentene og fikk resultatet på datamaskinen.

### 3.5 Temperaturoptimalisering

Det beste resultatet fra assay 1 og assay 2 ble brukt på temperaturoptimaliseringen og temperaturene som ble testet på PCR-maskinen var; 56-59°C.

Det beste resultatet på assay 1 var; 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM primer og det beste resultatet på assay 2 var; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM primer. Det var disse to reaksjonsmiksene som ble brukt på temperaturoptimaliseringen. Programmet på PCR-maskinen var som følger:

- Innledende denaturering – 10 minutter på 95°C
- 35 sykluser med:
  - Denaturering – 30 sekunder på 95°C
  - Hybridisering – 30 sekunder på 56/57/58/59°C
  - Elongering – 30 sekunder på 72°C
- Avsluttende elongering – 7 minutter på 72°C
- Avkjøling på 4°C

### 3.6 MLST

Det første som ble gjort var å blande ut primere. Primere ble utlevert i tørt stoff og skulle blandes med destillert vann. Blandingsforholdet skulle være 1/100.

Siden noe av prøvematerialet skulle sendes til sekvensering så måtte det lages totalt 40 $\mu$ l med prøvemateriale: 20 $\mu$ l med polymerase, 15,2 $\mu$ l med destillert vann, 0,4 $\mu$ l med F-primer, 0,4 $\mu$ l med R-primer og 4 $\mu$ l med DNA. Denne gangen var det bare et primerpar oppi hver blanding. Dette for å se at de ulike artene inneholdt genet.

Da alt var blandet ble det satt i PCR-maskinen (se vedlegg 3, for temperaturprogram). Da alle prøvene hadde blitt analysert i PCR-maskinen, skulle alt analyseres med gelelektroforese. Dette ble gjort på helt lik måte som tidligere. Når alt var ferdig analysert i gelelektroforese og alle bildene var tatt så skulle det bli plukket ut 12 prøver som skulle sendes til sekvensering. Det som var viktig var at de prøvene som ble sendt til sekvensering, hadde alle de 7 genene. De prøvene som ble plukket ut var: 2, 3, 5, 6, 14, 16, 17, 18, 20, 24, 25 og 26. 15 $\mu$ l ble pipettert fra hver prøve slik at det ble sendt til sammen 84 forskjellige prøver. 12 DNA-prøver x 7 ulike primere.

Når resultatet kom tilbake etter en uke så analyserte vi alle de godkjente resultatene i programmet Mega 7. MEGA er et bioinformatisk verktøy som ble brukt til å kontrollere sekvenser fra ab1-filer og konstruere allignments og fylogenetiske analyser.

## 4. Resultat

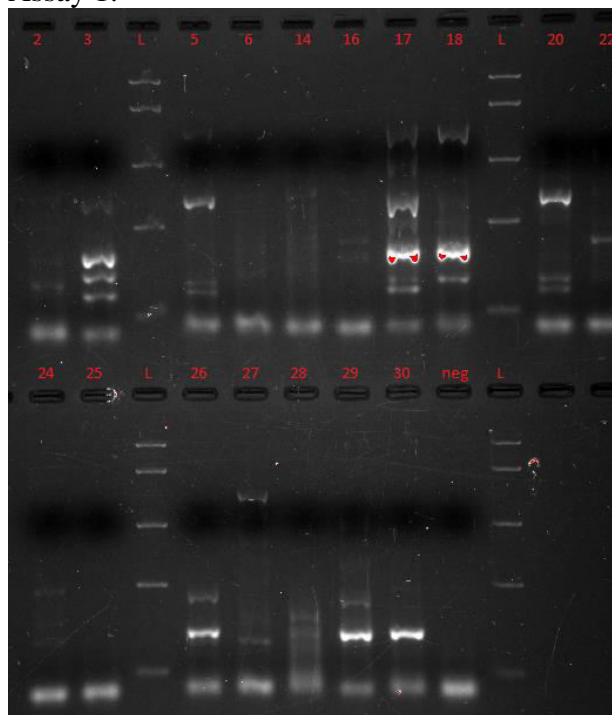
### 4.1 Multiplex PCR

Det ble gjort optimalisering av Multiplex PCR for to assayer. Bilde nummer 1 og 2 viser de resultatene fra optimaliseringen av  $MgCl_2$  og primer konsentrasjonene, analysert med touchdown PCR-program, som ble tatt videre til temperaturoptimalisering. Bilde 3 viser et eksempel på hvordan vi ikke ville at resultatet skulle bli.

Videre viser vedlegg 1, bilde 19-22, hva som skjer med resultatet når man gradvis endrer hybridiseringstemperaturen, mens man bruker  $MgCl_2$ - og primerkonsentrasjonene som ble brukt på bilde 1 og 2.

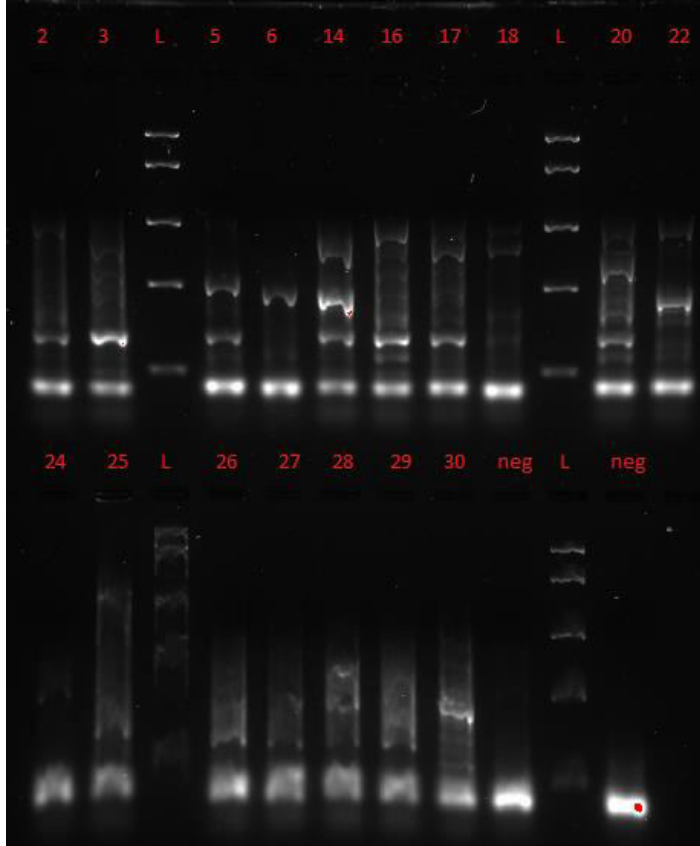
### Optimalisering av $MgCl_2$ og primer konsentrasjon

Assay 1:



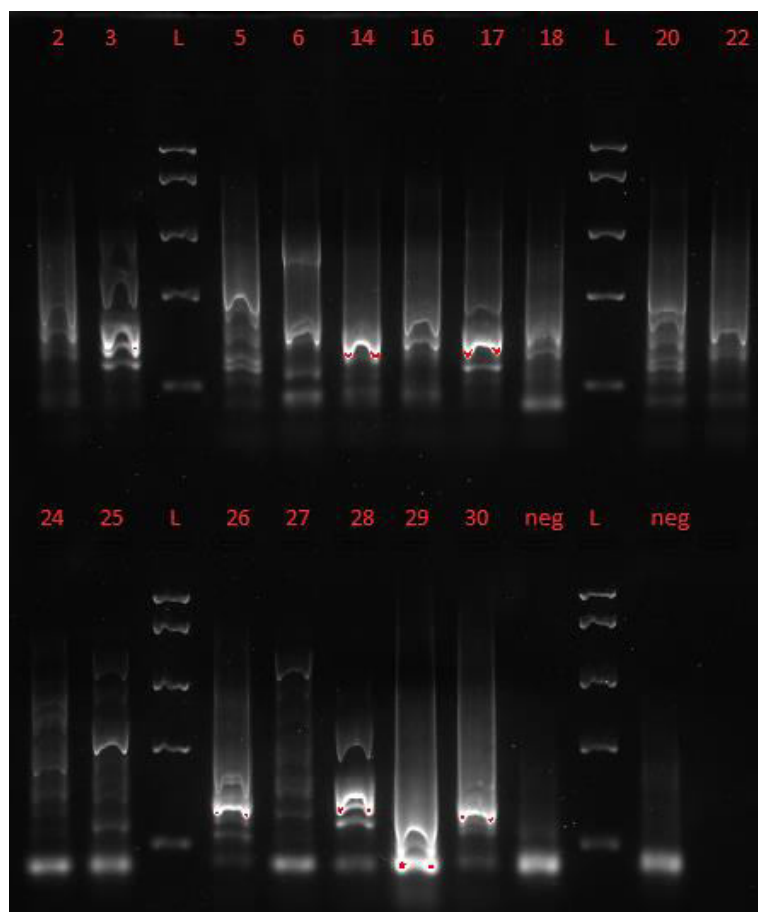
Bilde 1. Det ble gjort optimalisering av multiplex PCR for to assayer. Bildet over viser resultat fra optimaliseringen av assay 1 når det kommer til  $MgCl_2$  og primer-konsentrasjonene. Dette ble analysert med touchdown PCR-program, som ble tatt videre til temperaturoptimalisering. Reaksjonsmiks til assay 1 har forholdet 2.0mM  $MgCl_2$ , 0.75mM primer og 25 $\mu$ l totalvolum.

## Assay 2:



Bilde 2. Bildet over viser resultat fra optimaliseringen av assay 2 når det kommer til MgCl<sub>2</sub> og primer-konsentrasjonene. Dette ble analysert med touchdown PCR-program, som ble tatt videre til temperaturoptimalisering. Reaksjonsmiks til assay 1 har forholdet 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM primer og 25µl totalvolum. Reaksjonsmiksen til assay 2 har forholdet 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM primer og 25µl totalvolum.

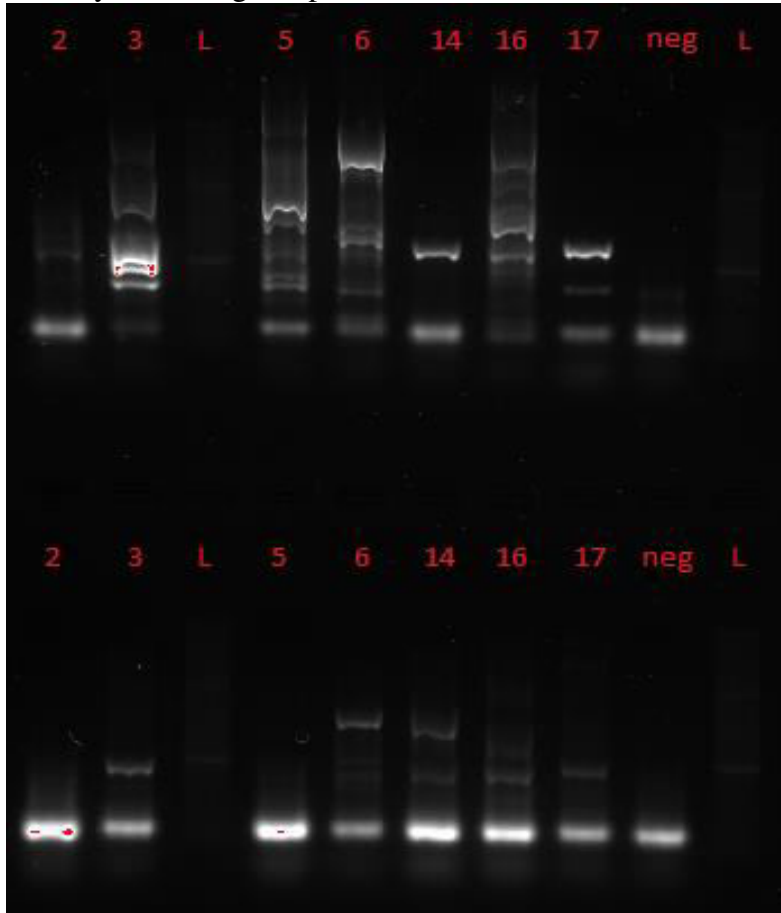
Eksempel på et dårlig blandingsforhold:



Bilde 3: Her ser man et eksempel fra assay 1, på en reaksjonsmiks som har et lite spesifikt blandingsforhold, slik at man ender opp med mange uspesifikke bindinger, som danner for mange bånd på gelen.

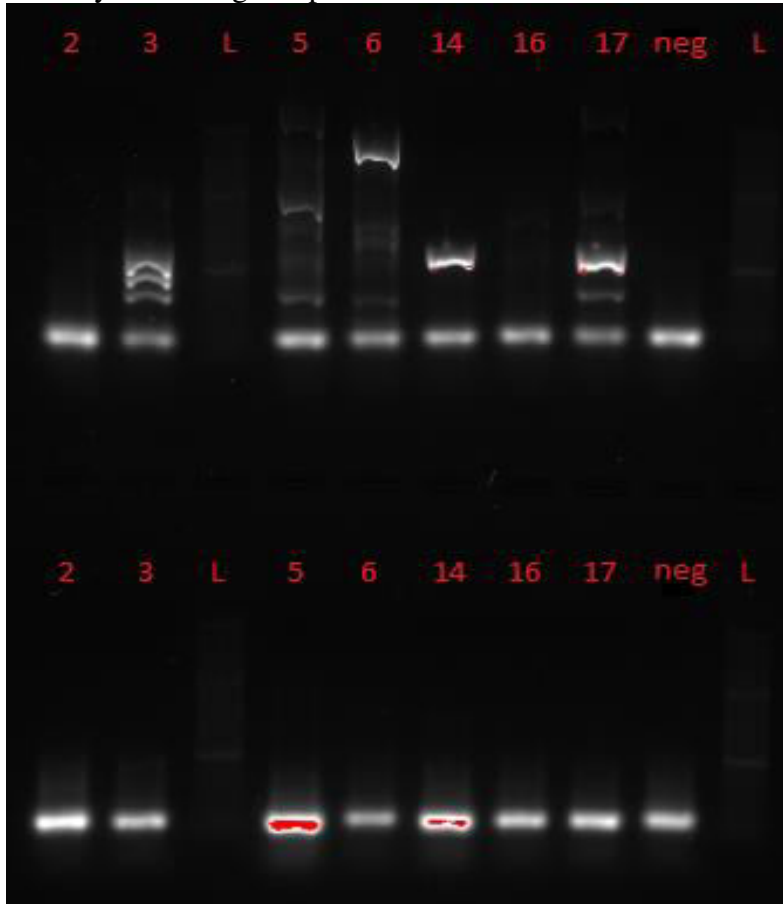
## Optimalisering av hybridiseringstemperatur

56°C hybridiseringstemperatur



Bilde 4. Assay 1 er på øverste linje, og Assay 2 er på nederste linje. Det var ved 56°C hybridiseringstemperatur, at assay 2 fikk best resultat.

58°C hybridiseringstemperatur



Bilde 5. Assay 1 er på øverste linje, og Assay 2 er på nederste linje. Det var ved 58°C hybridiseringstemperatur at assay 1 fikk best resultat.

Tabell 4. Her vises resultat av den fylogenetiske grupperingen av de 7 prøvene som ble valgt ut. Tabellen viser «+» på det genet som ga positivt utslag, og viste «-» på de negative prøvene. Den siste kolonnen viser hvilken fylogenetisk gruppe prøven ble, basert på Figur 1.

	<b>chuA</b>	<b>yjaA</b>	<b>TspE4C2</b>	<b>Fylogenetisk gruppe</b>
<b>2</b>	-	-	-	A
<b>3</b>	+	+	+	B2
<b>5</b>	-	-	+	B1
<b>6</b>	-	-	+	B1
<b>14</b>	+	-	-	D
<b>16</b>	-	-	-	A
<b>17</b>	+	-	+	D



#### 4.2 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Det ble utført PCR på 17 forskjellige prøver, og med syv forskjellige primerpar per prøve.

Bildene (Se vedlegg 1: bilde 23 – 29) viser prøveresultatene, analysert på gelelektroforese. Under bildene ligger tabell 1 som er en oversikt, over hvilke av prøvene som er positive for det genet vi så etter for hver PCR.

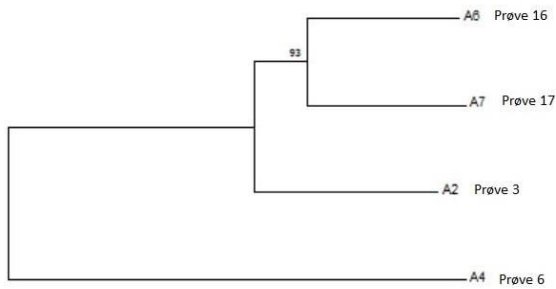
Under disse resultatene ligger sekvenseringsresultatene fra MLST prøvene. Dette er resultater som viser et fylogenetisk tre med en tilhørende tabell for hvert av de syv genene som er testet (se Tabell 6). Tabellen forteller hvilken prøve som hører til det fylogenetiske treet, hvor stor prosentandel prøvesekvensen, som samsvarer med referanse-gen fra NCBI sin database, og en toppscore som forteller hvilken art og/eller gen som prøven lignet mest på. De prøvene markert i gult, er prøver med for mye bakgrunnsstøy, som gjør prøvene uleselige.

Tabell 5. Her vises hvilke prøver som er positive og negative, for de ulike genene som ble testet med MLST.

Gen\prøvenr	2	3	5	6	14	16	17	18	20	22	24	25	26	27	28	29	30
adk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fumC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gyrB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
icd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
mdh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
purA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
recA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabell 6. Her vises sekvensene til prøvematerialet, sammenlignet med referanse-gen fra pubMLST sin database. Nummer som prøvene er markert med, viser nummeret fra databasen, som prøven var identisk med. PurA og mdh ble ekskludert fra sammenligningen, grunnet dårlig kvalitet på sekvenseringsdataen. "X" er prøver som ikke har blitt sammenlignet opp mot databasen, mens "-" er prøver som ble sammenlignet med referanse-gen uten å være identisk noen.

Gen\prøvenr	2	3	5	6	14	16	17	18	20	24	25	26
<b>adk</b>	1	14	137	-	35	1	35	17	6	-	43	X
<b>fumC</b>	X	14	4	-	864	107	50	363	29	X	41	11
<b>recA</b>	7	10	6	-	218	7	191	2	7	-	6	2
<b>icd</b>	11	14	X	-	X	11	49	484	18	-	X	763
<b>gyrB</b>	7	10	5	-	-	7	22	X	X	-	X	4



Figur 4. Her vises et consensus-tre av de genene som ble analysert. Basert på sekvensen til summen av alle genene fra tabell 6. Prøver som manglet sekvenseringsdata fra ett eller flere gener I tabell 6, ble ekskludert fra tréet.

## 5. Diskusjon

Det første som ble sjekket etter at alle resultatene fra gel elektroforesen var ferdig var om de positive og negative kontrollene stemte. I noen av brønnene ble det funnet forurensing i de negative kontrollene. Dette kan skyldes krysskontaminering fra en av de andre brønnene, eller generell kontaminering under produksjonen av mastermix. Hadde vi hatt mer tid ville vi analysert om igjen disse prøvene og sett om vi hadde fått forurensing flere ganger. Disse prøvene ble sett vekk ifra og ble ikke tatt med videre for vurdering. De prøvene som ble gitt til oss hadde blitt sjekket på Åse sykehus om at de var renkultur.

Alle bildene av resultatene ble gått igjennom nøye og vurdert etter ulike punkt. Disse punktene var:

- Om det var forurensing i de negative kontrollene
- Om det var flere bånd enn hva det skulle være
- At det var tydelige bånd og båndene var lesbare

Basert på disse kriteriene valgte vi ut reaksjonsmiksen med forholdet 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75μM primer på assay 1 og 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75μM primer på assay 2.

Ved temperaturoptimaliseringen ble det tatt utgangspunkt i de beste prøvene fra assay 1 og 2. De to beste temperaturene som ble valgt var 58°C ved assay 1 og 56°C ved assay 2. De temperaturene som ble testet var fra 56-59°C, med en differanse på 1°C. Ved assay 2 kunne vi ha gått enda en grad ned og sett om dette ga bedre resultat enn ved 56°C. På bilde 4 ser man det beste resultatet for temperaturoptimaliseringen for assay 1. Begrunnelsen på det er at man har flere tydelige bånd enn på de andre bildene. Når det kommer til assay 2 ser man at jo varmere temperatur det er, jo mindre produkt kommer frem i bildene (se vedlegg 1: bilde 19 – 22). På grunnlag av at det beste resultatet kom på den temperaturen som var minst, kunne det vært interessant å prøve en analyse til på 55°C for å sett om det gav et bedre resultat. Det ble ikke gjort en analyse på 55°C ettersom vi hadde et tett tidsskjema.

Det ble analysert MLST på alle 17 prøvene som ble gitt. Ut ifra disse 17 prøvene ble de 12 beste sendt videre til sekvensering hos Eurofins, Eberberg i Tyskland. Grunnlaget for valget av disse 12 prøvene var at prøvene måtte ha positivt svar. Videre ble det tatt i betraktning at DNA-båndene måtte være sterke, slik at man hadde en indikator på at det var nok PCR-produkt. Båndene måtte også være på rett plass, slik at man visste hadde man hadde fått tak i de rette genene.

Etter gelelektroforese av MLST var resultatene bra. Det var tydelige bånd og de alle fleste prøvene hadde fått påvist alle genene som ble sett etter. Unntaket var ved prøve 28, på genet icd, som var negativt. Noen av prøvene var også svak positiv. Det ble valgt ut 12 prøver som ble sendt til sekvensering i Tyskland. De prøvene som var svake, samt prøve 28 ble utelatt. Sekvenseringsdataen som vi fikk tilbake ble analysert i MEGA 7.0. Her kom det frem at det var flere prøver som var uleselige på grunn av bakgrunnsstøy. Dette kan skyldes at metoden ikke ble spesifikk nok, siden det ikke ble gjort en optimalisering av metoden her på laboratoriet. Det at metoden ikke ble optimalisert her, gir ulike faktorer på at det kan bli bakgrunnsstøy. Slike faktorer kan være at pipettene er forskjellig kalibrert og at det er blitt analysert på forskjellige PCR-maskiner.

Den største feilkilden i oppgaven er muligheten for krysskontaminering. Det har vært mye pipettering i forskjellige brønner og det har vært mange forskjellige typer prøver. Muligheten er der siden det ble oppdaget forurensing i noen av de negative brønnene. Arbeidet har foregått så sterilt som vi har klart det, og vi har brukt hansker og sprit når vi har arbeidet. Det kan tenkes at det hadde vært mer optimalt å få kunne jobbe med dette på et sterilt laboratorium.

I noen av prøvene var det flere enn tre bånd der det bare skulle ha vært tre, ettersom vi så etter tre forskjellige gen i Assay 1. Det samme gjaldt i assay 2 der det bare skulle være fire bånd men noen ganger ble det funnet flere enn fire. Dette vil mest sannsynlig skyldes at reaksjonsmiksen hadde dårlig blandingsforhold, slik at prøvene ble for lite spesifikk (se bilde 3). Den mixen som

ble valgt ut for assay 1 og assay 2, ble valgt ut på det grunnlag av at de ikke hadde for mange bånd, og at de ikke hadde for svake og mangelfulle streker.

Enkelte ganger ble det brukt forskjellige typer forbruksutstyr som f.eks. PCR-rør eller lokk til disse. Forskjellig tykkelse på rørene kan ha hatt noe å si på hvor fort PCR-produktene amplifiserer. Under varmesyklusene i noen av analysene, viste det seg at noen typer lokk løsnet underveis og gjorde at produktet fordampet.

Ved gel elektroforese ser man et sterkt tydelig bånd nederst på elektroforesegelen. Dette er bare hvor langt produktet har vandret og grunnen til at det er så sterkt er at det sannsynligvis har blitt brukt for mye primer. Disse båndene skal ikke telles med.

## 6. Konklusjon

På optimaliseringen av assay 1 og assay 2 er det mulig å kunne gruppere *E. coli*, fylogenetisk.

Metodene kunne blitt optimalisert enda bedre men slik det er nå er det fult mulig å fordele dem i de forskjellige gruppene.

MLST-metoden gav spesifikke svar på de prøvene med lesbar sekvenseringsdata fra sekvenseringen. men med tanke på hvor mange prøver som måtte ekskluderes på grunn av ulesbar sekvenseringsdata, tyder det på at PCR-delen i metoden for uspesifikk og trenger optimalisering om man skal kunne bruke den i laboratoriesammenheng.

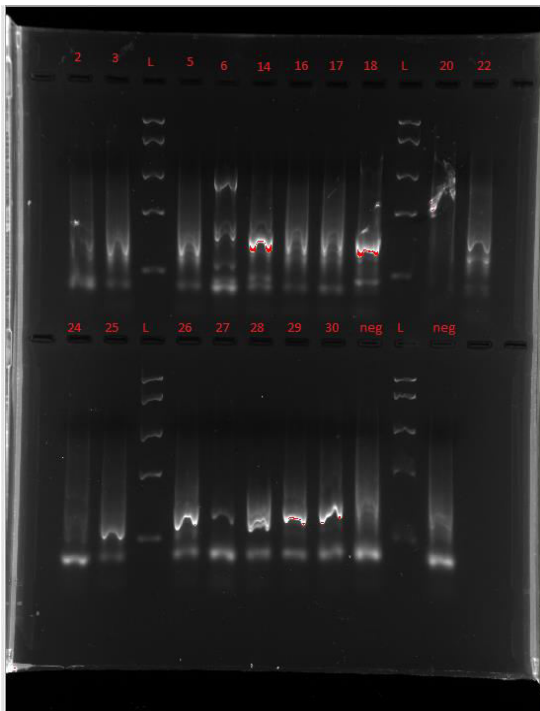
## 7. Referanser

---

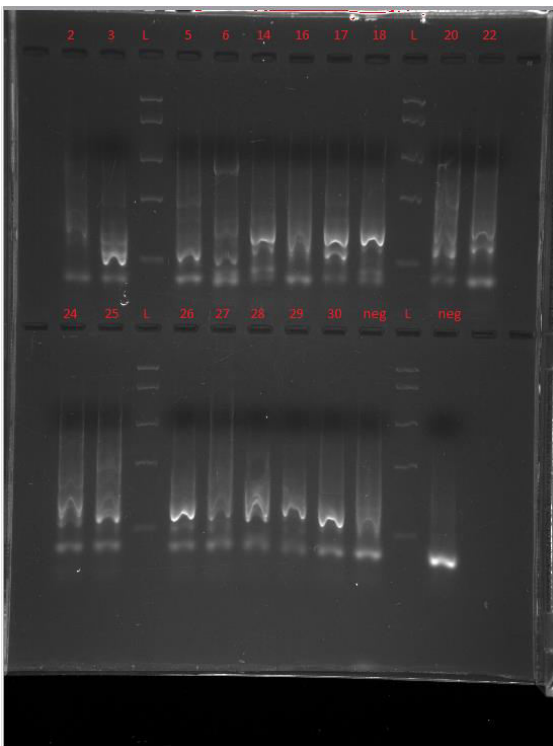
- <sup>1</sup> Brenner, D.J, Krieg, N.R, Staley, J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria. United States of America: Springer Science+Business Media,Inc: 2004.
- <sup>2</sup> Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli* (Escherichia coli). 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA: U.S Department of Health & Human Services; 24.09.2016 [03.03.2017, 29.05.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/ecoli/>
- <sup>3</sup> Folkehelseinstituttet. *E. coli*-enteritt (inkludert EHEC-infeksjon og HUS) – veileder for helsepersonell. Postboks 4404 Nydalen, 0403 Oslo: Folkehelseinstituttet; oppdatert 18.04.2017 [Sisert dato: 27.05.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/e.-coli-enteritt-inkludert-ehc-inf/>
- <sup>4</sup> Odd Letnes. Fakta om *E. coli*. Oslo: Veterinærinstituttet; 15.12.2006 [Sisert dato; 29.05.17] Tilgjengelig fra: <http://forskning.no/2008/02/fakta-om-e-coli>
- <sup>5</sup> Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli* (Escherichia coli). 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA: U.S Department of Health & Human Services: 01.12.2014 [06.11.2015, 29.05.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/>
- <sup>6</sup> Halton Region. Escherichia coli (*E. coli*) O157:H7 or Hamburger Disease. Ontario, Canada: Halton Region; [Sisert dato; 29.05.17]. Tilgjengelig fra: <http://www.halton.ca/cms/One.aspx?portalId=8310&pageId=9614>
- <sup>7</sup> Todd C. Lorenz. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. 05.2012. [hentet 29.05.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846334/>
- <sup>8</sup> National Center for Biotechnology Information, U.S. NCBI. USA. 09.2014 [hentet 29.05.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- <sup>9</sup> Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. 01.2002 [hentet 03.06.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835531>
- <sup>10</sup> R H Don, P T Cox, B J Wainwright, J S Mattick. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. 07.1991 [hentet 03.06.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328507/?page=1>
- <sup>11</sup> Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chic-Yuan Hsu, Yong Hoon Kim. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. 04.2012 [hentet 03.06.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>
- <sup>13</sup> Martin C. J. Maiden, Jane A. Bygraves, Edward Feil, Giovanna Morelli, Joanne E. Russel, Rachel Urwin, Et Al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. 04.1998 [hentet 03.06.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19708/>
- <sup>14</sup> FE Ashton. Multilocus enzyme electrophoresis – application to the study of meningococcal meningitis and listeriosis. 01.1990 [hentet 03.06.2017]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3327987/>

Vedlegg 1: Resultater

Bilde 1. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM Primer, assay 1

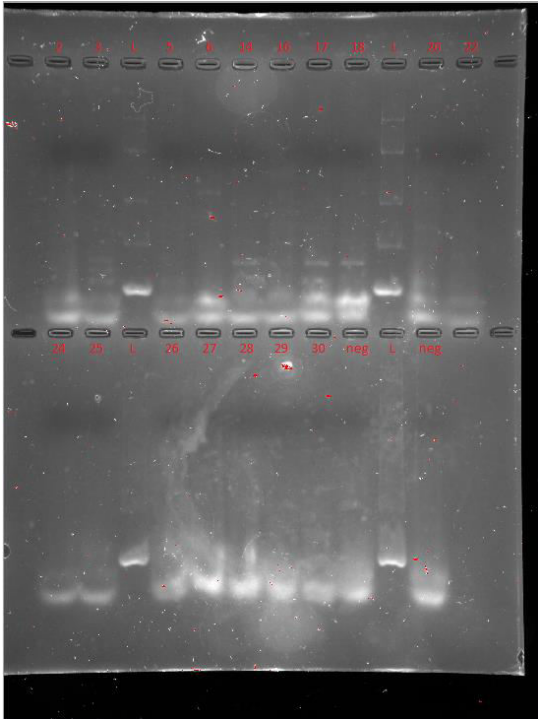


Bilde 2. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM Primer, assay 1

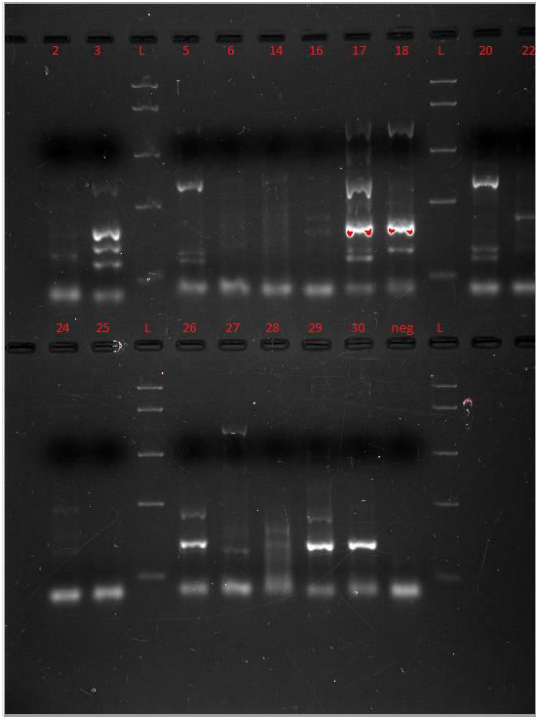




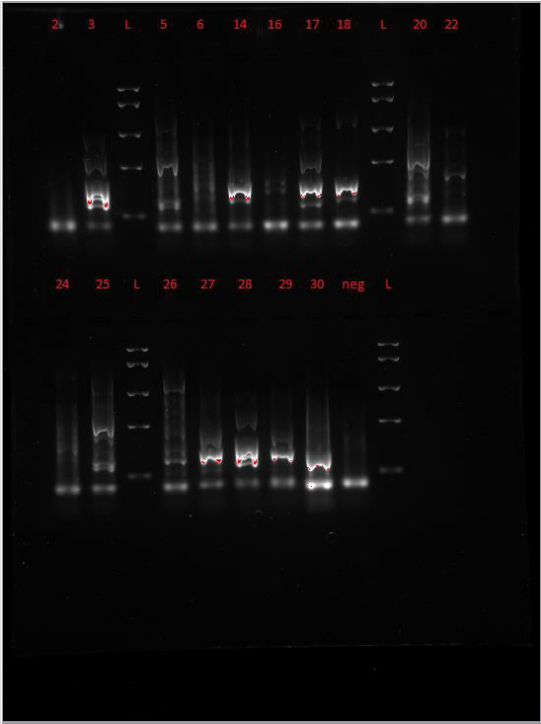
Bilde 3. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM Primer, assay 1



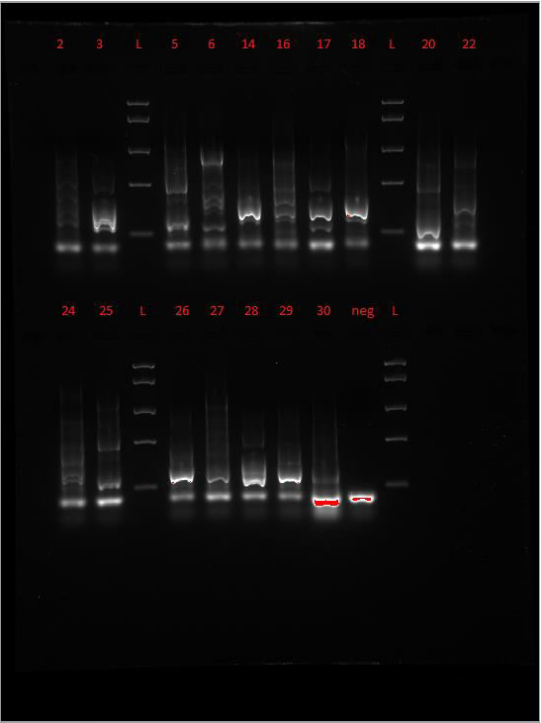
Bilde 4. 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM Primer, assay 1



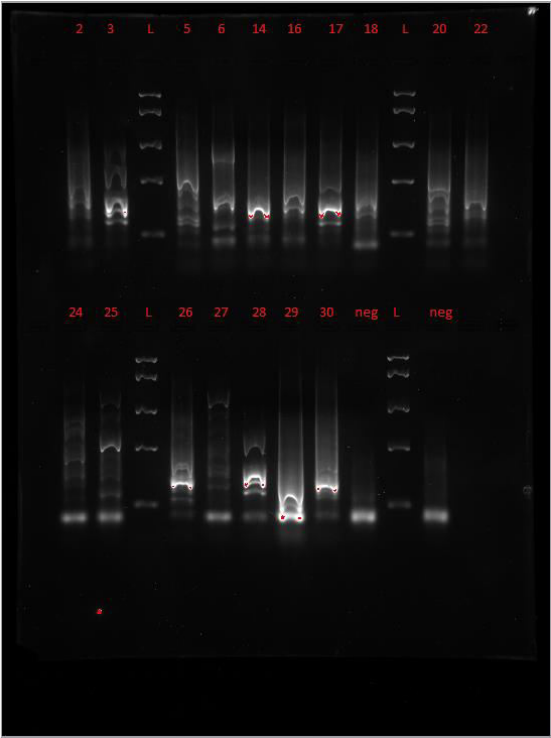
Bilde 5. 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM Primer, assay 1



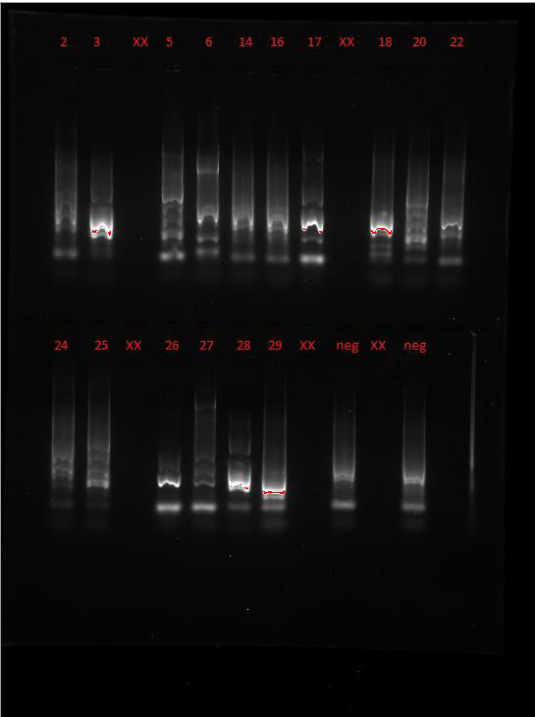
Bilde 6. 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Primer, assay 1



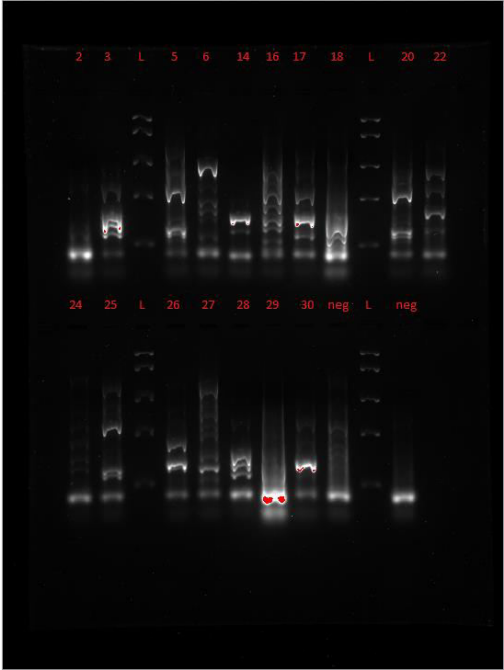
Bilde 7. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM Primer, assay 1



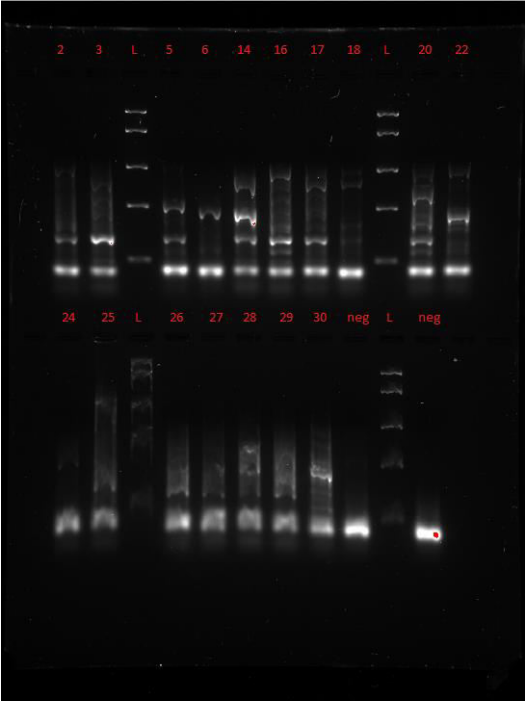
Bilde 8. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM Primer, assay 1



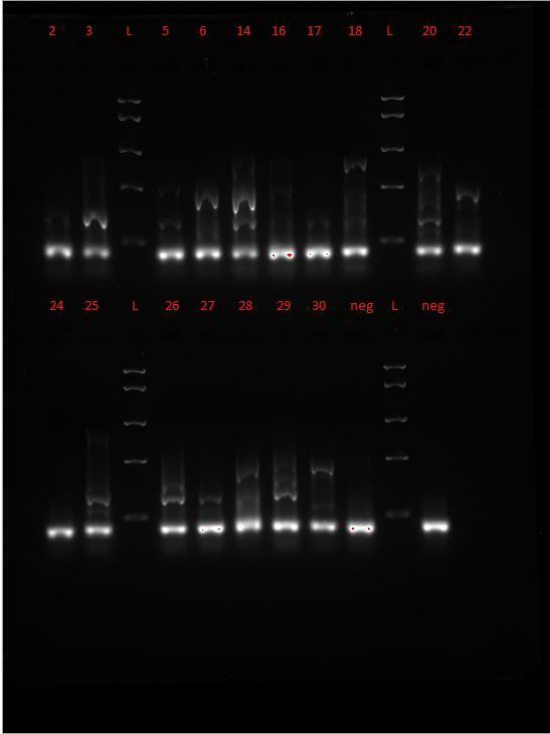
Bilde 9. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Primer, assay 1



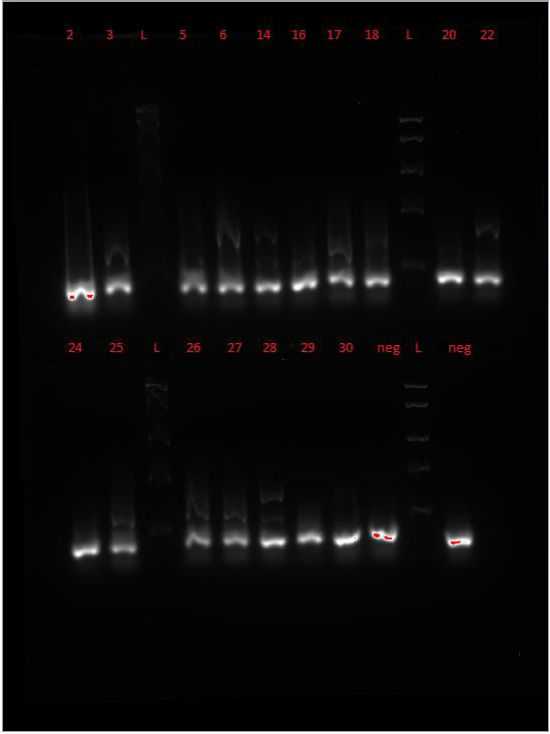
Bilde 10. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM Primer, assay 2



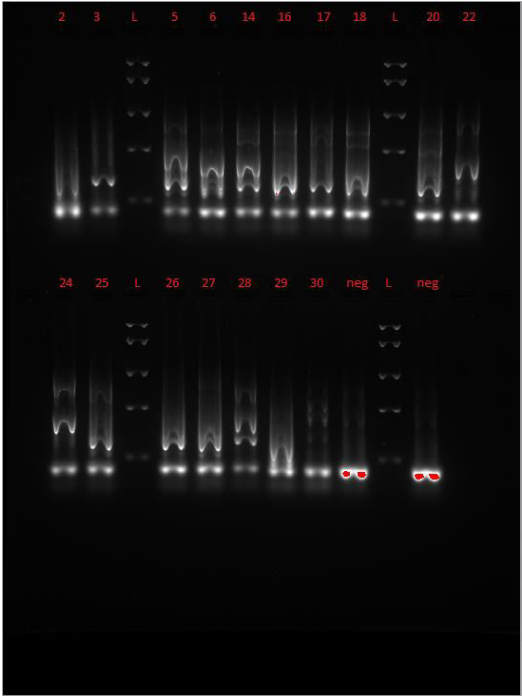
Bilde 11. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM Primer, assay 2



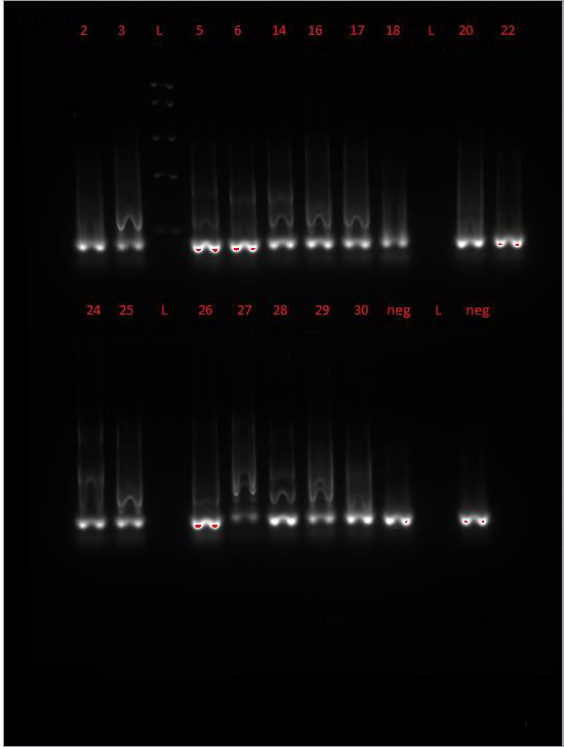
Bilde 12. 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Primer, assay 2



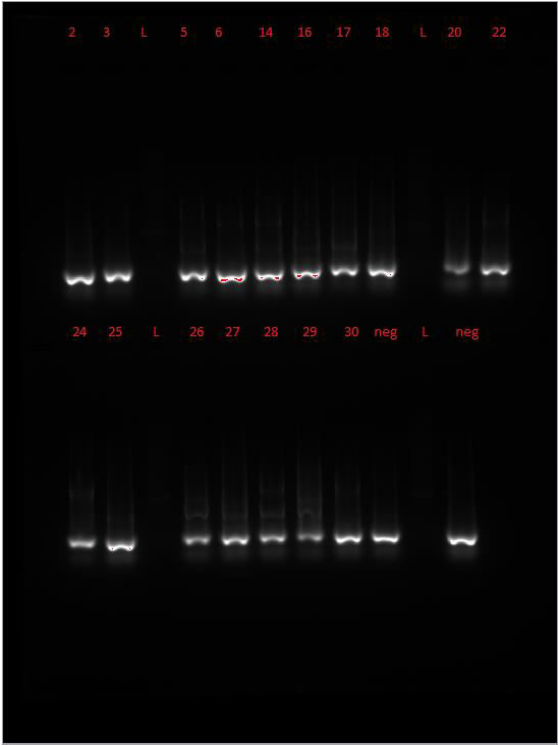
Bilde 13. 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM Primer, assay 2



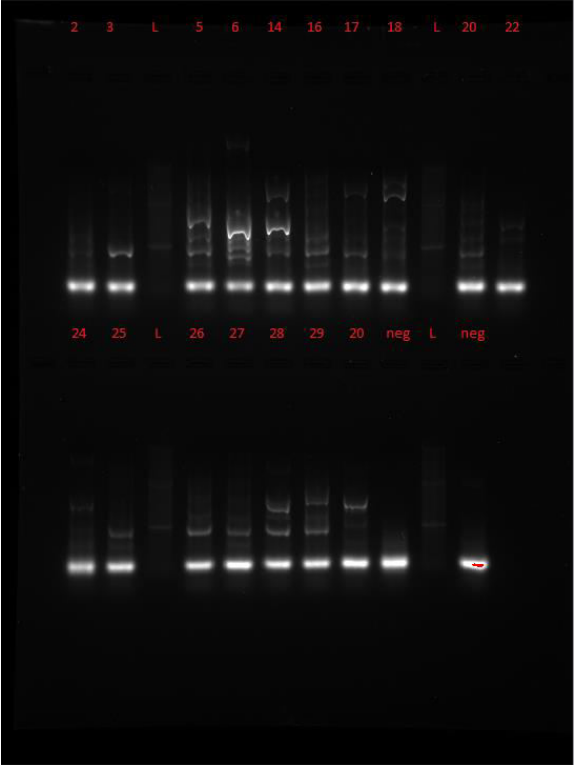
Bilde 14. 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM Primer, assay 2



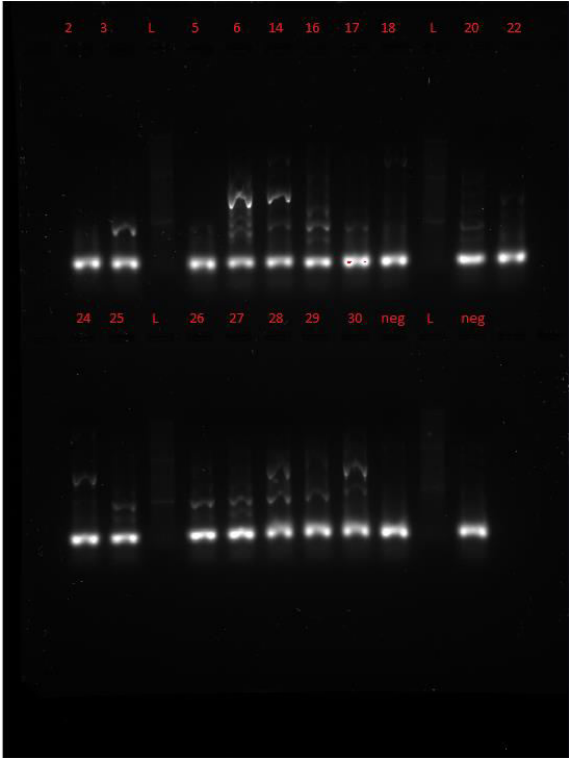
Bilde 15. 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Primer, assay 2



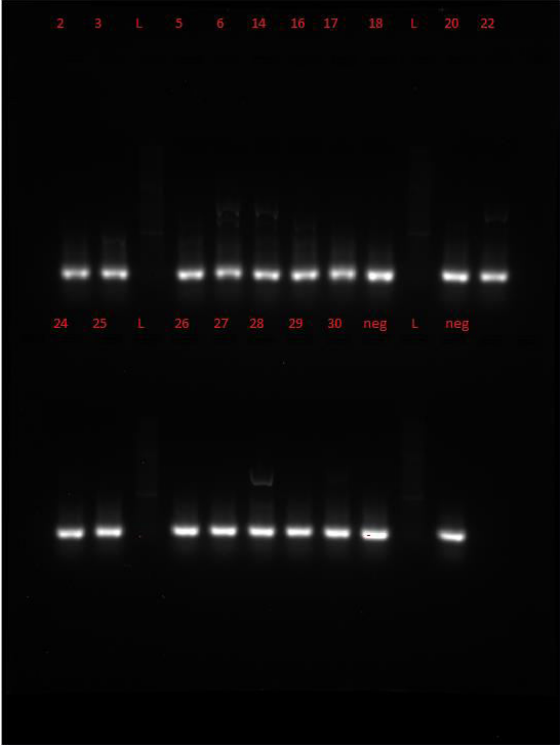
Bilde 16. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM Primer, assay 2



Bilde 17. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM Primer, assay 2

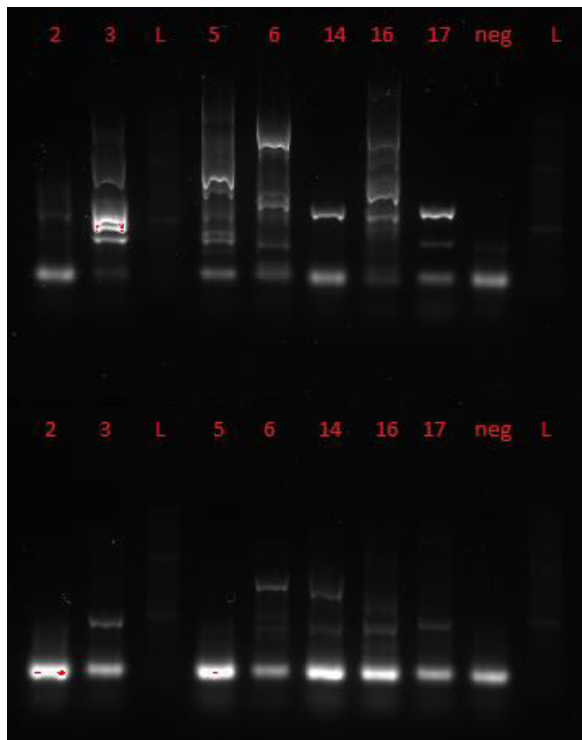


Bilde 18. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Primer, assay 2

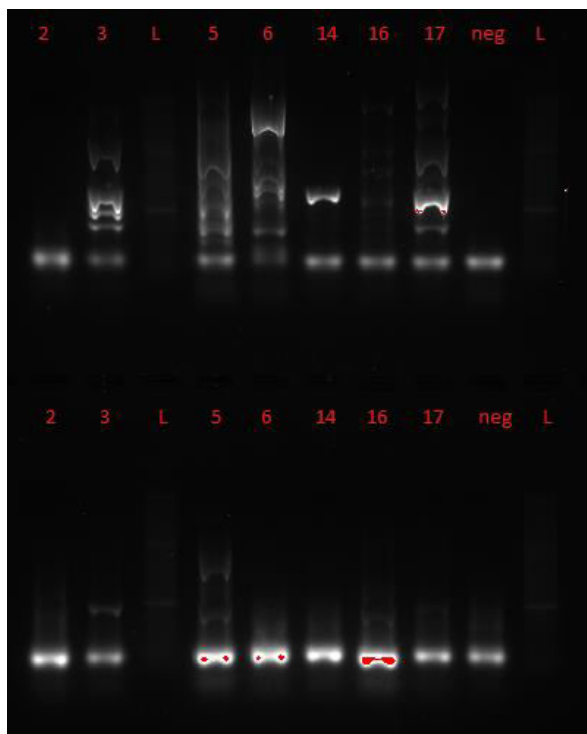




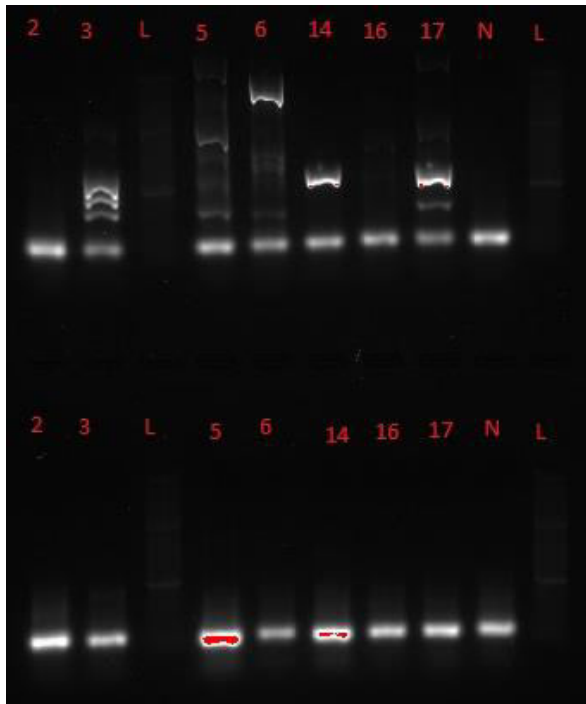
Bilde 19. Varmedoptimalisering 56°C assay 1 og assay 2



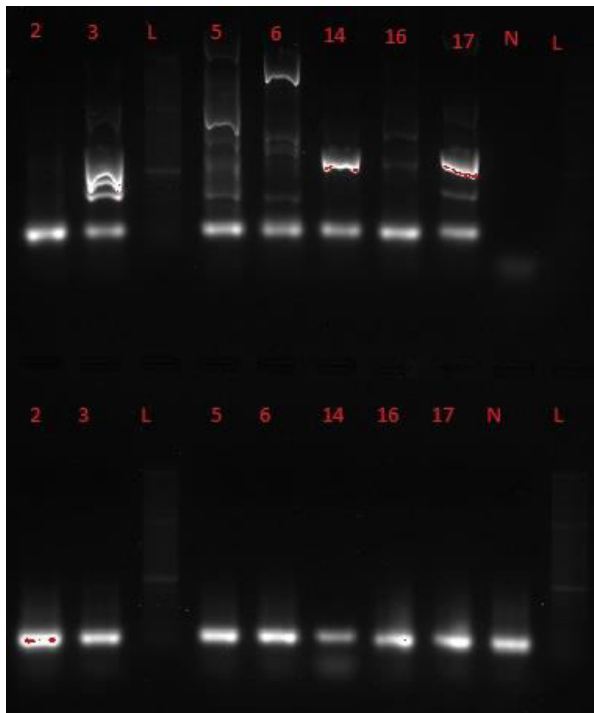
Bilde 20. Varmedoptimalisering 57°C assay 1 og assay 2



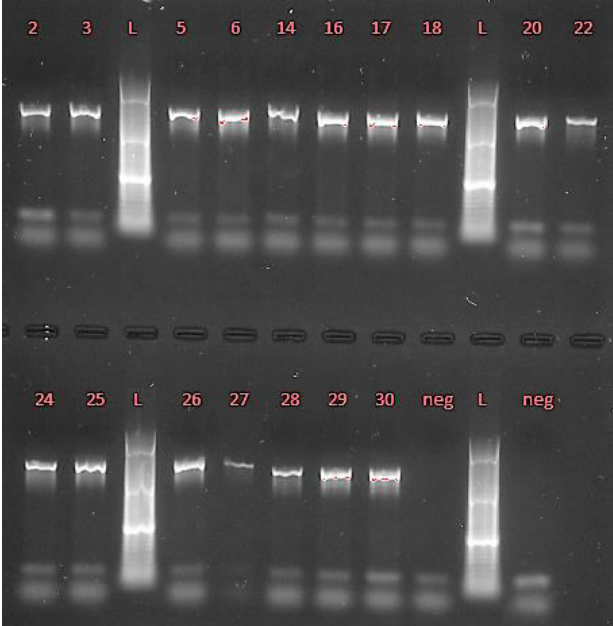
Bilde 21. Varmeoptimalisering 58°C assay 1 og assay 2



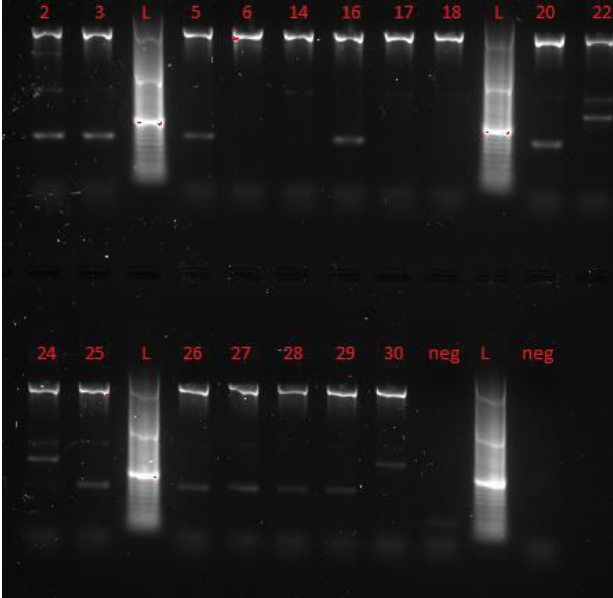
Bilde 22. Varmeoptimalisering 59°C assay 1 og assay 2



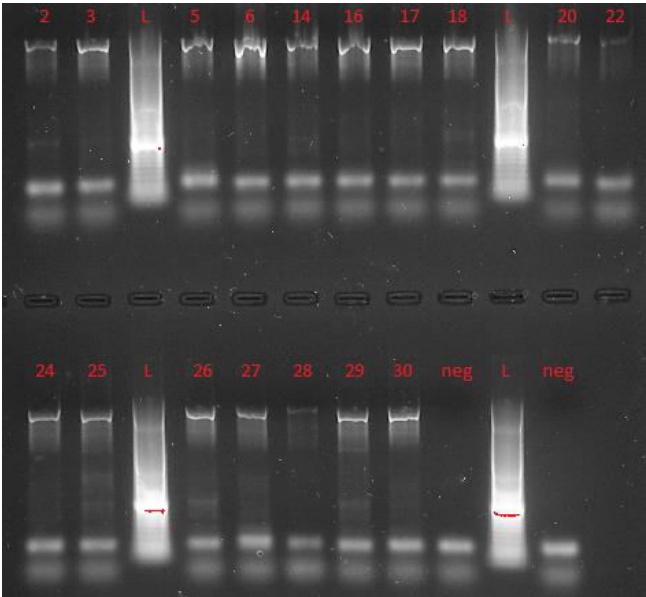
Bilde 23. MLST – adk



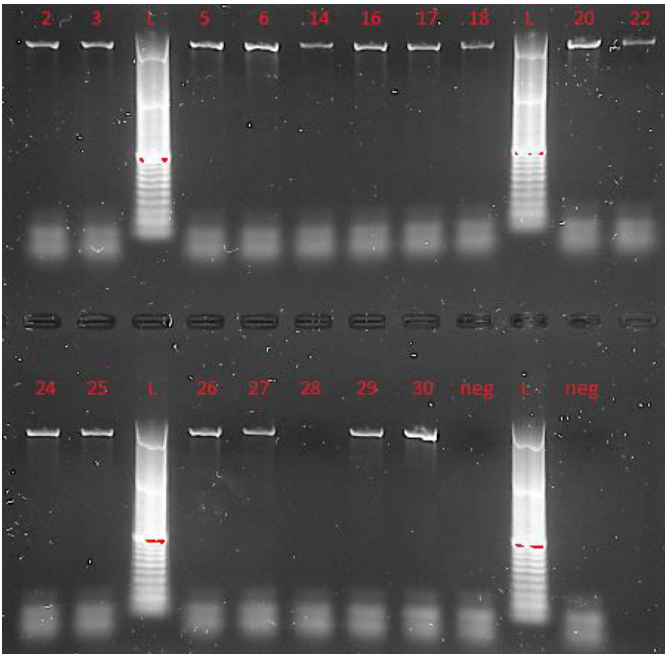
Bilde 24. MLST – fum



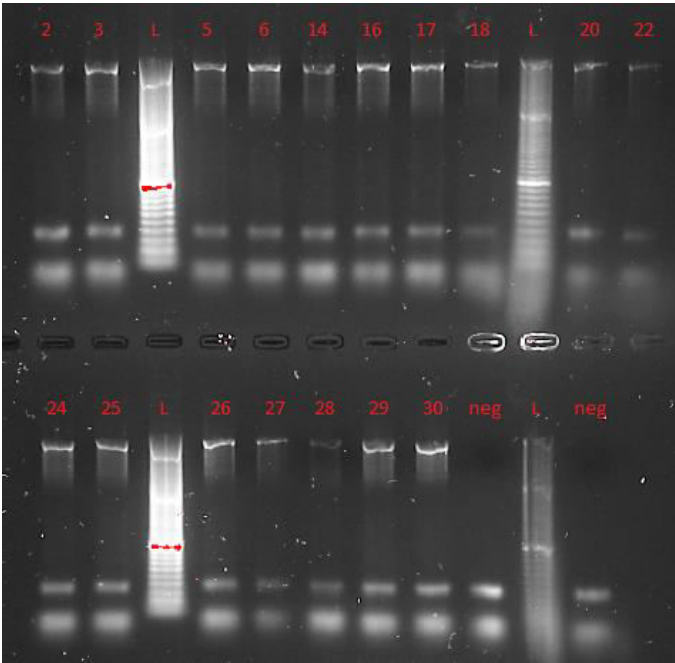
Bilde 25. MLST – gyrA



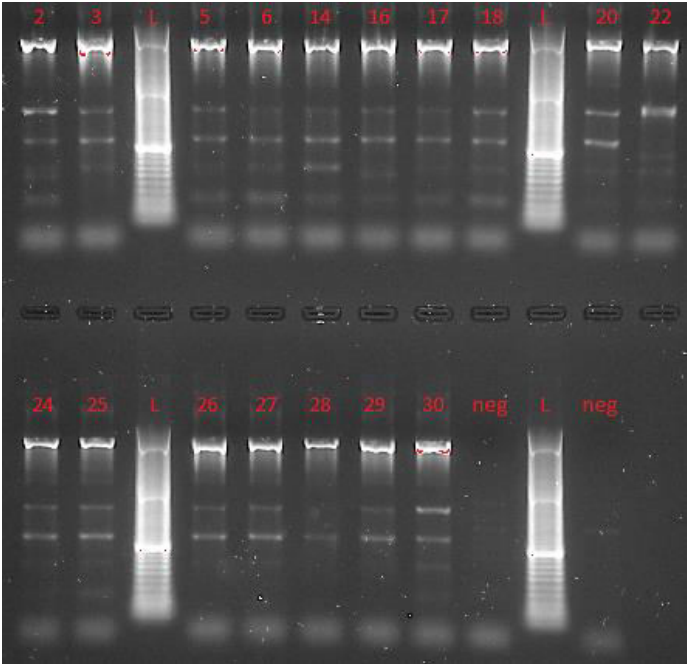
Bilde 26. MLST – icd



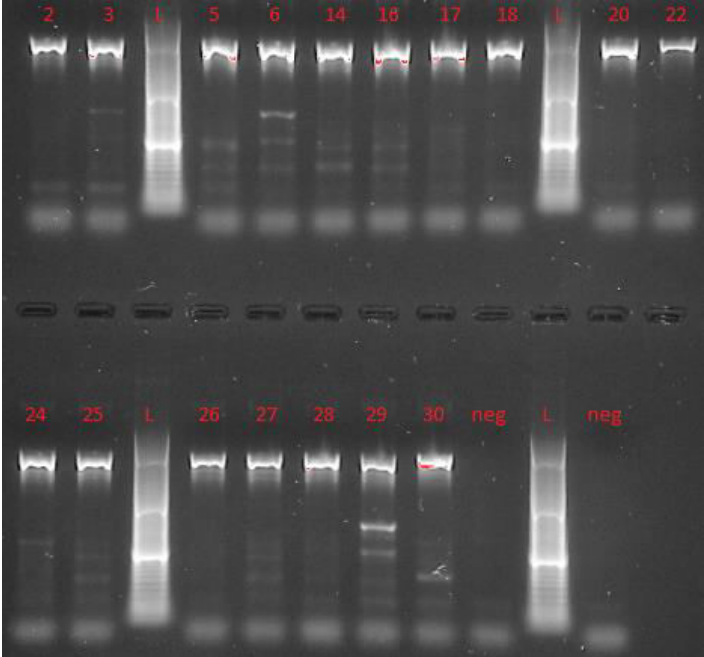
Bilde 27. MLST – mdh



Bilde 28. MLST – pur



Bilde 29. MLST – rec



## Vedlegg 2: Multiplex PCR

### 1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er standardisering og kvalitetssikring av to multiplex PCR analyser: assay 1 og assay 2 for karakterisering av *E. coli*

Hensikten med vedlegget er standardisering og kvalitetssikring av

### 2. Omfang

Prosedyren omfatter amplifisering av Isolert DNA fra *E. coli* til deteksjon av tre gener i Assay 1, og fire gener i Assay 2, ved hjelp av gelelektroforese

### 3. bakgrunnsinformasjon

Multiplex PCR er en metode som benytter seg av flere primerpar, i samme reaksjonsløsning, for å detektere flere gener etter bare en analyse.

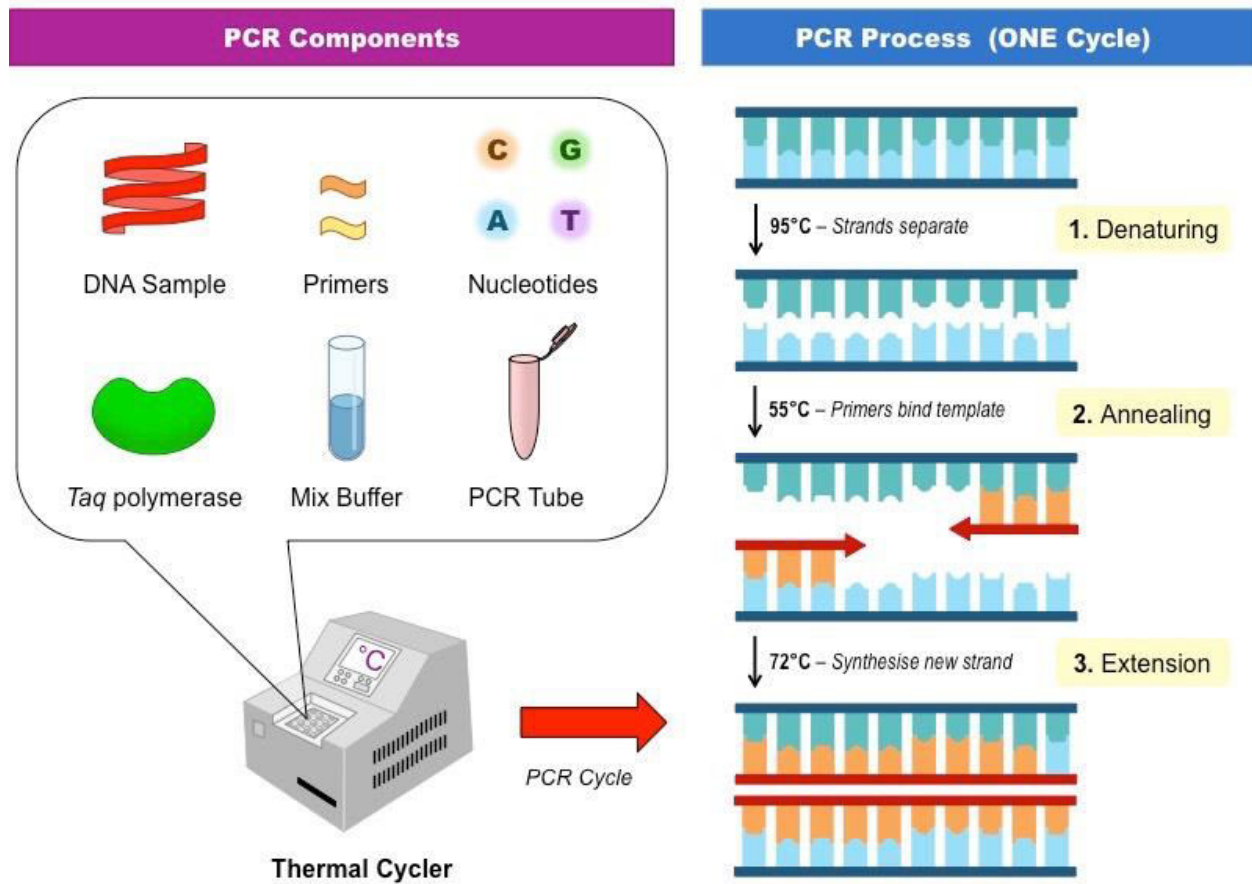
Assay 1: kan skille mellom fire av *E. coli* sine fylogenetiske undergrupper: A, B1, B2, og D.

Assay 2: kan påvise tilstedeværelse av fire virulente gen i *E. coli*

### 4. Utstyr og reagens

- (vwr) mastermix med 2x polymerase, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> og dNTP
- 100μM primere assay 1
  - ChuA
  - YjaA
  - TspE4
- 100μl primere assay 2
  - stx<sub>1</sub>
  - stx<sub>2</sub>
  - eaeA
  - hlyA
- 25mM MgCl<sub>2</sub>
- Dobbeldestillert H<sub>2</sub>O
- 0-10μl-, 10-200μl- og 200-1000μl- pipette, med filterspisser
- Eppendorfrør med stativ
- PCR-strips med stativ og lokk

### 5. Analyseprinsipp



(<http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>)

## 6. Kvalitetskontroll

- Bruk av DNA standard
- Negativ kontroll for hver elektroforese

## 7. Arbeidsbeskrivelse

- Legg et eppendorphør i et stativ som står på is.
- Regn ut og bland mastermiks i et eppendorphør til X antall prøver etter tabellene:

Assay 1:

komponent	Start konsentrasjon	Per prøve	volum for totalt antall prøver	Konsentrasjon I løsning
<b>Polymerase</b>	2x	7,5µl	7,5 * X	1x



(vwr)				
<b>Primer 1</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 1</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 2</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 2</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 3</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 3</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	0,3 $\mu$ l	0,3 * X	2,0mM
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	5,525	5,525 * X	-
<b>Totalvolum</b>		14 $\mu$ l	14 * X	

## Assay 2

komponent	Start konsentrasjon	Per prøve	volum for totalt antall prøver	Konsentrasjon I løsning
<b>Polymerase (vwr)</b>	2x	7,5 $\mu$ l	7,5 * X	1x
<b>Primer 1</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 1</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 2</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 2</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 3</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 3</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 4</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>Primer 4</b>	100 $\mu$ M	0,1125	0,1125 * X	0,75 $\mu$ M
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	0,0 $\mu$ l	-	1,5mM
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	5,6 $\mu$ l	5,6 * X	-
<b>totalvolum</b>		14 $\mu$ L	14 * X	

- Merk alle PCR rør med prøvenavn/nummer og negativ kontroll
- pipetter 14 $\mu$ l mastermiks til hvert PCR rør.
- Tilsett 1 $\mu$ l prøvene DNA til tilhørende PCR rør.
- Negativ kontroll skal ikke inneholde prøve DNA. Den skal fungere som en intern kontroll på at prøvene ikke er kontaminert med DNA.
- Vortex og spinn prøvene forsiktig.
- Prøvene settes på en PCR-maskin med følgende program:

## Assay 1

Reaksjon	Temperatur	Varighet	Antall sykluser
Innledende denaturering:	95°C	10 min	1
<b>Assay 1:</b> Denaturering: Hybridisering: Elongering:	95 °C 58 °C 72 °C	30 sek 30 sek 30 sek	35
<b>Assay 2:</b>			35

Denaturering:	95 °C	30 sek	
Hybridisering:	56 °C	30 sek	
Elongering:	72 °C	30 sek	
Avsluttende Elongering:	72 °C	7 min	1
kjøling	4 °C		∞

- Om prøvene ikke skal kjøres i gelelektroforese med en gang, settes de i kjøleskap i 4 °C

### 8. feilkilder

- for mange bånd etter gelelektroforese
  - For høy MgCl<sub>2</sub> og/eller primer konsentrasjon
  - For lav annealing temperatur
  - forurensing
- Ingen positive utslag
  - Ingen *E.coli* i prøven
  - For høy annealing temperatur
  - For lav MgCl<sub>2</sub> og/eller primer konsentrasjon

## Vedlegg 3: Multilocus sequence typing

### 1. Hensikt

Hensikten med prosedyren er standardisering og kvalitetssikring, av PCR-delen av en MLST analyse, for deteksjon av E.coli.

### 2. Omfang

Prosedyren omfatter amplifisering av isolert DNA fra E.coli til deteksjon av syv gener, ved hjelp av gelelektroforese og sekvensering av disse genene.

### 3. Bakgrunnsinformasjon

MLST er en teknikk som innebærer PCR analyser av syv kjente gener, og deretter sekvensering av disse genene. Materialet som analyseres, er isolert DNA fra bakterier, hvor man velger ut syv husholdningsgener som er spesifikke for den bestemte bakterien.

### 4. Utstyr og reagens

- 100µl Primere (TF)
  - purAF og purAR
  - fumCF og fumCR
  - IcdF og icdR
  - mdhF og mdhR
  - gyrBF og gyrBR
  - recAF og recAR
  - adkF og adkR
- Goldstar™ Mastermix (EGT) med 2x taq polymerase, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> og dNTP
- Dobbeldestillert vann
- Isolert DNA
- 0-10µl- og 200-1000µl- automatpipette med filterspisser
- Eppendorphrør med stativ
- PCR-strips med lokk og stativ
- PCR-maskin
- Vortexmikser og bordsentrifuge

### 5. Analyseprinsipp

Analysen er basert på standard PCR, amplifisering av isolert DNA fra rendyrket E.coli. PCR-analysen kjøres syv ganger. For hver PCR som blir kjørt, brukes forskjellige primerpar. Disse syv primerparene er designet for å amplifisere syv forskjellige husholdningsgener, som er i genomet til E.coli. PCR produktene blir analysert med gelelektroforese, og blir deretter sekvensert. Sekvenseringsdataen blir elektronisk linket opp mot en sekvensdatabase, hvor resultatet bestemmer opphavet til hvert enkelt gen.

### 6. Kvalitetskontroll

Analysen kjøres med negativ kontroll. PCR produktene blir også sekvensert på et eksternt laboratorium (eurofins). Sekvenseringsdataen linkes opp mot en sekvensdatabase ved hjelp av programmet MEGA, for å sikre at resultatet er korrekt.

## 7. Primer

- purAF og purAR
- fumCF og fumCR
- IcdF og icdR
- mdhF og mdhR
- gyrBF og gyrBR
- recAF og recAR
- adkF og adkR

## 8. Arbeidsbeskrivelse

### Tillaging av reaksjonsmiks:

- Merk syv eppendorphør med hver sitt primernavn.
- Hver enkelt prøve skal ha totalvolum på 22.5µl. Og Hver prøve inneholder 12.5µl polymerase mastermix, 0.25µl primerF, 0.25µl primerR, 9.5µl ddH<sub>2</sub>O.
- Pipetter 12.5µl mastermix, 0.25µl med Primer1R og primer1F, og 9.5µl dobbeldestillert vann til hvert eppendorphør. Disse verdiene multipliseres med antall prøver man skal måle (+ en negativ kontroll).
- Alle syv eppendorph rørene mikses i vortex mixer, og sentrifugeres kort på en bordsentrifuge.
- Merk PCR strips med prøvenavn og hvilket primerpar som er brukt. Hver prøve skal pipetteres i syv brønner med syv forskjellige primerpar.
- Pipetter 2.5µl av prøve-DNA til sine syv merkede brønner. Negativ kontroll skal kun inneholde reaksjonsmiksen.
- Rist og sentrifuger stripsene. Og sett stripsene i varmeblokk.
  
- Sett på program på PCR maskin:
  - fem minutter på 95°C
  - 35 sykluser med
    - Ett minutt på 95°C
    - Ett minutt på **annealing temp** (annealing temperatur: 60°C for gyrB og mdh , 56°C for fumC og purA, 54°C for adk og icd, og 58°C for recA)
    - To minutter på 72°C,
  - avsluttende fem minutter på 72°C.
  
- (Lagre prøvene på 4°C om de ikke skal brukes med en gang.)
- Prøvene analyseres ved hjelp av gelelektroforese
- Prøvene sendes til sekvensering.

- Sekvensdataen blir behandlet med programmet MEGA, og linkes opp mot [pubmlst.org.url](http://pubmlst.org.url) sine referansegen for E.coli, og det lages et consensus tre.

## 9. Feilkilder

- Primerdimer
  - Primere som fester seg sammen med 3' endene innover mot hverandre, slik de blir en kort DNA-tråd som blir lest av som en falsk positiv
- Forurensing
  - Om prøven blir kontaminert, kan man få positivt utslag på negativ kontroll. Og man vil regne med å kunne få falsk positiv på resten av prøvene, siden selve reaksjonsblandingen blir kontaminert.
  - Kan også føre til støy på sekvenseringsdataen i MEGA, som kan føre til at man må forkaste prøven, eller korte ned for mye av nukleotidsekvensen, slik at BLAST-søket ikke blir spesifikt nok til å skille E.coli fra andre bakterier.
  - Dårlig sekvenseringsdata
- Uspesifikke bindinger
  - Om man har negativt resultat på negativ kontroll, men ender opp med flere streker enn den man er ute etter på gelen.
  - Dårlig sekvenseringsdata

## **Vedlegg 4: 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**

Metoden gjelder for PCR produkt produsert ved NTNU Ålesund PCR lab.

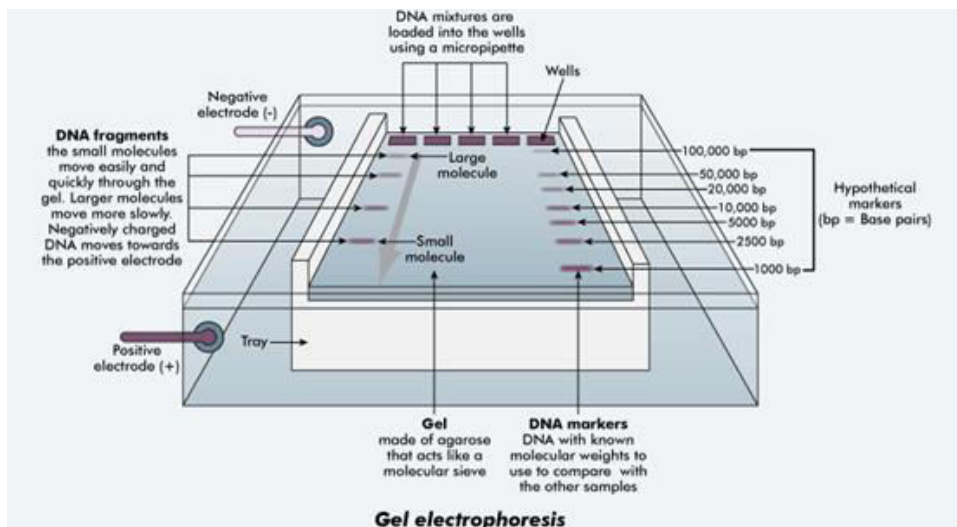
### **3. Bakgrunnsinformasjon**

Biokjemisk teknikk som separerer DNA fragmenter basert på størrelse. Dette gjøres ved hjelp av agarosegel og spenning, slik at negativt ladet DNA vandrer mot positiv pol gjennom en gel med porer. De større DNA bitene får mer motstand og beveger seg saktere, enn mindre DNA biter som har mindre motstand.

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

- Agarosepulver
- 1x TAE buffer
- Gelred™
- 0-10µl pipette med tilhørende filterspisser
- Termometer
- Loading dye
- Ladder
- Elektroforesekar
- Gelkar
- Elektroforesekam (14 brønner)
- UV kamera

### **6. Analyseprinsipp**



- GelRed™ er tilsatt gelen, fordi det fester seg til DNA og gjør det synlig, ved hjelp av UV kamera.

## 9. Arbeidsbeskrivelse

### TAE Buffer:

- Lag til 1x TAE-buffer ved å måle opp 20ml 50x TAE-Buffer i en målekolbe, og tøm det over i en 1000ml målekolbe.
- Skyll 20ml målekolben med dobbeldestillert vann (ddH<sub>2</sub>O) og tøm det over i 1000ml målekolben.
- Fyll 1000ml målekolben til streken med ddH<sub>2</sub>O.
- Bland målekolben ved å korke den, og vende den opp ned noen ganger.

### Agarosegel:

- Teip over de åpne sidene på et gelkar slik det blir tett, og sett i kammer i sporene.
- Tøm 1,60g agarosepulver og 80ml 1x TAE-buffer til en erlenmeyerkolbe.
- Sett erlenmeyerkolben i mikrobølgeovn på full effekt i to minutter.
- Sjekk at alt pulveret er løst ut i bufferen. Om ikke, så tar du kolben i mikrobølgeovn i 20 sekunder om
- gangen til løsningen er blank.
- Bland forsiktig løsningen. Vent ett minutt før Gelred pipetteres ned i gelen, med en 0-10µl pipette med filterspiss.
  - NB! når Gelred tilsettes, skal den pipetteres dypt og hurtig ned i gelen for at den ikke skal fordampe.
  - Gelred skal korkes og legges i den tilhørende posen, rett etter bruk for å forhindre fordamping.
  - Bruk alltid hansker når du jobber med Gelred.
- Bland forsiktig erlenmeyerkolben for å fordele gelred.

- Sett et rent termometer i løsningen, og vent til den blir under 60°C før den tømmes ned i gelkaret.
- Vent omtrent 15 minutter for at gelen skal tørke. Kontroller at gelen er klar til bruk, ved å løfte gelkaret og se gjennom gelen. Den skal ha et blå-grått skjær i seg, da er den klar til bruk.

### **Elektroforese:**

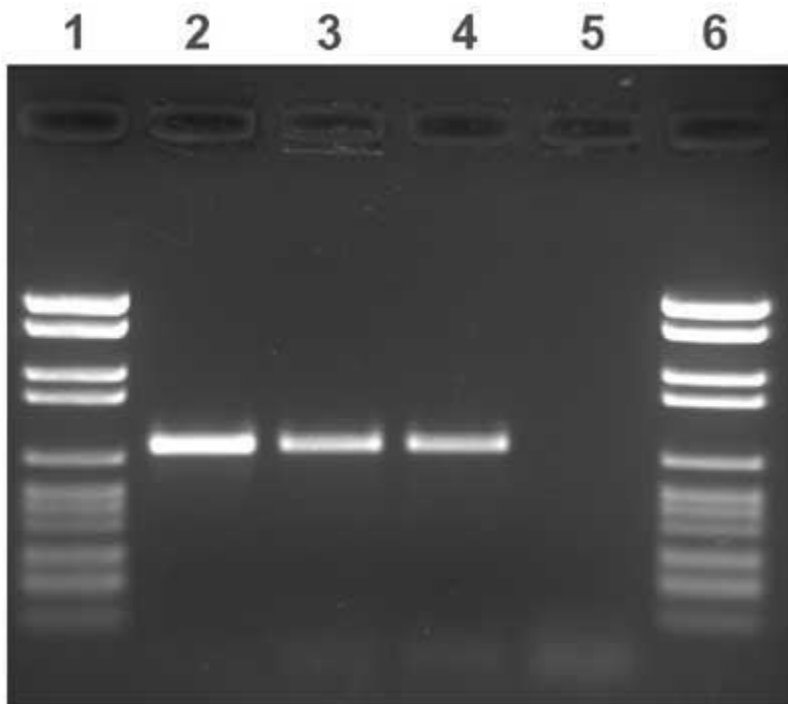
- Fyll opp et elektroforesekar med 1x TAE-buffer til begge sidene er fulle og det renner over midten.
- Ta av teipen på gelkaret (la kammene stå), og sett det i elektroforesekar, med kammene vendt mot den svarte (negative) dioden.
- etterfyll med TAE-buffer til overflaten til gelen er dekket.
- Ta forsiktig ut kammene fra gelen, beint slik at kammene løsner samtidig fra alle brønnene.
- Observer veskeoverflaten over gelen at den er jevn (særlig over brønnene).
  - Om det stikker opp litt gel fra bufferen, kan man etterfylle, til gelen er helt tildekket.
- Lag til løsning med 2µl Loadingdye og 5µl PCR produkt for hver prøve.
- Dokumenter hvilke prøver som skal i brønnene.
- Pipetter ladder til brønn nummer 4, og nummer og 11.
- Pipetter hver prøve til sine tilhørende brønn. Begynn fra og med brønn 2 til og med brønn 13.
  - NB! Unngå å bruke de to ytterste brønnene.
- Koble ledninger til tilhørende støpsel på strømkilden, og sett på 50V i 10 minutter.
- Skru opp til 100V i 50 minutter.
- Ta ut gelen, og la den renne av seg.
- Sett inn gelen i skuffen på UV-avleseren
- Åpne imagelab, og still inn på "gelred" og trykk på den gule knappen for å se posisjonen til gelen.
- Åpne døra over skuffen for å justere gelen.
- Trykk på den grønne knappen for å ta bildet.

### **10. Feilkilder**

- Gelred fordampes opp i filteret når den skal tilsettes. Dette kan føre til at DNAet blir mindre synlig når det skal avbildes, fordi det er for lite Gelred i gelen.
- Ujevne streker.
- Variasjon i spenning.



## 11. Resultatvurdering



- Brønn nr 1 og 6, er ladder som består av flere standardstørrelser av DNA. Ved å sammenligne ladder med kjent størrelse med prøveresultat, kan man avgjøre størrelsen på produktet.
- Brønn nr 2, 3 og 4, er positive resultat.
- Brønn nr 5 er negativt resultat.