



Effekt av SinalinTM neuraminsyre på bakterievekst hos vanlige luftveispatogener, og utgjør dette en stressfaktor som påvirker uttrykkningen av de variable genene sigB og sarA.

BI301305, Bioingeniør

10001. 10002. 10004.

27.05.2019

Antall sider: **47**

Veileder: **Ann-Kristin Tveten**

Sammendrag

I denne oppgaven undersøkes det om *Sinalin*TM neuraminsyre påvirker bakterievekst hos bakteriene *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes*, samt om *Sinalinsyre* er en stressfaktor som påvirker ekspresjonen av de variable genene *sigB* og *sarA* hos *S.aureus*. Ekspresjonen av *sigB* og *sarA* reguleres av stressfaktorer. Under normale forhold vil ekspresjonen til de variable genene være lik normaliseringsgenene, men under stress vil ekspresjonen til *sigB* og *sarA* oppreguleres.

Først ble det dyrket bakteriekulturer fra de ulike stammene, og laget vekstkurver med og uten *Sinalinsyre* ved bruk av absorbansmålinger. For å undersøke om ekspresjonen til de variable genene blir påvirket av *Sinalinsyre*, ble det hentet ut prøver fra forskjellige faser i vekstkurven til *S.aureus*. Disse prøvene ble videre analysert med qPCR, hvor ekspresjonen til de variable genene ble sammenlignet med normaliseringsgenene.

Forsøket viser at tilsetninger av *Sinalinsyre* ikke hadde betydelig innvirkning på bakterieveksten. Ekspresjonen av de variable genene viker ikke fra normaliseringsgenene. Resultatene tyder på at *Sinalinsyre* hverken påvirker bakterievekst hos *S.aureus* og *S.pyogenes*, eller genekspresjon hos *S.aureus*.

Forord

Vi vil takke vår veileder, Ann-Kristin Tveten med sin eminente kunnskap innenfor fagfeltet. Veilederens bidrag har lagt alt til rette for gjennomføring av denne oppgaven. Vi vil også takke andre ansatte ved Institutt for Biologisk Avdeling som har vært til god hjelp under det praktiske arbeidet.

Innholdsfortegnelse

SAMMENDRAG	2
FORORD	3
INNHOLDSFORTEGNELSE	4
INNLEDNING	5
<i>Bakgrunn</i>	5
<i>Formål</i>	5
PROBLEMSTILLING	5
TEORI	6
LUFTVEISINFEKSJONER	6
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> OG <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i>	6
BAKTERIELT STRESS OG VEKSTVILKÅR	7
<i>SigB</i>	9
<i>SarA</i>	10
ANALYSE AV BAKTERIELL VEKST OG GEN-EKSPRESJON	10
QPCR	11
MATERIAL OG METODE	13
DYRKNING AV BAKTERIER DEL I	13
DYRKNING AV BAKTERIER DEL II. VEKSTANALYSE MED ULIKE TILSETNINGER AV <i>SINALIN</i>TM	
<i>NEURAMINSYRE</i>	13
TILLAGING AV VEKSTKURVE FOR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> OG <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i>	13
RNEASY PROSEDYRE	14
QPCR	14
CDNA SYNTSE	15
MÅLING AV LEVENDE OG DØDE BAKTERIER	15
RESULTAT	17
BAKTERIEVEKST ETTER TILSATT <i>SINALIN</i>TM <i>NEURAMINSYRE</i>	17
QPCR-ANALYSE	19
DISKUSJON	23
BAKTERIEVEKST VED TILSETTING AV <i>SINALIN</i>TM <i>NEURAMINSYRE</i>	23
UTTRYKNING AV DE VARIABLE GENENE <i>SIGB</i> OG <i>SARA</i>, OG NORMALISERINGSGENENE <i>GYRB</i> OG <i>GMK</i>	23
KONKLUSJON	26
LITTERATURLISTE	27
VEDLEGG	31
PROSEDYRER	31
TABELLER	37
FIGURER	40

Innledning

Bakgrunn

I oppgaven har vi valgt å skrive om qPCR i mikrobiologi. Dette har vi valgt fordi qPCR er en metode som er i stor utvikling og i tillegg er veldig framtidsrettet. qPCR kan erstatte mye manuelt og tidkrevende labarbeid. Ved bruk av qPCR innenfor mikrobiologi vil man raskere kunne få resultater, i stedet for å dyrke bakteriene på fast eller flytende medium, hvor man må inkubere over tid for å kunne få resultater.

Formål

Formålet med denne oppgaven er todelt. Først skal vi undersøke om virkestoffet *Sinalin*TM neuraminsyre gir endret vekst hos luftveispatogenene *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes*. Videre skal vi undersøke om de variable genene sigB og sarA uttrykkes under bakterielt stress av *Sinalinsyre*, ved hjelp av qPCR teknikk.

Problemstilling

Dyrkning av bakterier i flytende medium, nutrient broth, tilsatt ulike konsentrasjoner *Sinalinsyre* for å studere vekstkurven.

Hvordan *Sinalinsyre* påvirker bakterievekst og hvordan stressfaktorer påvirker uttrykkningen av de variable genene sigB og sarA hos *S.aureus*.

qPCR-analyser brukes til å undersøke hvordan de variable genene uttrykkes når bakterier dyrkes i medium tilsatt *Sinalinsyre*. Dette kan vi sammenligne opp mot negative kontroller, uten tilsatt virkestoff, og sammenligne vekst mot genekspressjon.

Teori

Luftveisinfeksjoner

Luftveisinfeksjoner er de vanligste sykdommene hos alle individer, uansett kjønn og alder. Agens kan både være virale og bakterielle. I de øvre luftveier vil organismer trenge inn ved innånding og invadere mucosa. Det kan oppstå ødeleggelse av epitelet, rødhet, ødem, blødning og eksudat. Kliniske symptomer er rennende nese, nysing og feber.

I nedre luftveier vil virus kunne gi bronkitt, og bakterier gi lungebetennelse. Organismer innåndes, aspireres eller infiserer sår og gir inflammasjon i epitelet, økt slimproduksjon og nedsatt ciliefunksjon. Symptomer som kan oppstå er feber, brystmerter, tungpustethet og oppspytt. Inflammasjon eller nekrose i epitel kan blokkere deler av luftveiene. Vanlige patogene bakterier er *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* og *Staphylococcus aureus* i øvre luftveier, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp*, *Legionella* og *Coxiella burnetti* i nedre luftveier. *S.aureus* og *S.pyogenes* er begge velegnet til undersøkelse av bakteriell vekst i flytende medium grunnet deres gunstige vekstvilkår (1).

Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes

S.aureus er en gram positiv bakterie som vokser i klaser eller hauger, bakterien er beta-hemolytisk. *S.aureus* kalles ofte for gule stafylokokker fra sitt gulaktige utseende ved vekst på fast medium. *S.aureus* finnes som normalflora på huden, i svelget, i nesen og i endetarmen. *S.aureus* er en opportunistisk patogen bakterie, som vil si at den under rette omstendigheter kan føre til infeksjon og/eller sykdom (2).

S.aureus har veksttemperatur fra 7 til 48°C, optimal veksttemperatur er 37°C og den kan vokse mellom pH 4,8 og 9,0, hvor optimal vekst foregår mellom pH 6,0 og 7,0. *S.aureus* kan produsere enterotoksin i miljø mellom 35 og 40°C og mellom pH 4,8 og 9,0. Bakterien vokser også ved svært høye saltkonsentrasjoner, <20% NaCl, optimalverdi er 0,5 til 4,0% (3).

S.aureus' evne til virulens går fra abscesser i overflaten på huden til dype og systemiske infeksjoner som *osteomyelitis*, *endocarditis* og *sepsis*. Dette er mulig på grunn av *S.aureus*' store repertoar av toksiner, eksoenzymmer, adhesiner og immunkontrollerende proteiner. Disse virulensfaktorene er trolig regulert som en respons på vekstkriteriene til organismen in vivo. Miljøregulering av virulens er relevant fordi *S.aureus* vanligvis er isolert i nasopharynx hvor den lever i en kommensalistisk symbiose (4).

S.pyogenes er en gram positiv bakterie som vokser i kjeder, den er beta-hemolytisk og katalase negativ. *S.pyogenes* kommer fra slekten *Streptococcus* og serogruppen A, derav forkortes den ofte GAS (*Gruppe A Streptokokker*). Bakterien er fakultativ anaerob, den har optimal veksttemperatur ved 37°C og dyrkes enten i luft eller i 5-10% CO₂ (5).

S.pyogenes er en “kjøttetende” bakterie som produserer et stort antall enzymer som gjør den i stand til å bryte ned vev og spre seg raskt i en vertsorganisme. Noen av de viktigste enzymene den bruker er; streptolysin O- og S, som hemolysere røde blodceller og dreper hvite, streptokinase, som oppløser koagulert blod og hyaluronidase, som bryter ned bindevev. Dessuten kan *S.pyogenes* danne eksotoksiner som er assosiert med skarlagensfeber (6).

Grunnet *S.aureus* og *S.pyogenes* gode vekst er det lett å undersøke påvirkningen de får av stressfaktorer. Dette kan påvises ved uttrykning av normaliserings- og variable gener ved hjelp av qPCR.

Bakterielt stress og vekstvilkår

Enhver organismes overlevelse er avhengig av dens tilpasning til miljøet den befinner seg i. For å overleve ekstreme miljøforandringer må bakterien oppfatte og respondere ved hjelp av endringer i gen-ekspressjon og proteinaktivitet. Sigma-faktorer har en sentral rolle i denne reguleringen (7).

Sigma-faktorer er viktige proteiner i transkripsjonsprosessen. Disse bindes reversibelt til en katalytisk kjerne hos RNA-polymerasen. RNA-polymerase har spesifisitet for en promotor kombinert med predominant sigma-faktor. RNA-polymerase er enzymet som er ansvarlig for å gjenkjenne egnede gener under spesifikke miljøforandringer, og danner mRNA transkripter for nydannelse av proteiner (7,8).

Bakterielle sigma-faktorer forårsaker flere biokjemiske aktiviteter. Disse er; binding til kjernen, aktivering av promotor-gjenkjenning, DNA-sammenkopling og inhibering av uspesifikk transkripsjon. Alle sigma-faktorene utfører i hvert fall de to første prosessene (8).

Sigma-faktorer er dissosierbare subenheter av prokaryotens RNA-polymerase. Sigma-faktorene bindes til RNA-polymerasens kjerne og former et holoenzym. Holoenzymet dirigeres til å kjenne igjen DNA-sekvensen, også kjent som promotor. Promotoren uttrykker starten på en gensekvens, og når holoenzymet er dannet skjer promotorgjenkjenningen. Det er konkurranse mellom sigma-faktorene om de samme regionene på RNA-polymerasens kjernekompleks. Derfor deler mange sigma-faktorer felles proteinstruktur (7,8).

Sigma-faktorer er klassifisert i to strukturelle familier; σ_{54} og σ_{70} . σ_{70} familien er delt inn i fire grupper basert på felles primære sekvenser og struktur. σ_A står for transkripsjon av gener for bakterievekst og metabolisme. De resterende gruppene σ_B , σ_S og σ_E er alternative sigma-faktorer som regulerer spesifikke fysiologiske prosesser.

σ_{70} grupper som bidrar til bakteriens stress-responser er σ_S (gr. 2 sigma-faktor) og σ_B (gr. 3). Disse gruppene regulerer proteiner som bidrar til både bakteriens evne til å respondere til miljøforandringer samt virulens (7).

σ_S og σ_B er identifisert til generelle stress-respons faktorer i både gramnegative- og grampositive bakterier. σ_S faktoren aktiverer ekspresjonen av flerfoldige gener som kreves for å opprettholde cellens levedyktighet når veksten flater ut i stasjonærfase.

σ_B aktiverer gener som uttrykkes ved eksponering til varme, syre, etanol, salt, stress, stasjonærfase, sult, oksygen eller fosfat. Bakteriens tilpasning trenger også gener fra to-komponents signaloverføringsfamilien. To-komponent system er bygget opp av histidin kinase sensor og en beslektet cytoplasmisk responsregulator. Kollektivt vil disse proteinparene merke miljøstimuli og initiere tilpassede transkripsjonsprogrammer ved hjelp av fosforylering (7,9).

Alle σ_B -positive organismer ser ut til å dele en lik σ_B -regulatorisk kjerne, hvor σ_B er bundet i en inaktiv form ved hjelp av en anti-sigma faktor, RsbW. Defosforylert RsbV som er anti-anti-sigma faktoren til RsbW, forstyrrer assosiasjonen av σ_B . Den eneste kjente regulatoren av RsbV/RsbW-interaksjonen i *S.aureus* er RsbU. RsbU er en medvirkende faktor i dissosieringen av σ_B fra RsbW, ved å defosforylere RsbV. Det er vanskelig å anslå rollen til sigB i *S.aureus*, men ved tilstedeværelse av rsbU mutasjonen kan man se en positiv regulering av σ_B funksjonen (10,11).

MazEF er en toxin-antitoxinmodul lokalisert i bakteriens kromosomer. MazE motvirker MazF. MazF er en sekvensspesifikk mRNA endoribonuklease som spalter RNA-tråden og initierer til programmert celledød. MazF responderer på stress, og det fungerer som en forsvarsmekanisme som hindrer at bakterier som ikke tåler stressfaktorer deler seg (12).

SigB

Hos *S.aureus* koder sigB-operonen for den alternative sigma faktoren σ_B og dens regulatorer for bakteriens evne til å respondere på miljøendringer som stresser bakterien. Dette gjør den ved å endre RNA-polymerasens transkripsjons-prosesser. En full modell av σ_B reguleringen hos *S.aureus* finnes enda ikke (11).

SigB er viktig for bakteriell tilpasning under langvarig stress, og er ansvarlig for transkripsjonen av gener som bygger resistens mot varme, oksidativt- og antibiotisk stress. I den akutte fasen er bakterien avhengig av aktiv *agr* (accessory gene regulator) og sarA systemer for å injisere toksiner som forårsaker inflammasjon. SigB nedregulerer aggressive bakteriefenotyper, og tilstedeværelse av sigB kan øke ekspresjonen av sarA (13). Aktiviteten til sigB påvirker produksjonen av virulensfaktorer, biofilm formasjon og intercellulær utholdenhet. Dette genet er mest aktiv under stasjonærfase, men er også aktiv på noen gener i tidlig eksponentiell fase (14).

SarA

SarA (staphylococcal accessory regulator A) er en viktig regulator for store mengder målgener som er involvert i virulens, autolyse, biofilm formasjon, stress respons og metabolske prosesser i *S.aureus*. SarA koder for et DNA bindende protein som fungerer som inhibitor eller aktivator for virulensfaktorer. Det er vist at nivået av sarA er høyest under eksponentiell vekst, og synker når veksten stagnerer. Flere observasjoner viser også at sarA fungerer som et arkitektonisk protein (15,16,17).

SarA spiller en stor rolle for signaltransduksjon som en respons på mikroaerob vekst. I tillegg regulerer sarA toxin-1 gen-ekspressjon og enterotoxin-B produksjon. Genet er bundet til P2 og P3 promotor lokus på *agr* (15).

SarA kan fremstå som en aktivator for *agr*-ekspressjon. σ B faktorer påvirker ikke sarA i noen særlig grad og det er vist at deaktivering av sigB ikke forandrer ekspressjonen av sarA (18).

Analyse av bakteriell vekst og gen-ekspressjon

Fluorescensmikroskopi kan brukes til viabilitetsstudier i forbindelse med vekstkurver.

Fluorescensmikroskopi skjer ved hjelp av et optisk mikroskop som bruker ulike filterkombinasjoner som avgrensner lyskilden slik at spesifikke spektre av lyset treffer preparatet. Analytten er tilsatt et fargestoff som inneholder fluorkromer, disse fluorkromene vil i dette tilfellet bindes til de intakte bakteriene, da vil de intakte bakteriene avgi fluorescens som vil sees som lysende grønt i mikroskopet (19).

RNA kan isoleres ved flere metoder, men for gen-ekspressjon ønsker man en høy-kvalitets RNA-teknologi som kombinerer de selektive bindings-egenskapene til silica-baserte membraner og spinnkolonner for å isolere RNA-sekvenser opp til 200 baser. Forurensninger vaskes bort. Til slutt sitter man igjen med rent RNA. Videre gjennomsyres bakteriene for å stabilisere og beskytte RNA in situ. Dette bevarer mRNA og muliggjør oppbevaring for videre analyseringer. RNA omdannes til cDNA før selve qPCR-analysen (20).

Genekspresjon er den prosessen som fører til at en bestemt DNA-sekvens blir overført til en bestemt struktur, eller får en bestemt funksjon i en celle. Dette er dannelsen av et genprodukt. Genekspresjon skjer over flere trinn, og starter med transkripsjonen av DNA til ulike RNA-produkter. De to vanligste sluttproduktene er funksjonelle RNA-enheter eller proteiner (21).

qPCR

Polymerase Chain Reaction er en metode som anvendes for å amplifisere hele eller deler av DNA, RNA, mRNA eller cDNA. Metoden utnytter prinsippene med binding og smelting av komplementære basesekvenser, samtidig som ny syntese av DNA foregår med en templat DNA-tråd som mal.

Oligonukleotid også kalt primer vil sammen med polymerase og temperaturintervaller binde seg til komplementære nukleinsyrer. Primerne lages slik at de bindes til komplementære områder i målområdet (22).

Kvantitativ PCR analyse er best egnet til bestemmelse av eksakt mengde ønsket DNA. qPCR baseres på standardkurver produsert fra kjente templat for å kunne beregne kvantitative verdier for ukjente prøver.

Kvantitativ revers transkripsjons PCR (RT-qPCR) er en PCR-metode som blir brukt når startmaterialet er RNA. Her blir RNA transkriptert til komplementert DNA (cDNA) av enzymet revers transkriptase (RT). cDNA blir brukt som templat for selve qPCR-reaksjonen (23).

Bruker en subtype av kvantitativ PCR analyse, *DNA Binding Dye Including Standard Melt*. Her skjer registreringen ved hjelp av signalfargestoffet SYBR Green, bundet til DNA-tråden. Det utgis en termisk profil med amplifikasjons- og smeltekurve. I kvantitative PCR eksperimenter detekterer instrumentet fluorescensen til en eller flere fargestoff eller en fluorofor (absorberer spesifikk bølgelengde, eksiterer en lengre bølgelengde) underveis i syklusene, og en fluorescensverdi er rapportert for hver farge/fluorofor ved hver syklus. Instrumentet leser av fluorescens underveis i termisk syklus.

Man kan kvantifisere kopinumrene til DNA målsekvenser basert på CT bestemmelser. CT er definert som syklusen hvor fluorescenssignalet overgår en signifikant statistisk økning i forhold til bakgrunnssignalet (terskelverdien). Terskelsyklusen er omvendt proporsjonal med logaritmen til det opprinnelige kopinummeret. Desto mer templat tilstede, jo færre sykluser trengs for at fluorescenssignalet skal overstige terskelverdien.

Vanlige qPCR eksperimenter bruker standardkurver til å kvantitere mengden av målsekvensert DNA i en ukjent prøve. Det settes opp en plate med en rekke serier for å lage standardkurve som relaterer templatmengde til CT-verdien. Seriene inneholder kjent kvantitet på sekvensen som undersøkes. Programmet bruker da standardkurven til å angi CT verdi på ukjent prøve.

Ved bruk av SYBR Green for registrering, brukes smeltekurver for å forsikre at utgitt PCR produkt er amplifisert fra målsekvensen. Amplifiseringsproduktet sees som topper på en graf, hvor hver topp sentreres over smeltepunktet (T_m) for gitt produkt. Produkter med smeltepunkt på 80°C eller høyere tilsvarer et større PCR produkt, og kan fastslås som spesifikt DNA-produkt. Produkter med smeltepunkt $<75^\circ\text{C}$ tilsvarer uspesifikt DNA-produkt, som primer-dimere (24).

$\Delta\Delta\text{CT}$ er en god metode for analysering av relative forandringer i genekspressjon. For å bruke denne metoden kreves det én eller flere normaliseringsgener. Disse genene skal i teorien uttrykkes konstant i alle prøver. Dersom man bruker to forskjellige normaliseringsgener skal disse uttrykkes likt opp mot hverandre. Variable gener kan settes opp mot $\Delta\Delta\text{CT}$ -verdien til et normaliseringsgen. Ut fra disse verdiene kan det sees om de variable genene har blitt påvirket av miljøforandring, og har dermed forandret genekspressjonen (25).

Material og metode

Dyrkning av bakterier del I

Ved dyrkning av bakteriene *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* og *Haemophilus influenzae* ble det brukt nutrient broth (4gr per 450 ml destillert vann) som flytende medium i sterile erlenmeyerkolber. Her ble det tilsatt bakteriekulturer fra biobank før inkubasjon over 4 døgn. *S.aureus* og *S.pyogenes* rekultiveres så i nytt flytende medium i henholdsvis 18 og 24 timer. Det ble brukt 3 paralleller per bakterie (Vedlegg 1).

Dyrkning av bakterier del II. Vekstanalyse med ulike tilsetninger av *Sinalin*TM neuraminsyre

Lagde nutrient broth med høyere konsentrasjon. Det ble brukt 10% mindre vann, dvs 4g/405ml. Bakterieløsningene ble rekultivert fra del I. *S.aureus* ble inkubert i 18 timer og *S.pyogenes* i 24 timer før avlesning. Så ble det tilsatt 9 løsninger med ulike konsentrasjoner av *Sinalinsyre* rett før første måling. Det ble brukt 2 paralleller (Vedlegg 1).

Tillaging av vekstkurve for *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes*

Bakterieveksten hos de to ulike stammene *S.aureus* og *S.pyogenes* ble målt ved bruk av spektrofotometri, hvor OD ble avlest ved 600nm hver time. 1,5 ml bakteriekultur pipetteres over til 1,5ml kyvetter, sterilt vekstmedium brukes som blank kontroll. Antall bakterier estimeres ved bruk av Burker tellekammer og mikroskop for å se sammenhengen mellom absorbans og antall bakterier (Vedlegg 1, 8, 14, 15).

Prøve	Bakterie	Tilsatt Sinalinsyre	Prøve	Bakterie	Tilsatt Sinalinsyre
1	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	1	<i>S.aureus</i>	3,5ml
2	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	2	<i>S.aureus</i>	3,5ml
3	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	3	<i>S.aureus</i>	3,5ml
4	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	4	<i>S.aureus</i>	3,5ml
5	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	5	<i>S.aureus</i>	3,5ml
6	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	6	<i>S.aureus</i>	3,5ml
7	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	7	<i>S.aureus</i>	3,5ml
8	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	8	<i>S.aureus</i>	3,5ml
9	<i>S.pyogenes</i>	1,25ml	9	<i>S.aureus</i>	3,5ml
Kontroll	<i>S.pyogenes</i>	0ml	Kontroll	<i>S.aureus</i>	0ml

Tabell: Oversikt over prøver med tilsatt løsning med ukjent konsentrasjon av *Sinalinsyre*.

RNeasy prosedyre

Flytende bakteriekultur ble overført til *ependorf-rør*. Prøvene ble sentrifugert, supernatanten ble fjernet og deretter tilsatt RNlater før prøven ble oppbevart ved 4°C til RNA ble isolert. Sentrifugerte så *ependorf-rør* med prøve, helte av supernatanten og fjernet forsiktig resterende medium. Videre ble RLT buffer tilsatt og brukte så vortex. Overførte løsningen fra *ependorf-rør* til 2ml *Safe-Lock rør* med 5mm stålkule, brukte *TissueLyser* for å lysere bakteriecellene. Sentrifugerte og overførte supernatanten til nytt rør. Det ble tilsatt 96% etanol til lysatet. Overførte så lysatet til RNeasy spinn-kolonnen, sentrifugerte og helte av væsken i samlerøret. RNA samles i filteret på Spin-kolonnen. Tilsatte deretter RV1 og RPE-buffer, sentrifugerte og helte av væsken i samlerøret. Siste sentrifugeringen var lengre for å tørke ut spinn-kolonne membranen for at ingen rest-etanol inhiberer RNA-elueringen. For å få ut alle rester av RPE buffer ble spinn-kolonnen plassert i et nytt 2ml samlerør og sentrifugert. Plasserte spinn-kolonnen i et nytt *ependorf-rør*, tilsatte RNase-fritt vann direkte til membranen og sentrifugerte. Til slutt ble prøvene fryst ned (*Vedlegg 2*).

qPCR

Det ble brukt to forskjellige qPCR metoder, ved den ene metoden ble RNA syntetisert til cDNA på forhånd, mens på den andre skjedde cDNA syntese og PCR amplifikasjon i samme steg.

To-steps metode:

Primere fortynnet med nuklease-fritt vann. Lagde mastermix med SYBR green med 4 primerpar, *gyrB*, *gmk*, *sigB* og *sarA*. Blandet med nuklease-fritt vann og med cDNA. *GyrB* og *gmk* er normaliseringsgener mens *sigB* og *sarA* er variable gener. Alle prøvene ble analysert i paralleller, dette inklusiv 2 negative kontroller per primer (*Vedlegg 4, 18*).

Programmet vi brukte inneholdt en *Hot Start* på 5 minutter ved 95°C. Amplifikasjonen på 40 sykluser inneholder et steg på 95°C i 10 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt.

Melt fasen inneholder en syklus med 95°C i 30 sekunder, 62°C i 30 sekunder og 95°C i 30 sekunder (*Vedlegg 16*).

Ett-steps metode:

Primere fortynnet med nuklease-fritt vann. Lagde mastermix med SYBR green med 4 primerpar, gyrB, gmK, sigB og sarA. Denne mastermixen inneholdt revers transkriptase (qscript onestep RT). Blandet mastermix med RNA templat i brønnene på mikrotiterplaten. Alle prøvene ble analysert i paralleller, dette inklusiv 2 negative kontroller per primer (*Vedlegg 5, 18*).

Programmet vi brukte inneholdt en revers transkriptase (RT) på 10 min ved 50°C. *Hot Start* på 5 minutter ved 95°C. Amplifikasjonen på 40 sykluser inneholder et steg på 95°C i 10 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C i 1 minutt. *Melt* fasen inneholder en syklus med 95°C i 30 sekunder, 62°C i 30 sekunder og 95°C i 30 sekunder (*Vedlegg 17*) (26).

cDNA syntese

Ferdig syntetisert RNA er plassert på is. Blandet og sentrifugerte kort for å samle materiale i bunnen av *eppendorf-rørene*. Tok qScript cDNA SuperMix i reaksjonsbrønner, sammen med RNA templat og qScript RT. Totalvolumet i brønnene er 20µL. Brukte vortex og sentrifugerte prøvene lett før inkubasjon. Inkuberte på “PCR maskin” (*Vedlegg 3*) (27).

Måling av levende og døde bakterier

Prøver tilsatt *Sinalinsyre* ble tatt ut fra annenhver måling av bakteriekonsentrasjon for å undersøke ratio mellom døde og levende bakterier. Det ble brukt fluorescens mikroskop som kan ta opp fluorescens fra 3.34 mMSYTO®9nucleicacid-stain som ble tilsatt bakteriene i en fortykning på 1:10. De levende bakteriene vil bindes til fargestoffet (*Vedlegg 6*) (28).

$\Delta\Delta CT$

Bruker gjennomsnittlig CT verdi for normaliseringsgener; gyrB og gmk og gjennomsnittlig CT for variabelt gen sarA. Bruker dermed fire verdier. (TE): Variabel genekspressjon, eksperimentelt. (TC): Variabel genekspressjon, kontroll. (HE): Normal genekspressjon, eksperimentelt og (HC): Normal genekspressjon, kontroll.

Deretter regnes forskjellen på TE og HE, (TE-HE) og forskjellen på TC og HC. (TC-HC).

Dette vil bli ΔCT , eksperimentelt (ΔCTE) og kontroll (ΔCTC). Deretter kalkuleres forskjellen mellom ΔCTE og ΔCTC , ($\Delta CTE - \Delta CTC$). Da har man dobbel-delta CT-verdien ($\Delta\Delta CT$). Ved å ta $2^{-\Delta\Delta CT}$ vil sammenhengen bli lineær og ikke eksponentiell, slik som CT verdiene framstår originalt (29).

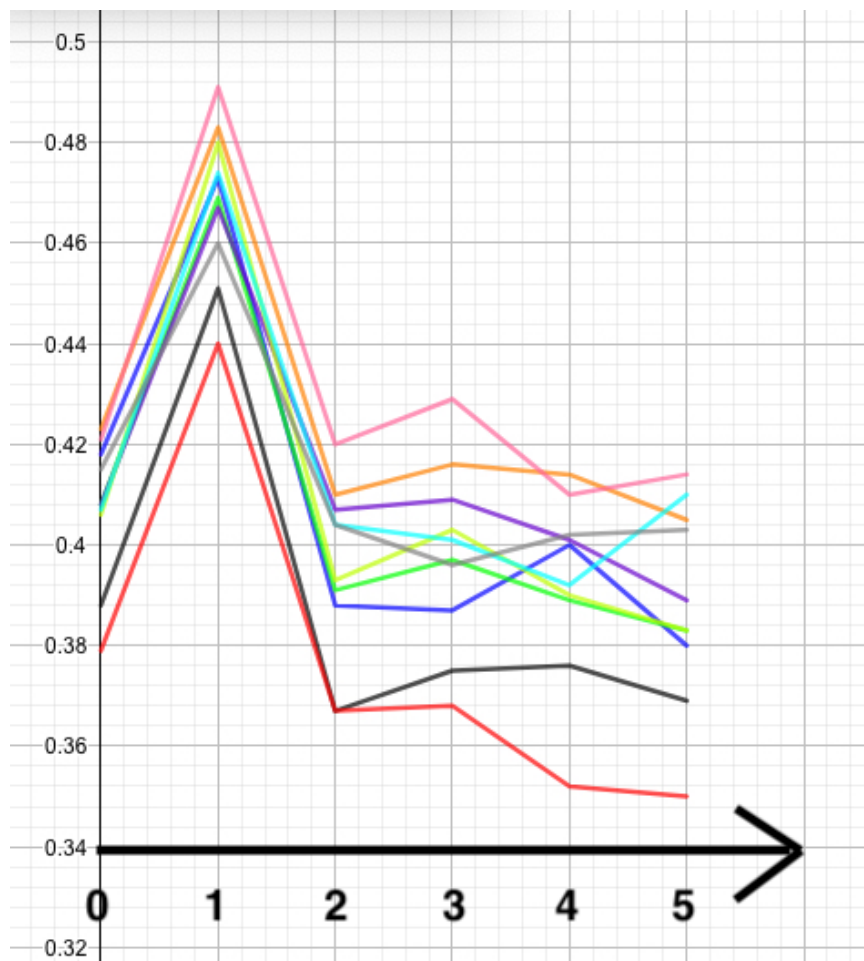
Formel:

$$\Delta\Delta CT = \frac{(TE-HE)}{(TC-HC)} = \Delta CTE - \Delta CTC = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

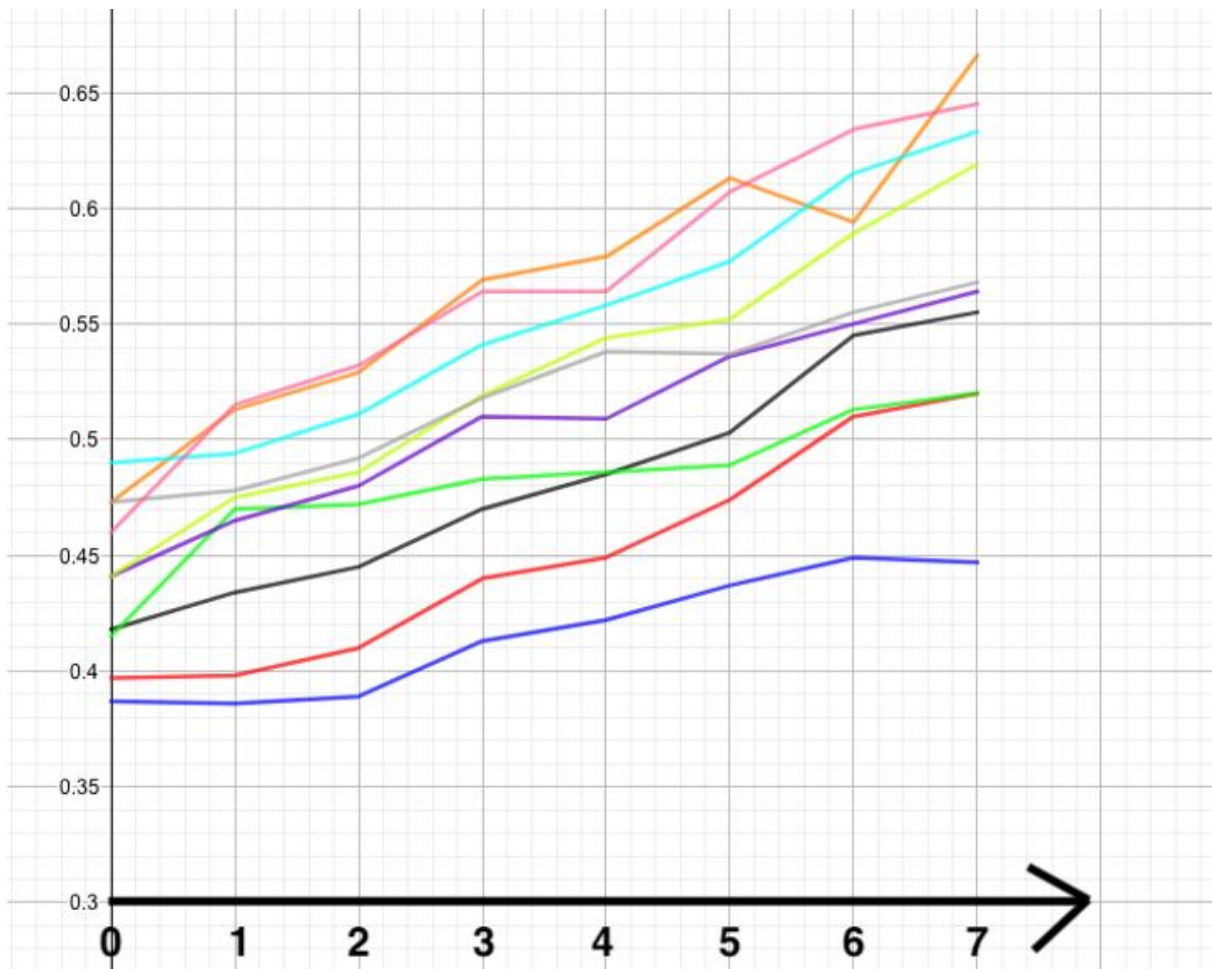
Resultat

Bakterievekst etter tilsatt *Sinalin*TM neuraminsyre

Vekstkurve for *Streptococcus pyogenes* og *Staphylococcus aureus* tilsatt *Sinalinsyre* over henholdsvis 6 og 8 målinger. Målingene er avlest spektrofotometrisk ved 600nm. Verdiene er plottet inn i hver sin graf som viser sammenhengen (Vedlegg 9, 10).



Figur R-1. *S.pyogenes* med tilsatt *Sinalinsyre* i ulike konsentrasjoner: løsnig 1: svart, løsnig 2: rød, løsnig 3: blå, løsnig 4: grønn, løsnig 5: lilla, løsnig 6: gul, løsnig 7: oransje, løsnig 8: turkis, løsnig 9: grå, kontroll: rosa.



Figur R-2. *S.aureus* med tilsatt *Sinalinsyre* i ulike konsentrasjoner: løsning 1: svart, løsning 2: rød, løsning 3: blå, løsning 4: grønn, løsning 5: lilla, løsning 6: gul, løsning 7: oransje, løsning 8: turkis, løsning 9: grå, kontroll: rosa.

qPCR-analyse

CT verdier.

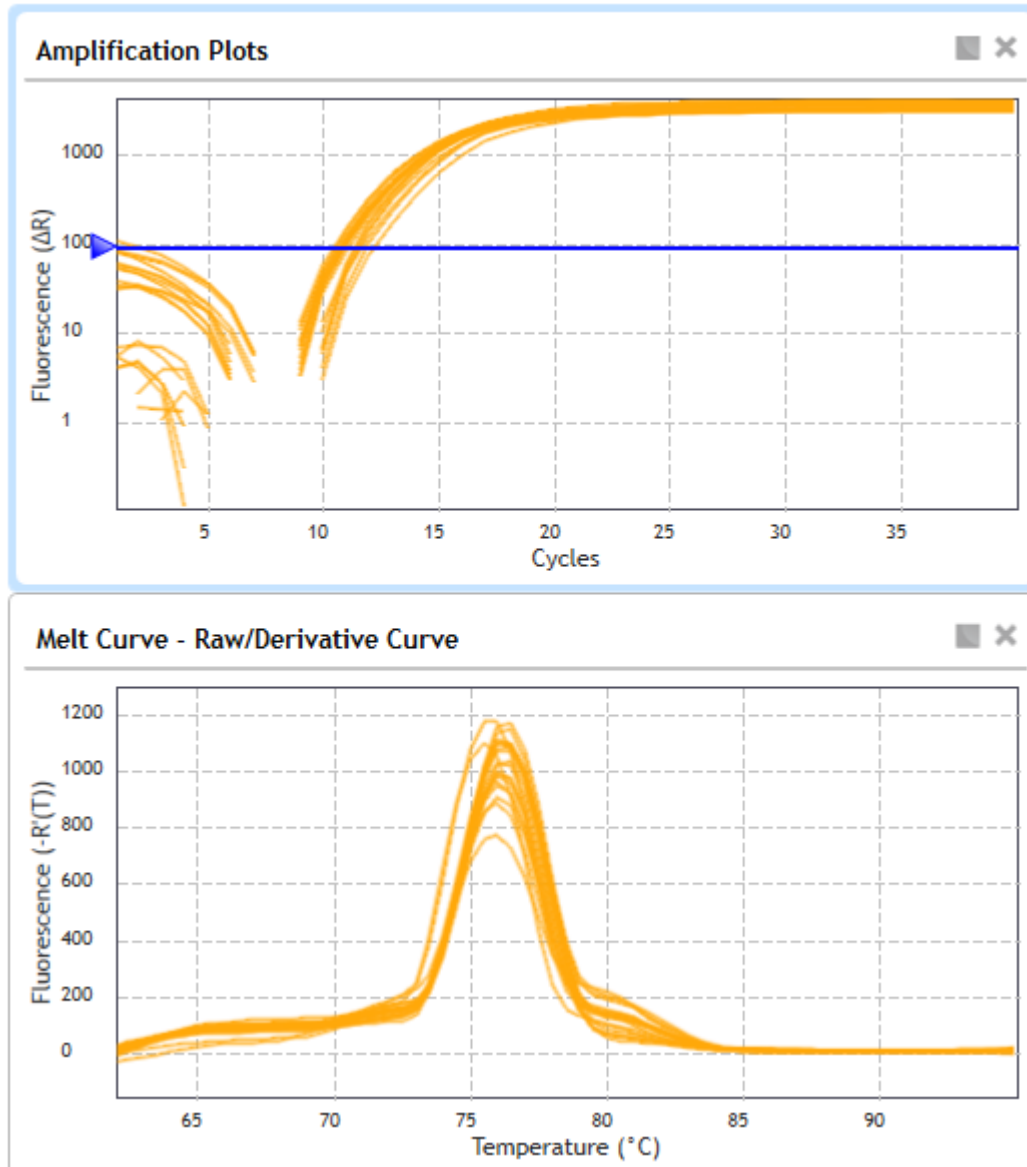
RT-qPCR-analyse ga CT verdiene vist i Tabell R-1. Vi har tatt medianen av de to parallellene for hver prøve. CT-verdien er antallet sykluser kjørt hvor fluorescenssignalet fra målsekvensen overgår bakgrunnsstrålingen (*Vedlegg 13*).

Tabell R-1. CT-verdier, median.

Prøve	gyrB	gmk	sarA	
1	10,99	12,12	10,85	
2	10,84	11,78	9,87	
3	11,39	12,37	10,79	
4	11,78	12,34	10,78	
5	11,81	12,63	10,93	
6	11,14	12,3	10,73	
7	11,2	12,52	10,78	
8	11,42	12,34	10,65	
9	11,1	12,8	11,08	
10	12,07	13,4	11,2	

Termisk profil

Amplifikasjons- og smeltekurve for normaliseringsgen, gyrB. Amplifikasjonskurven viser hvor fluorecenssignalet overstiger bakgrunnsstrålingen. Smeltekurven viser spesifisiteten til produktene. Termisk profil for gmk, sigB og sarA er i vedlegg (Vedlegg 20, 21, 22).



Figur R-2. GyrB. Amplifikasjons- og smeltekurve. Terskelverdi 98(ΔR).

$\Delta\Delta CT$

$\Delta\Delta CT$ viser forholdet mellom de ulike målgenene. For å finne $\Delta\Delta CT$ brukte vi gjennomsnittlig CT-verdi for eksperimentelle prøver og for kontroll til hvert målgen. «Expression Fold Change» viser forholdet mellom to gener lineært. Vi satt opp $\Delta\Delta CT$ for hvert av de normaliseringsgenene mot variabelt gen, sarA og de normaliseringsgenene mot hverandre.

Verdier brukt for $\Delta\Delta CT$;

CT for gyrB, eksperimentelt: 11,33. CT for gyrB, kontroll: 12,07

CT for gmk, eksperimentelt: 12,36. CT for gmk, kontroll: 13,4

CT for sarA, eksperimentelt: 10,71. CT for sarA, kontroll: 11,2

Tabell R-4: $\Delta\Delta CT$: gyrB mot sarA

gyrB/sarA	Average Experimental Ct Value	Average Experimental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
	TE	HE	TC	HC	ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Housekeeping Gene	-	11,33	-	12,07	-0,62	-0,87	0,25	0,840896415
Gene being Tested	10,71	-	11,20	-				

Tabell R-5: $\Delta\Delta CT$: gmk mot sarA

gmk/sarA	Average Experimental Ct Value	Average Experimental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
	TE	HE	TC	HC	ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Housekeeping Gene	-	12,36	-	13,40	-1,65	-2,20	0,55	0,683020128
Gene being Tested	10,71	-	11,20	-				

Tabell R-6: $\Delta\Delta\text{CT}$: gyrB mot gmk

gyrB/gmk	Average Experimental Ct Value	Average Experimental Ct Value	Average Control Ct Value	Average Control Ct Value	ΔCt Value (Experimental)	ΔCt Value (Control)	Delta Delta Ct Value	Expression Fold Change
	TE	HE	TC	HC	ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$
Housekeeping Gene (gyrB)	-	11,33	-	12,07	1,03	1,33	-0,30	1,231144413
Housekeeping Gene (gmk)	12,36	-	13,40	-				

Diskusjon

Bakterievekst ved tilsetning av *Sinalin*TM neuraminsyre

Dette forsøket ble utført på vegne av Viiral AS for å undersøke hvordan *Sinalinsyre* påvirker bakterievekst. For *Staphylococcus aureus* sammenlignes vekst for *S.aureus* tilsatt *Sinalinsyre* (Vedlegg 9). Resultatene viser at negativ kontroll (prøve 10) ligger litt høyere enn prøvene tilsatt ulike konsentrasjoner *Sinalinsyre* (prøve 1-9) (Figur R-2). Hos *Streptococcus pyogenes* viser resultatene samme trend som hos *S.aureus* (Vedlegg 10). I prøvene tilsatt *Sinalinsyre* (prøve 1-9) er det høyere konsentrasjon ved de to første målingene, men etter 2 timer faller konsentrasjonen på alle prøvene. Mot slutten har prøvene med *Sinalinsyre* lavere konsentrasjon enn negativ kontroll (prøve 10) (Figur R-1). Resultatene fra dette forsøket tilsier at *Sinalinsyre* ikke påvirker bakterieveksten til *S.aureus* og *S.pyogenes* grunnet minimal forskjell i bakteriekonsentrasjon mellom prøvene og negativ kontroll.

Uttrykning av de variable genene sigB og sarA, og normaliseringsgenene gyrB og gmk

To forskjellige metoder ble benyttet under qPCR-analyseringen. Den ene metoden var *to-steps metoden*, hvor det isolerte RNA (Vedlegg 2) ble syntetisert til cDNA (Vedlegg 3). Det ferdig syntetiserte cDNA ble deretter benyttet som templat for qPCR-analysen (Vedlegg 4). Den andre metoden som ble brukt var *ett-steps metoden* (prosedyre 5). Ved denne metoden ble RNA-et direkte tilført under qPCR-analysen. Syntetiseringen av cDNA er en funksjon av qPCR-programmet. *Ett-steps metoden* ga tydelig bedre resultater, derfor fokuseres det på resultatene fra denne metoden.

Genekspresjon ble undersøkt basert på 4 forskjellige gen, 2 normaliseringsgen, gyrB og gmk, og 2 variable gen, sigB og sarA. Disse genene skal generelt sett uttrykkes likt, men de variable genene vil under bakterielt-stress uttrykkes forskjellig fra normaliseringsgenene. Dette kan sees ved at CT-verdiene til de variable genene vil avvike fra normaliseringsgenene. For å se stabiliteten i forsøket sammenlignes uttrykket mellom normaliseringsgenene.

$\Delta\Delta$ CT-verdiene viser at variabelt gen *sarA* er noe oppregulert i forhold til normaliseringsgenene *gyrB* og *gmk*. Smeltepunktskurvene til genene *gyrB*, *gmk* og *sarA* viser at produktene er spesifikke (*Vedlegg 20, 21, 22 og Figur R-2*). Stabiliteten til forsøket kan sees på $\Delta\Delta$ CT-forholdet til *gyrB/gmk*. Under teoretiske forhold skulle disse uttrykkes likt, men resultatet viser en liten variasjon, men de er stabile. Dette er en svakhet i forsøket. Variasjonen i uttrykket mellom normaliseringsgenene er nesten like stort som mellom *gyrB/gmk* og *sarA*. Dette indikerer liten grad av bakterielt stress (*Tabell R-4, R-5, R-6*).

Resultatet viser at CT-verdiene på primerne *gyrB*, *gmk* og *sarA* hadde relativt høy presisjon, mens *sigB* primeren stort sett ga falskt positive verdier. Dette kan gi en indikasjon på at primer designet til *sigB* har påvirket resultatet. Dette skjer ved at SYBR green ikke får bundet seg til primer, da vil primerne bindes til hverandre og dannet et falskt positivt resultat.

Det oppsto en del falske positive resultater, spesielt hos *sigB* primeren. De aller fleste falskt-positive kom etter 30 sykluser. Dette kunne vært unngått ved å kjøre analysen på et program med færre amplifikasjons-sykluser, eller ved å tilsette mindre RNA. Mengden RNA påvirker sannsynligvis resultatet i liten grad i dette tilfellet.

Smeltekurven brukes for å bestemme om produktet som er amplifisert kommer fra målsekvensen. Prøvene med toppunkt $<75^{\circ}\text{C}$ i smeltepunktskurven er ekskludert. Disse prøvene er falske positive. Alt resultat som ligger i dette området er uspesifikt, disse svarene er mest sannsynlig et resultat av primer dimere. Prøvene med topp $>75^{\circ}\text{C}$ er spesifikke. Disse resultatene er beholdt. Resultatene viser at produktene fra *sigB* er uspesifikke, i tillegg til at disse uttrykkes mye senere i amplifikasjonskurven, i forhold til *gyrB*, *gmk* og *sarA* (*Vedlegg 21, 23*).

SigB er en viktig faktor for bakteriell tilpasning under langvarig stress. SigB koder for sigma-faktor B. σ_B aktiverer gener som uttrykkes ved eksponering til bl.a. stress og stasjonærfase. I σ_B positive organismer er σ_B bundet inaktivt til RsbW. σ_B aktiveres ved at RsbU positivt regulerer σ_B aktiviteten (12).

Ekspresjonen av sarA vil kunne øke ved økt sigB ekspresjon. sarA koder for et DNA-bindende aktivator-/inhibitorprotein for virulens. Under stress vil sarA respondere med økt ekspresjon. Dette skjer for at bakterien skal kunne fortsette å regulere produksjon av virulensfaktorer ved miljøendringer. Resultatene våre viser en klar tilstedeværelse av sarA. Resultatene er veldig presise. Prøven uten *Sinalinsyre* varierte ikke fra prøvene med tilsetning av løsninger, dermed har ikke sarA-ekspresjonen økt på grunn av de tilførte stress- og miljøfaktorene bakteriene var utsatt for.

Det var små forskjeller på vekstkurvene til prøvene tilsatt *Sinalinsyre* sammenlignet med negativ kontroll. Dette kan forklare at variabelt gen sarA ikke er betydelig påvirket av stressfaktorer. Ekspresjonen av normaliserings- og de variable genene hadde lav variasjon. Dette kan sees i sammenheng med at vekstkurvene også var lite påvirket.

Konklusjon

Målet for oppgaven var å se om *Sinalin*TM *neuraminsyre* påvirker vekst av bakteriene *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes* og undersøke om *Sinalinsyre* er en stressfaktor som opp- eller nedregulerer ekspresjonen av de variable genene *sigB* og *sarA* hos *S.aureus*.

Grunnet at vår forskning er begrenset med lav kvantitet av prøver, kan man ikke konkret fastslå at *Sinalinsyre* påvirker vekstvilkårene til bakteriene. Alt resultat den utførte forskningen har gitt viser at *Sinalinsyre* ikke fremmer bakterievekst hos *S.aureus* og *S.pyogenes*.

Det kan ikke konkluderes at ekspresjonen av *sigB* påvirkes av *Sinalinsyre* på grunn av manglende resultat forårsaket av metodiske faktorer. Ved å teste ut ulike typer primerdesign for *sigB* kunne dette gitt konkrete resultater. Variabelt gen *sarA* var noe oppregulert i forhold til normaliseringsgenene, men variasjonene i uttrykket mellom normaliseringsgenene tyder på at denne oppreguleringen er ubetydelig. Vi kan derfor konkludere med at *Sinalinsyre* ikke endrer uttrykket av *sarA* eller forårsaker bakterielt stress.

Litteraturliste

1. Purushotama V. Dasaraju and Chien Liu. Chapter 93 Infections of the Respiratory System. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8142/>
2. Tone Tønjum. Stafylokokker. Store Medisinske Leksikon. 06.05.2019: <https://sml.snl.no/stafylokokker>
3. Gunn Sigrud Høiby-Pettersen. Vekst og overlevelse av matrelaterte bakterier på antimikrobielle overflater. Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap Masteroppgave 2010. https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/186297/Masteroppgaven.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR3JTifXaTILSJi5i706pfRKx-TKjbYR9IOmQTRovwEHf0muK9cQi_glfBM
4. Malcolm J. Horsburgh, Joanne L. Aish, Ian J. White, Les Shaw, James K. Lithgow, Simon J. Foster. σ^B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Journal of Bacteriology* Oct 2002, 184 (19) 5457-5467; DOI: 10.1128/JB.184.19.5457-5467.2002. <https://jb.asm.org/content/184/19/5457.short>
5. Kanika Gera og Kevin S McIver. Laboratory Growth and Maintenance of *Streptococcus pyogenes* (The Group A Streptococcus, GAS). NCBI. 2013 (endret 2014). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920295/>
6. Tone Tønjum. Streptokokker. Store Medisinske Leksikon. 06.05.2019: <https://sml.snl.no/streptokokker>
7. Boor KJ (2006) Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biol* 4(1): e23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040023>
8. Traber KE, Lee E, Benson S, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*. 2008;154(Pt 8):22652274.doi:10.1099/mic.0.2007/0118740. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4904715/?fbclid=IwAR0ARPLY6KrzH22x6MiUmtYvIcmN8fukBtqby2EcUIXAnE-eLX-SmWcJx-Q>

9. Hongjun He, Raymond Hovey, Jason Kane, Vineet Singh, Thomas C. Zahrt. MprAB Is a Stress-Responsive Two-Component System That Directly Regulates Expression of Sigma Factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* Mar 2006, 188 (6) 2134-2143; **DOI:** 10.1128/JB.188.6.2134-2143.2006.
<https://jb.asm.org/content/188/6/2134.short>
10. Malcolm J. Horsburgh, Joanne L. Aish, Ian J. White, Les Shaw, James K. Lithgow, Simon J. Foster. σ^B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Journal of Bacteriology* Oct 2002, 184 (19) 5457-5467; **DOI:** 10.1128/JB.184.19.5457-5467.2002.
<https://jb.asm.org/content/184/19/5457.short>
11. Niles P. Donegan, Ambrose L. Cheung. Regulation of the *mazEF* Toxin-Antitoxin Module in *Staphylococcus aureus* and Its Impact on *sigB* Expression. *Journal of Bacteriology* Mar 2009, 191 (8) 2795-2805; **DOI:** 10.1128/JB.01713-08.
<https://jb.asm.org/content/191/8/2795.short>
12. Hanna Engelberg-Kulka, Ronen Hazan, Shahar Amitai. *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *Journal of Cell Science* 2005 118: 4327-4332; doi: 10.1242/jcs.02619.
<http://jcs.biologists.org/content/118/19/4327.short>
13. Lorena Tuchscher, Markus Bischoff, Santiago M. Lattar, Mariangeles Noto Llana, Henrike Pfortner, Silke Niemann, Jennifer Geraci, Hélène Van de Vyver, Martin J. Fraunholz, Ambrose L. Cheung, Mathias Herrmann, Uwe Völker, Daniel O. Sordelli, Georg Peters, Bettina Löffler. Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. Published: April 29, 2015:
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004870>
14. Gabriel Mitchell, Alexandre Fugère, Karine Pépin Gaudreau, Eric Brouillette, Eric H. Frost, André M. Cantin, François Malouin. SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. Published: May 21, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065018>
15. Pan F. Chan, Simon J. Foster. Role of SarA in Virulence Determinant Production and Environmental Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. Dec 1998, 180 (23) 6232-6241; **DOI:** <https://jb.asm.org/content/180/23/6232.full>

16. David F. Fujimoto, Robin H. Higginbotham, Kristen M. Sterba, Soheila J. Maleki, Anca M. Segall, Mark S. Smeltzer, Barry K. Hurlburt. *Staphylococcus aureus* SarA is a regulatory protein responsive to redox and pH that can support bacteriophage lambda integrase-mediated excision/recombination..10 December 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06942.x>
17. Ballal A, Manna AC. Expression of the sarA family of genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 7):2342–2352.
doi:10.1099/mic.0.027417-0.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2888119/>
18. Malcolm J. Horsburgh, Joanne L. Aish, Ian J. White, Les Shaw, James K. Lithgow, Simon J. Foster. σ^B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Journal of Bacteriology* Oct 2002, 184 (19) 5457-5467; DOI: 10.1128/JB.184.19.5457-5467.2002.
<https://jb.asm.org/content/184/19/5457.short>
19. Roald, Borghild. (2009, 13. februar). fluorescensmikroskopi. Store Medisinske Leksikon. 30. april 2019: <https://sml.sn.no/fluorescensmikroskopi>
20. RNeasy ® Mini Handbook (Forth Edition), Quiagen. 2012.
<http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf>
21. Erik Dissen. Store medisinske leksikon. 21.05.2019.
<https://sml.sn.no/genekspresjon?fbclid=IwAR1Xc-Mdh6Yk9OC SHKZsyLCLi8G2NFWGUCfUhSK3P2iZ3wu0QdT3JwsvpK0> *
22. Marie Aslaksen Røed. PCR og Analyseprinsipp. EQS Helse Møre og Romsdal. 10.05.2019.
23. Thermo Fisher Scientific. 21.05.2019. *
https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html?fbclid=IwAR2ipxj5ajvg_B3wk6KtFHGOvCyna92aOlSoiZBnIppQjieK769YyEI_o_UQ

24. AriaMx Real-Time PCR Software. Revision C0, February 2016 Agilent Technologies, Inc. 5301 Stevens Creek Blvd. Santa Clara, CA 95051.
<http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/ariamx-softwaremanual.pdf>
25. Jitao Davis Zhang, Markus Ruschhaupt, Rudolf Biczock. *ΔΔCt method for qRT-PCR data analysis*. 02.05.2019.
<https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/ddCt/inst/doc/rtPCR.pdf?fbclid=IwAR2n9YxccQ83QA2TBvTrrZFhBv5BGTLrNZIgzKpdc98qESlvYKoAaLm7M>
26. Quantabio. 01.05.2019. https://www.quantabio.com/media/contenttype/IFU-065.1_REV_03_95089_qScript_One-Step_SYBR_Green_qRT-PCR_Kit_Low_ROX.pdf
27. qScript® cDNA SuperMix. Quantabio.
https://www.quantabio.com/media/contenttype/IFU-025.1_REV_02_95048_qScript_cDNA_SuperMix.pdf
28. Fluorescens-mikroskopi av levende/døde bakterier.
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/live-dead-baflight-bacterial-viability-protocol.html>
29. Surnanth Kannan. 4 Easy Steps to Analyze your qPCR Data Using Double Delta Ct Analysis. 13.05.2019: <https://bitesizebio.com/24894/4-easy-steps-to-analyze-your-qpcr-data-using-double-delta-ct-analysis/>

Vedlegg

Prosedyrer

Vedlegg 1: Dyrkning av *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pyogenes*. *Staphylococcus aureus* og *Haemophilus influenzae*.

Del I: Dyrkning av bakterier uten tilsetninger.

Notat: Brenn åpningen på erlenmeyerkolbene før og etter inseminering og uttak av bakteriene.

- Lag NB (4g, 450ml) Autoklaver før tilsetning av bakterier
- Ta smultringer med nedfryste (inaktiverte) bakterier i NB, sett i varmeskap (35°C) i ca 4 døgn.
- Rekulter med 3 ulike konsentrasjoner; 1, 2 og 3 ml bakterieløsning i 49, 48 og 47 ml NB (autoklavert). Dvs 4x3 løsninger til rekultering.
- Rekulter *S.pyogenes*, *S.pneumoniae* og *H.influenzae* i 24 timer. Og *S.aureus* i 18 timer, pga høy vekst.
- Mål bakterievekst ved 600nm, 1 cm lysvei i spektrofotometer hver time, opptil 12 målinger.
- Bruk NB som blank og auto-zero med blank-blank.
 - Konsentrasjoner: *S.aures*: 1:49 ml. *S.pyogenes*: 1:49 ml. *S.pneumoniae*: 3:47 ml. *H.influenzae*: 3:47 ml.
- Tell bakterier i tellekammer for å se sammenhengen mellom økning i ABS og økning i antall bakterier.
- Ingen vekst hos *S.pneumoniae* og *H.influenzae* i dette mediet, derfor sjekket vi ikke disse opp mot Viiral løsningene.
- Lag standardkurve til *S.aureus* og *S.pyogenes* uten tilsetninger.

Del II: Med tilsetninger av *Sinalinsyre*TM *neuraminsyre* fra Viiral AS neseppray

- Lag NB med høyere konsentrasjon. 10% mindre vann, dvs 4 g/405ml. Dette er fordi vi skal fortynne med 9 ulike løsninger m/ *Sinalinsyre* fra Viiral neseppray.
- Ta bakterieløsning fra forrige måling opp og rekultiver disse.
- *S.aureus*: 1:49 ml. *S.pyogenes*: 2:18 ml
- Inkuber *S.aureus* i 18 timer, *S.pyogenes* i 24 timer før avlesning.
- Tilsett vi 1,25 ml løsning i *S.pyogenes* og 3,5 ml i *S.aureus* rett før første måling
 - 9 prøver, 2 kontroller. Alt dette i 2 paralleller.
- Auto-zero med NB og tilsvarende mengde fysiologisk saltvann som løsning i prøvene.
- Les av ABS og lag vekstkurve med 8 målinger for *S.aureus* og 6 målinger for *S.pyogenes*.
- Prøvene fra time 2 og siste (8 og 6) for hver bakterie pippeteres til eppendorfrør til qPCR-analyse, legg prøvene i kjøleskapet.
 - Oddetallsmålinger ble tatt vare på til fluorescensmikroskopering for å anslå levende/døde bakterier.

Vedlegg 2: RNeasy Prosedyre.

Flytende bakteriekultur i eppendorf-rør. Sentrifuger, hell av supernatanten og tilsett RNlater reagens. Kjøøl ned.

1. Ha en 5mm stålkule i hvert 2ml-Safe-Lock rør.
2. Sentrifuger Eppendorf-rør med prøve i 5 minutter ved 500g i 4 °C. Hell av supernatanten og fjern forsiktig resterende medium.
Notat: Gjenværende medium vil forstyrre lyseringen og fortynne lysatet. Dette vil påvirke binding til RNeasy-membranen samt redusere RNA-utbytte.
(Sentrifugering senere i prosedyren krever 20-25 °C).
3. Tilsett 700µl av RLT-buffer, vortex i 5-10 sekunder.
Notat: Pelleten må være fullstendig oppløst i RLT-buffer.
4. Overfør løsningen fra Eppendorf-rør til 2 ml Safe-Lock rør med 5 mm stålkule. Ødelegg bakteriecellene med TissueLyser i 5 minutter ved maks hastighet.
5. Sentrifuger i 10 sekunder ved maksimal hastighet. Overfør supernatanten til nytt rør, volumet av røret må være minst det dobbelte av buffer volumet.
6. Anslå volum av supernatanten. Tilsett tilsvarende volum med etanol 96%, bland med pipette.
Etter tilsetning kan det oppstå utfellinger, dette vil ikke påvirke RNeasy prosedyren.
7. Overfør opp til 700µl lysat, inkluder mulige utfellinger som kan ha forekommet til en RNeasy spinn-kolonne, som er plassert i et 2ml samlerør. Lukk lokket forsiktig og sentrifuger i 15 sekund $\geq 10\ 000$ rpm. Hell ut væsken fra samlerøret.
Notat: Dersom det er over 700µl lysat, sentrifuger delmengdene etter hverandre, gjennom RNeasy spinn-kolonnen. Fjern væsken i samlerørene etter hver sentrifugering.
Gjenbruk samlerøret i trinn 8.
8. Tilsett 700 µl RV1-buffer til RNeasy spinn-kolonne. Lukk lokket forsiktig igjen og sentrifuger i 15 sekund $\geq 10\ 000$ rpm, for å vaske spinn-kolonne membranen. Hell ut væsken fra samlerøret.
Notat: Fjern RNeasy spinn-kolonnen fra samlerøret etter sentrifugering, sånn at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken i samlerøret.
Gjenbruk samlerøret i trinn 9

9. Tilsett 500 μ l RPE Buffer til RNeasy spinn-kolonnen. Lukk lokket forsiktig og sentrifuger i 15 sekund \geq 10 000 rpm for å vaske spinn-kolonne membranen. Hell ut væsken fra samlerøret.
Notat: RPE bufferen kommer som konsentrat, vær sikker på at etanol er tilsatt bufferen før bruk.
Gjenbruk samlerøret i trinn 10.
10. Tilsett 500 μ l RPE Buffer til RNeasy spinn-kolonnen. Lukk lokket forsiktig og sentrifuger i 2 minutt \geq 10 000 rpm for å vaske spinn-kolonne membranen.
Den lange sentrifugeringen tørker ut spinn-kolonne membranen, dette sørger for at ingen etanol blir overført under RNA-eluering. Rest-etanolen kan forstyrre nedstrømsreaksjoner.
Notat: Fjern RNeasy spinn-kolonnen fra samlerøret etter sentrifugering, sånn at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken i samlerøret. Ellers vil overføring av etanol kunne oppstå.
11. Plasser RNeasy spinn-kolonnen i et nytt 2ml samlerør og hell ut væsken fra det gamle samlerøret. Lukk lokket forsiktig igjen og sentrifuger ved maks hastighet i 1 minutt. Utfør dette steget for å eliminere mulige overføringer av RPE buffer, samt for å fjerne eventuelle væske-rester fra utsiden av RNeasy spinn-kolonnen.
12. Plasser RNeasy spinn-kolonnen i et nytt Eppendorf rør, tilsett 30-50 μ l RNase-fritt vann direkte til spinn-kolonne membranen. Lukk lokket forsiktig igjen og sentrifuger i 1 minutt \geq 10 000 rpm for å eluere RNA.
Frys ned prøvene ved minus 20 °C. Når prøven er fryst, legg de i minus 80°C.

Vedlegg 3: CDNA syntese.

1. qScript cDNA Supermix 4µl
2. qScript RT 1µl
3. RNA templat 15µl
4. Inkubasjon på PCR maskin
 - 5 minutter ved 25°C
 - 30 minutter ved 42°C
 - 5 minutter ved 85°C
 - Hold ved 4°C

Vedlegg 4: qPCR.

Primer konsentrasjon er 100 µM

1. Bruksløsning for primere; bland 10µl primer med 90µl nuklease-fritt vann. Vortex og spinn.
2. Mastermix for primerpar;
gyrBf og gyrBr, gmkf og gmkr, sigBf og sigBr, sarAf og sarAr.
 - 7,5 µl SYBR green,
 - 1 µl av hver primer-bruksløsning, dvs. 2 µl, reverse og forward.
 - 4,5 µl nuklease-fritt vann.
 - 1 µl cDNAVortex og spinn etter tilblanding.
3. Bruker mikrotiterplate. 1 brønn per prøve. Hver prøve testes mot hver primer i 2 paralleller.
4. Negativ kontroll mot hver primer i 2 paralleller.

Vedlegg 5: qScript™ One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit, Low ROX™.

1. Bruksløsning for primere; bland 10µl primer med 90µl nuklease-fritt vann. Vortex og spinn.
2. Mastermix for primerpar;
gyrBf og gyrBr, gmkf og gmkr, sigBf og sigBr, sarAf og sarAr:
 - One step SYBR green mix – 12,5 µl
 - Forward primer (10 µM) – 0,75 µl
 - Reverse primer (10 µM) – 0,75 µl
 - Nukleasefritt vann – 6 µl
 - qscript onestep RT (revers transcriptase) – 1 µl
 - RNA templat – 4 µlVortex og spinn etter tillaging.
3. Bruker mikrotiterplate. 1 brønn per prøve. Hver prøve testes mot hver primer i 2 paralleller.
4. Negativ kontroll mot hver primer i 2 paralleller.

Vedlegg 6: Måling av levende/døde bakterier på fluorescensmikroskop.

1. Farg bakterieløsning ved å fortynne 3.34 mMSYTO® nucleic acid-stain 1:10 med nukleasefritt-vann.
2. 5 µl bakterieløsning med 2 µl fortynnet farge. Sentrifuger lett.
3. Mikroskopere med fluorescensmikroskop. (Grønne er levende bakterier, oransje er døde bakterier).

Tabeller

Vedlegg 7: (Tabell 1). Telling og måling av *S.pyogenes* og *S.aureus*. Telling av antall celler, og måling av absorban.

Time, telling	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.aureus</i>
1	67	443
2	88	567
3	110	650
4	156	643
5	369	667
6	240	631
7	205	728
8	178	628
9	155	638
10	193	661
11	194	623
12	172	741

Time	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.aureus</i>
1	0,313	0,421
2	0,492	0,51
3	0,382	0,536
4	0,334	0,585
5	0,332	0,606
6	0,332	0,638
7	0,395	0,672
8	0,333	0,71
9	0,327	0,701
10	0,344	0,735
11	0,35	0,75
12	0,356	0,767

Vedlegg 8: (Tabell 2). Vekstkurve tabell for *S.pyogenes* og *S.aureus*:

Time	<i>S.pyogenes</i> 1	<i>S.pyogenes</i> 2	<i>S.pyogenes</i> 3	<i>S. aureus</i> 1	<i>S.aureus</i> 2	<i>S. aureus</i> 3
1	0,317	0,332	0,361	0,344	0,292	0,358
2	0,356	0,386	0,381	0,425	0,481	0,478
3	0,395	0,391	0,401	0,495	0,478	0,509
4	0,39	0,394	0,389	0,519	0,531	0,533
5	0,391	0,39	0,394	0,543	0,543	0,556
6	0,392	0,397	0,4	0,594	0,575	0,587
7	0,409	0,397	0,401	0,617	0,613	0,62
8				0,626	0,623	0,648
9				0,632	0,637	0,638
10				0,648	0,655	0,658
11				0,657	0,673	0,67
12				0,68	0,696	0,691

Vedlegg 9: (Tabell 3). Viser resultat for absorpsjonsmåling av *S.aureus* etter tilsatt *Sinalinsyre*.

<i>S.aureus</i>											
Parallell 1											
Måling	Løsning	2	3	4	5	6	7	8	9	KTRL	
1	0,424	0,355	0,369	0,435	0,399	0,421	0,458	0,456	0,443	0,47	
2	0,43	0,391	0,377	0,457	0,448	0,462	0,503	0,485	0,471	0,52	
3	0,449	0,401	0,382	0,447	0,469	0,472	0,52	0,501	0,484	0,534	
4	0,472	0,428	0,404	0,469	0,5	0,498	0,558	0,534	0,504	0,567	
5	0,489	0,438	0,423	0,472	0,495	0,516	0,573	0,545	0,535	0,581	
6	0,5	0,455	0,419	0,473	0,536	0,528	0,591	0,572	0,53	0,608	
7	0,551	0,494	0,441	0,501	0,546	0,565	0,538	0,612	0,549	0,633	
8	0,566	0,503	0,439	0,509	0,556	0,577	0,661	0,63	0,561	0,649	
<i>S.aureus</i>											
Parallell 2											
Måling	Løsning	2	3	4	5	6	7	8	9	KTRL	
1	0,411	0,438	0,405	0,395	0,483	0,481	0,488	0,523	0,503	0,45	
2	0,438	0,405	0,395	0,483	0,481	0,488	0,523	0,503	0,485	0,51	
3	0,44	0,421	0,395	0,487	0,491	0,5	0,538	0,522	0,499	0,53	
4	0,467	0,451	0,421	0,496	0,52	0,539	0,58	0,547	0,532	0,561	
5	0,48	0,479	0,42	0,498	0,523	0,571	0,584	0,57	0,541	0,585	
6	0,506	0,493	0,455	0,504	0,535	0,575	0,635	0,582	0,543	0,606	
7	0,534	0,525	0,456	0,526	0,564	0,613	0,65	0,618	0,561	0,634	
8	0,545	0,537	0,455	0,53	0,572	0,661	0,671	0,635	0,575	0,641	

Vedlegg 10: (Tabell 4). Viser resultat for absorpsjonsmåling av *S.pyogenes* etter tilsatt *Sinalinsyre*.

<i>S.pyogenes</i>											
Parallell 1											
Måling	Løsning	2	3	4	5	6	7	8	9	Kontroll	
1	0,386	0,373	0,411	0,403	0,414	0,405	0,436	0,406	0,424	0,424	
2	0,444	0,431	0,457	0,473	0,466	0,479	0,492	0,470	0,477	0,492	
3	0,368	0,362	0,377	0,391	0,410	0,383	0,421	0,401	0,411	0,416	
4	0,369	0,368	0,378	0,391	0,417	0,395	0,418	0,403	0,407	0,424	
5	0,378	0,335	0,396	0,383	0,401	0,396	0,427	0,396	0,414	0,414	
6	0,364	0,345	0,375	0,381	0,391	0,382	0,418	0,411	0,412	0,413	
<i>S.pyogenes</i>											
Parallell 2											
Måling	Løsning	2	3	4	5	6	7	8	9	Kontroll	
1	0,390	0,384	0,424	0,412	0,401	0,407	0,410	0,407	0,405	0,418	
2	0,457	0,448	0,489	0,465	0,467	0,481	0,473	0,477	0,442	0,489	
3	0,365	0,372	0,398	0,390	0,404	0,402	0,398	0,407	0,396	0,424	
4	0,381	0,367	0,396	0,402	0,401	0,410	0,414	0,398	0,384	0,433	
5	0,375	0,368	0,404	0,394	0,401	0,383	0,401	0,388	0,389	0,416	
6	0,373	0,355	0,385	0,385	0,387	0,383	0,392	0,408	0,393	0,414	

Vedlegg 11: (Tabell 5). Estimering av forhold mellom døde og levende bakterier for *S.pyogenes* og *S.aureus*.

<i>S.pyogenes</i>																					
Måling	Løsning			2		3		4		5		6		7		8		9		KTRL	
1	50	50		20	80	50	50	40	60	40	60	80	20	50	50	50	50	40	60	40	60
3	90	10		20	80	50	50	50	50	40	60	90	10	10	90	40	60	40	60	30	70
5	60	40		20	80	60	40	60	40	40	60	50	50	30	70	40	60	30	70	20	80

<i>S.aureus</i>																					
Måling	Løsning			2		3		4		5		6		7		8		9		KTRL	
1	70	30		70	30	70	30	60	40	30	70	20	80	30	70	40	60	20	80	50	50
3	60	40		80	20	80	20	90	10	80	20	90	10	90	10	80	20	90	10	80	20
5	90	40		80	20	80	20	90	10	90	10	80	20	80	20	70	30	80	20	80	20
7	90	10		80	20	90	10	90	10	80	20	70	30	80	20	90	10	90	10	90	10

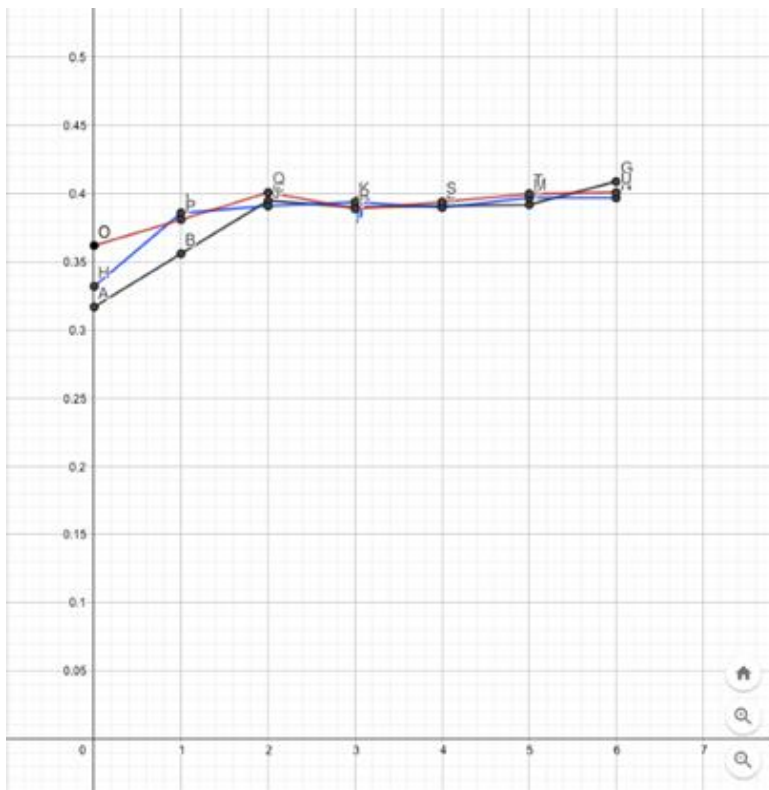
Vedlegg 12: (Tabell 6). Prøveoppsett til qPCR-analyse nr. 1. Prøve 10 er uten tilsatt *Sinalinsyre*.

Primere	GyrB	gmk	SigB	SarA	GyrB	gmk	SigB	SarA	GyrB	gmk	SigB	SarA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Prøve 1				Prøve 1				Prøve 10			
B	Prøve 2				Prøve 2				Prøve 10			
C	Prøve 3				Prøve 3				Negativ kontroll			
D	Prøve 4				Prøve 4				Negativ kontroll			
E	Prøve 6				Prøve 6							
F	Prøve 7				Prøve 7							
G	Prøve 8				Prøve 8							
H	Prøve 9				Prøve 9							

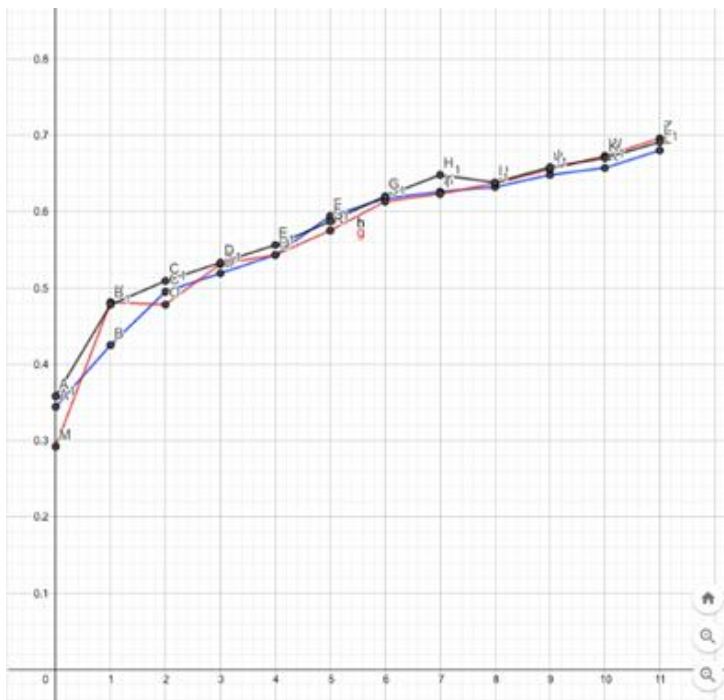
Vedlegg 13: (Tabell 7). Prøveoppsett til qPCR-analyse nr. 2. Prøve 10 er uten tilsatt *Sinalinsyre*.

Primere	GyrB	gmk	SigB	SarA	GyrB	gmk	SigB	SarA	GyrB	gmk	SigB	SarA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Prøve 1				Prøve 1				Prøve 9			
B	Prøve 2				Prøve 2				Prøve 9			
C	Prøve 3				Prøve 3				Prøve 10			
D	Prøve 4				Prøve 4				Prøve 10			
E	Prøve 5				Prøve 5				Negativ kontroll			
F	Prøve 6				Prøve 6				Negativ kontroll			
G	Prøve 7				Prøve 7							
H	Prøve 8				Prøve 8							

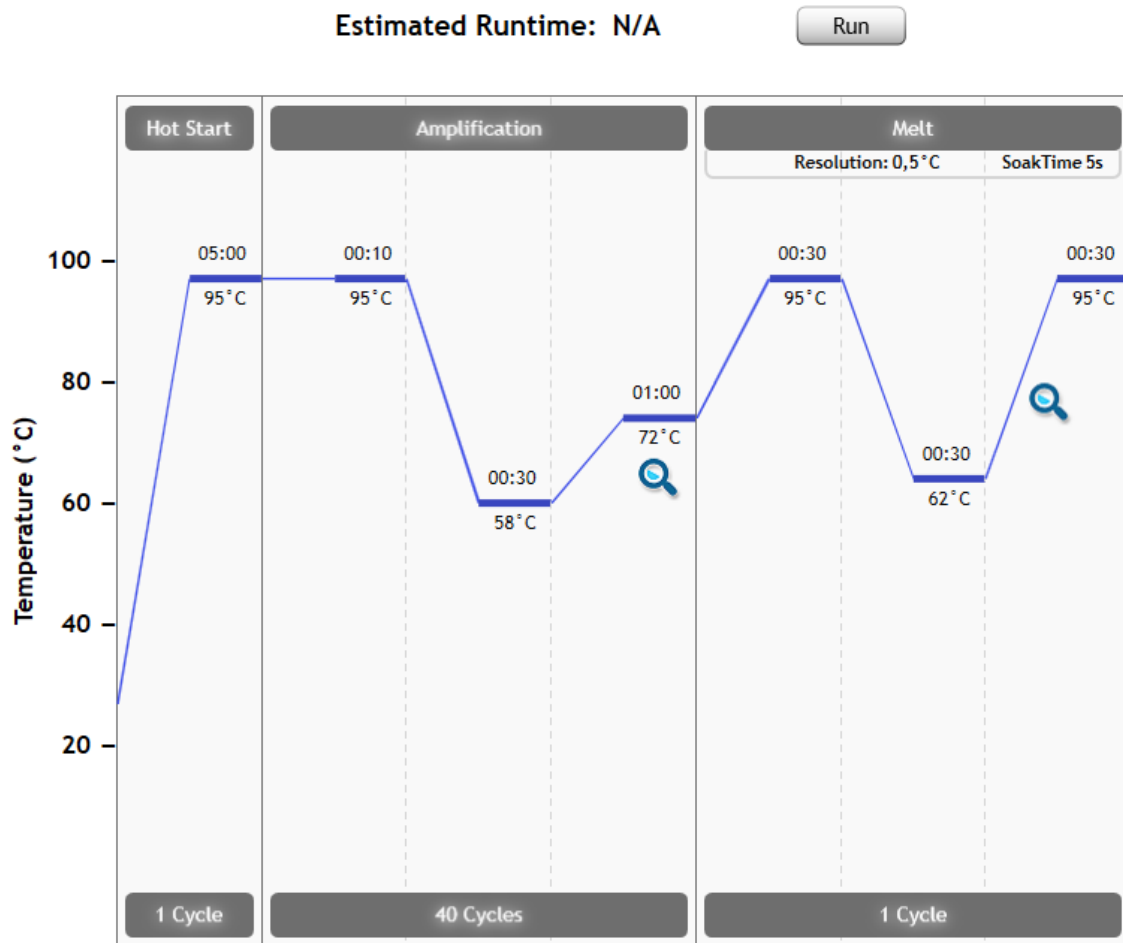
Figurer



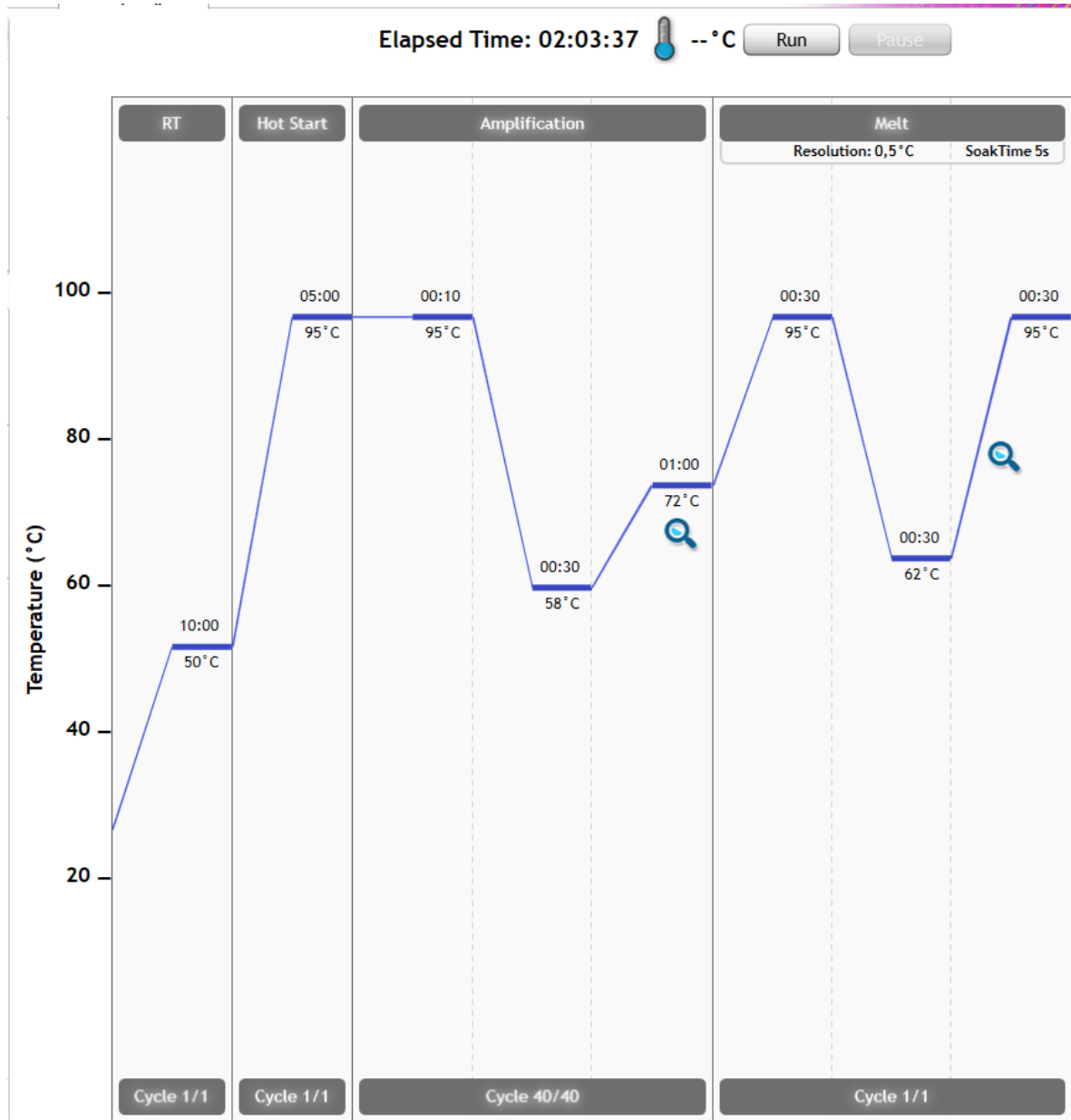
Vedlegg 14: (Figur 1). *S.pyogenes* vekstkurve, 7 målinger med 1 times intervall.



Vedlegg 15: (Figur 2). *S.aureus* vekstkurve, 12 målinger med en times intervall.



Vedlegg 16: (Figur 3). Program for kjøring 1. *to-steps* metode.



Vedlegg 17: (Figur 4). Program for kjøring 2. *ett-steps* metode.

```

Primer til SYBR green bacterial stresstest

housekeeping gene

gyrBsybrF      aattgaagcaggctatgtat
gyrBsybrR      atagaccatttttggtattg

gmkSYBRF      aaggtcгаагсaaгttagaa
gmkSYBRR      ctttacgcgcttcgtaatac

expression gene

sigBsybrF      atgtacgtttattgaaggattg
sigBsybrR      taatttcttaattgcggttctc

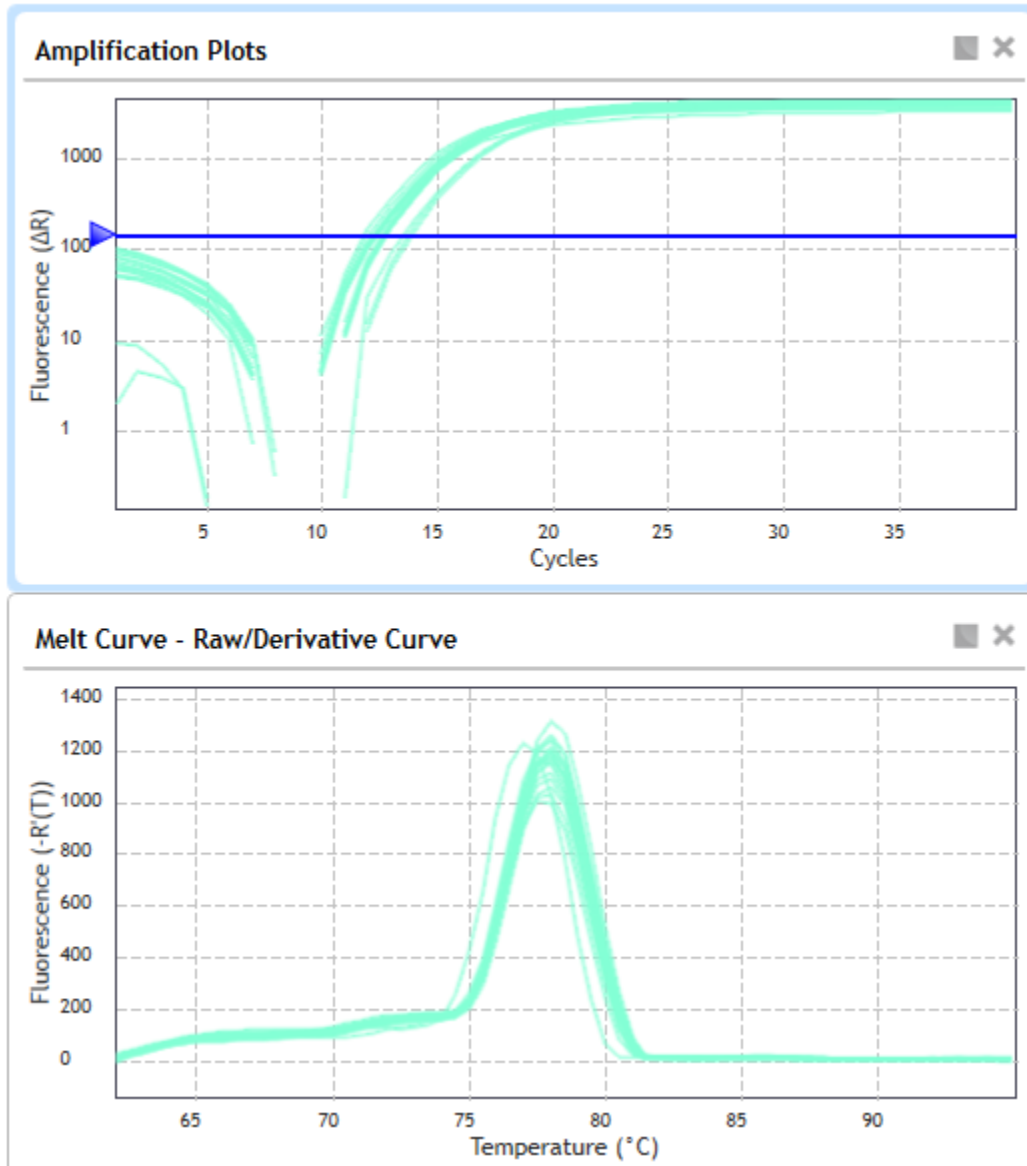
agrAsybrF      aactgcacatacacgcttaca
agrAsybrR      ggcaatgagtcgtgagattt

sarAsybrF      acatggcaattacaaaatcaatgat
sarAsybrR      tctttctctttggtttcgctgat
  
```

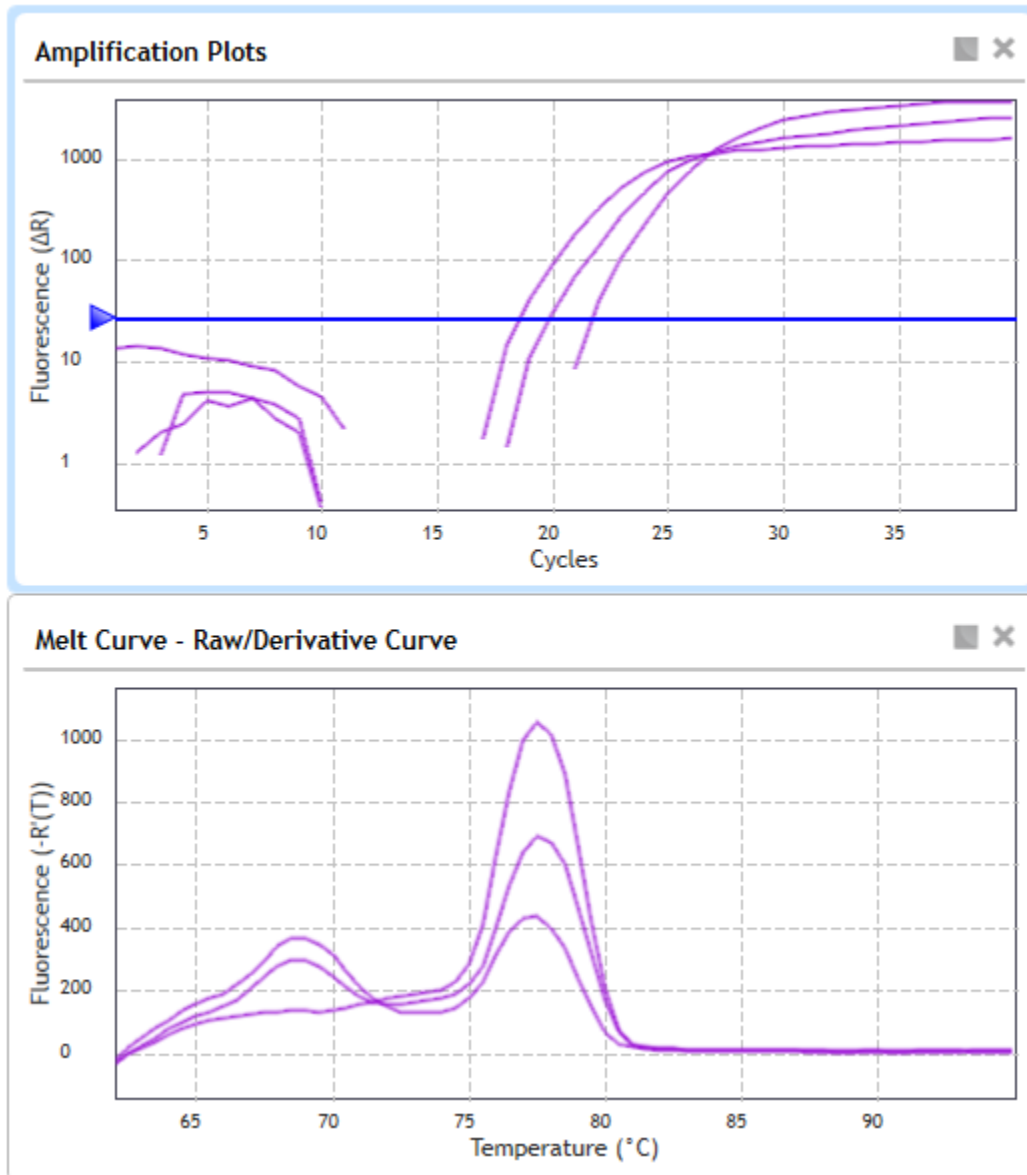
Vedlegg 18: (Figur 5). Primere brukt til qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown 10,91	Unknown 12,17	Unknown No Cq	Unknown 10,42	Unknown 11,06	Unknown 12,07	Unknown No Cq	Unknown 11,27	Unknown 10,80	Unknown 13,52	Unknown No Cq	Unknown 11,16
B	Unknown 10,76	Unknown 11,70	Unknown 21,15	Unknown 9,87	Unknown 10,92	Unknown 11,86	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown 11,39	Unknown 12,07	Unknown No Cq	Unknown 11,00
C	Unknown 11,11	Unknown 12,17	Unknown No Cq	Unknown 10,76	Unknown 11,67	Unknown 12,56	Unknown No Cq	Unknown 10,81	Unknown 12,17	Unknown 13,31	Unknown No Cq	Unknown 11,21
D	Unknown 12,53	Unknown 12,08	Unknown No Cq	Unknown 10,79	Unknown 11,02	Unknown 12,60	Unknown No Cq	Unknown 10,76	Unknown 11,97	Unknown 13,68	Unknown No Cq	Unknown 11,18
E	Unknown 11,84	Unknown 12,63	Unknown No Cq	Unknown 10,95	Unknown 11,78	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown 10,91	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown No Cq
F	Unknown 11,10	Unknown 12,02	Unknown No Cq	Unknown 10,70	Unknown 11,17	Unknown 12,58	Unknown No Cq	Unknown 10,76	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown No Cq
G	Unknown 11,15	Unknown 12,59	Unknown 21,75	Unknown 10,78	Unknown 11,24	Unknown 12,45	Unknown 23,13	Unknown 10,77	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
H	Unknown 11,21	Unknown 12,51	Unknown No Cq	Unknown 10,65	Unknown 11,63	Unknown 12,17	Unknown No Cq	Unknown No Cq	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown

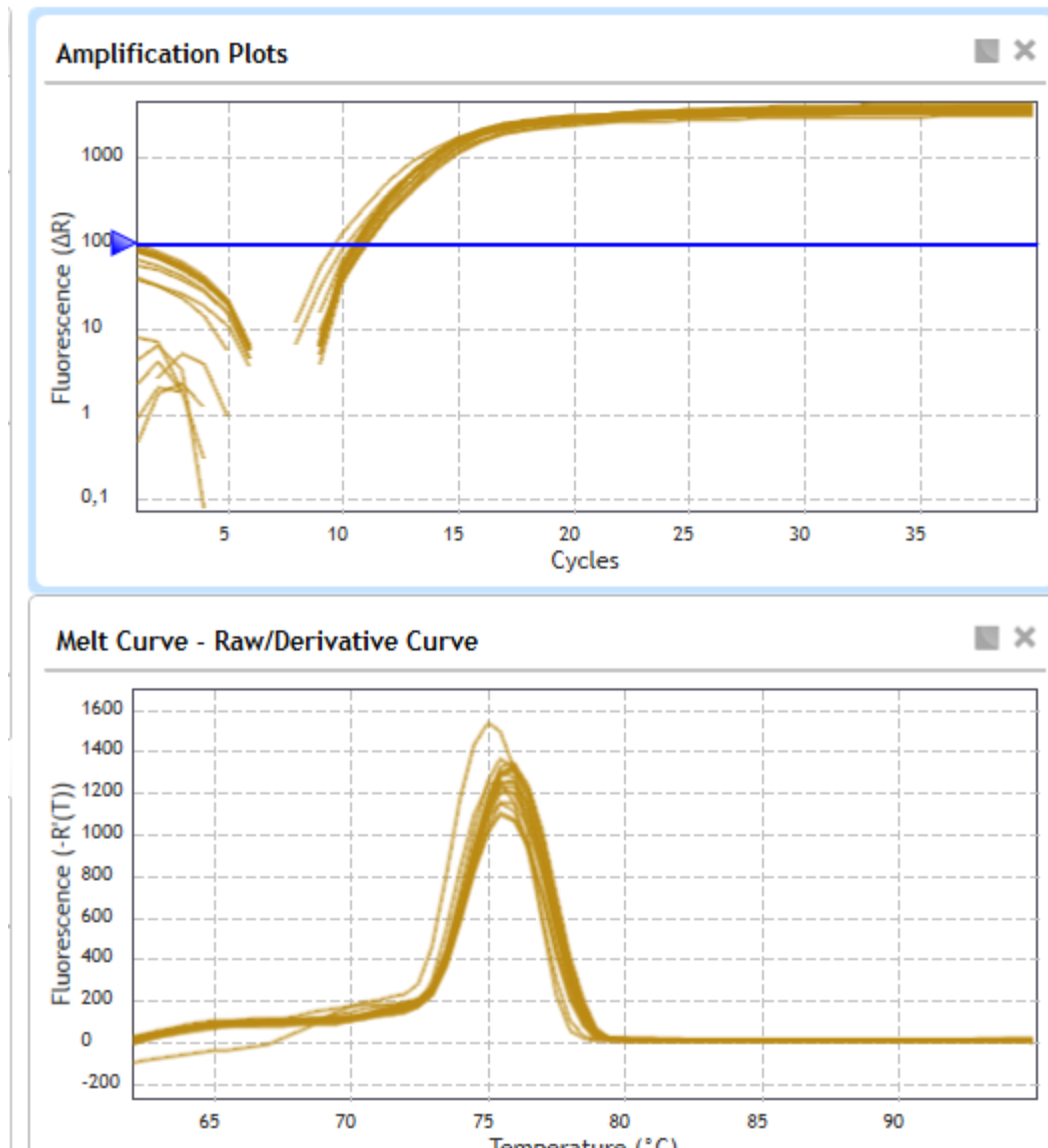
Vedlegg 19: (Figur 6). Kolonne 1, 5, 9 inneholder primeren gyrB. 2, 6, 10 inneholder gmk. 3, 7, 11 inneholder sigB. 4, 8, 12 inneholder sarA. Falske positive resultat ekskludert.



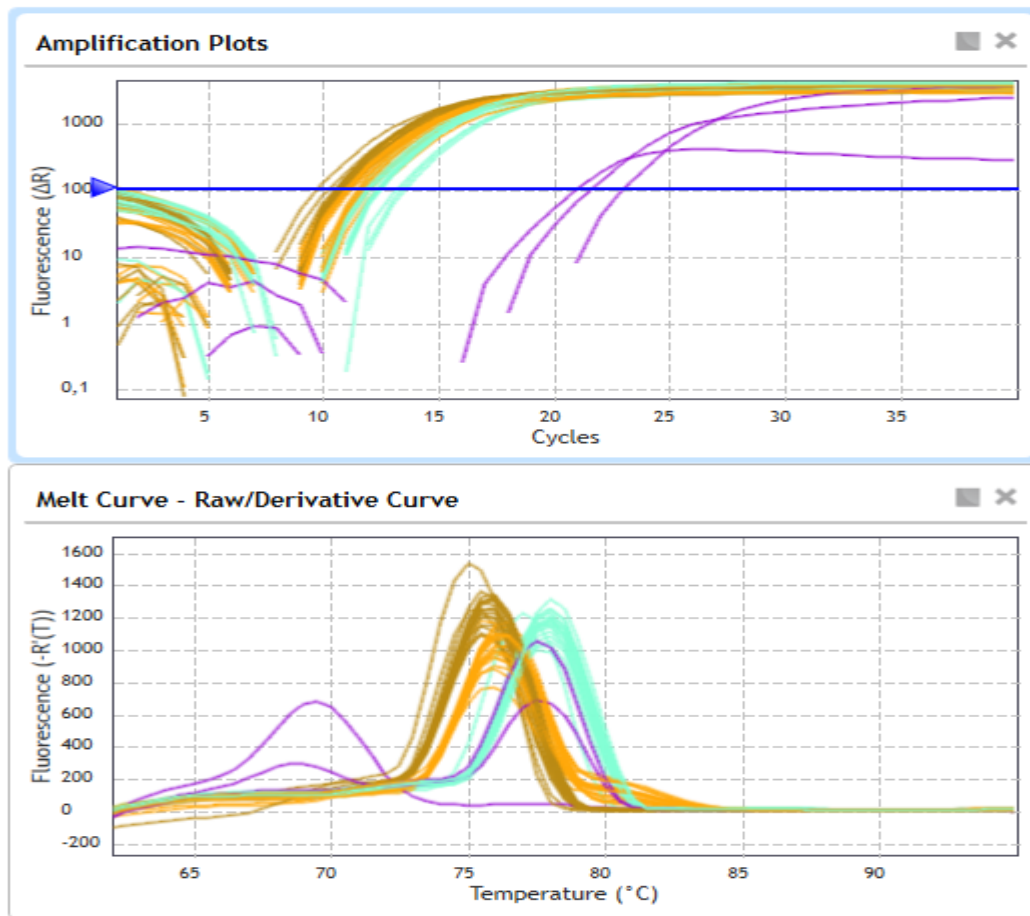
Vedlegg 20: (Figur 7). Gmk. Amplifikasjons- og smeltekurve. Terskelverdi 147(ΔR).



Vedlegg 21: (Figur 8). SigB. Amplifikasjons- og smeltekurve. Terskelverdi 29(ΔR).



Vedlegg 22: (Figur 9). SarA. Amplifikasjons- og smeltekurve. Terskelverdi 91(ΔR).



Vedlegg 22: (Figur 10). Amplifikasjons- og smeltekurve for gmk, gyrB, sigB og sarA.