

Marte Myhr Amundsen
Maren-Helene Hafslund Edvardsen

Metodeutvikling og validering av real-time PCR for deteksjon av bac gen hos *Streptococcus agalactiae*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Camilla Olaisen, Torunn Gresdal Rønning & Marthe Lind
Kroknes
Mai 2022

Marte Myhr Amundsen
Maren-Helene Hafslund Edvardsen

Metodeutvikling og validering av real-time PCR for deteksjon av bac gen hos *Streptococcus agalactiae*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Camilla Olaisen, Torunn Gresdal Rønning & Marthe Lind
Kroknes
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Dette bachelorprosjektet ble gitt av Nasjonalt referanselaboratorium for GBS ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs Hospital. Prosjektet er den avsluttende oppgaven av bioingeniørutdanningen ved Institutt for bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven ble gjennomført i perioden 14.mars til 20.mai 2022.

Vi ønsker spesielt å takke de faglige veilederne våre ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi, spesialbioingeniør Camilla Olaisen og spesialbioingeniør Torunn Gresdal Rønning, for god veiledning av laboratoriearbeidet og oppfølging av det teoretiske gjennom hele prosessen. Vi setter pris på alle tilbakemeldinger vi har fått underveis. Til slutt ønsker vi å takke prosessveileder Marthe Lind Kroknes ved Institutt for bioingeniørfag, for god veiledning og innspill gjennom hele skriveprosessen, og svar på spørsmål som har dukket opp underveis.

Trondheim, 20.mai 2022

Marte Myhr Amundsen

Marte Myhr Amundsen

Maren-Helene Hafslund Edvardsen

Maren-Helene Hafslund Edvardsen

Sammendrag

Streptococcus agalactiae omtales ofte som gruppe B streptokokker (GBS) og er en av de vanligste årsakene til infeksjonssykdom hos nyfødte. Ved Nasjonalt referanselaboratorium for GBS ved St.Olavs Hospital overvåkes serotyper og subtyper av GBS. Dette er for å kunne avdekke eventuelle utbrudd og for å vite hvilke serotyper og subtyper som finnes i befolkningen til enhver tid. Formålet med bacheloroppgaven var å etablere en real-time PCR-metode for deteksjon av *bac*-genet hos GBS. I dag anvendes konvensjonell PCR for deteksjon av *bac*-genet, noe som er tidkrevende for bioingeniørene som jobber ved referanselaboratoriet.

Utvikling av real-time PCR for deteksjon av *bac*-genet tar utgangspunkt i allerede eksisterende protokoller for oppsett av real-time PCR ved seksjon for medisin og FoU ved AMM. Det ble valgt ut stammer som ble ekstrahert ved to ulike metoder; manuell kokelysering og automatisk ekstraksjon på EZ1 Advanced XL. For å validere PCR-metoden ble det utført en temperaturgradientanalyse, undersøkt effektivitet, sensitivitet og spesifisitet. I tillegg ble det utført sekvensering og undersøkelse av sekvenseringsprodukt i programmet «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST). Det ble også satt opp konvensjonell PCR for å sammenligne med real-time PCR-metoden.

I denne oppgaven har det blitt validert en ny metode for påvisning av *bac*-genet hos GBS ved hjelp av real-time PCR. Metoden har vist seg å være robust med god effektivitet, sensitivitet og spesifisitet. Real-time PCR-metoden kan tas i bruk ved referanselaboratoriet i framtiden og vil kunne avhjelpe bioingeniørene som jobber der.

Abstract

Streptococcus agalactiae is often referred to as Group B Streptococci (GBS) and is one of the most common causes of infectious disease in newborns. At the National Reference Laboratory for GBS at St. Olavs Hospital, serotypes and subtypes of GBS are monitored. This is to be able to identify any outbreaks and to know which serotypes and subtypes that are present in the population at any given time. The purpose of the bachelor thesis was to establish a real-time PCR-method for detection of the *bac*-gene in GBS. Today, conventional PCR is used for the detection of the *bac*-gene, which is time-consuming for the biomedical laboratory scientists working at the Reference Laboratory.

Development of the real-time PCR for detection of the *bac*-gene is based on already existing protocols for setting up real-time PCR at det section of medicine, research and development. Strains were selected and extracted by two different methods; manual heat lysis and automatic extraction on EZ1 Advanced XL. To validate the PCR-method, a temperature gradient analysis was performed, and efficiency, sensitivity and specificity were examined. In addition, sequencing and examination of the sequencing product in the program "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) were performed. Conventional PCR was also set up to compare with the real-time PCR-method.

In this thesis, a new method for the detection of the *bac*-gen in GBS has been validated using real-time PCR. The method has appeared to be robust with good efficiency, sensitivity and specificity. The real-time PCR-method can be used at the Reference Laboratory in the future and will be able to assist the biomedical laboratory scientists who work there.

Begreper

Adhesiner: overflatestrukturer som bakterier bruker til å feste seg til celler, cellevev eller biofilm (samfunn av bakterier som er festet til en overflate og til hverandre)

Amnionitt: fostervannsbetennelse

Anafylaksi: sterk allergisk reaksjon som rammer flere organ

Artritt: leddbetennelse

Autolytiske enzymer: selvoppløsende enzymer, som bryter ned cellers bestanddeler.

Bløtvev: alt vev i kroppen som ikke inneholder ben, brusk og tenner

Celleveggbiogenese: syntese av cellevegg

Endometritt: betennelse i livmorslimhinnen

Intrauterin: inne i livmoren

Osteomyelitt: beinbetennelse

Postpartum sårinfeksjon: sårinfeksjon etter fødsel

Quencher: molekyl som absorberer lys, quench betyr å slukke

Templat: enkeltrådet DNA som anvendes som mal for å syntetisere en ny komplementær DNA-tråd

Forkortelser

AMM: Avdeling for medisinsk mikrobiologi

Ct-verdi: Cycle Threshold-verdi

ddNTPs: dideoksyribonukleosidtrifosfatene: Nukleotidene deoksyadenin trifosfat, deoksytymin trifosfat, deoksyguanin trifosfat og deoksycytosin trifosfat. Disse mangler OH-gruppe på 3'-enden og er merket med en fluorofor

dNTPs: deoksyribonukleosidtrifosfatene: Nukleotidene deoksyadenin trifosfat, deoksytymin trifosfat, deoksyguanin trifosfat og deoksycytosin trifosfat

EZ1: Automatisk ekstraksjon på EZ1 Advanced XL

Kok: Manuell ekstraksjon ved kokelysering

MGW: Molecular Grade Water

PCR: Polymerasekjedereaksjon

Rpm: Revolutions per minute

UF: Ufortynnet

UNG: Uracil N-glykosylase

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Begreper	iv
Forkortelser	v
1. Innledning	1
1.1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	1
1.2 <i>Hvem får infeksjon med GBS?</i>	3
1.3 <i>Behandling</i>	4
1.4 <i>Referanselaboratorium for GBS ved St. Olavs Hospital</i>	4
1.5 <i>Ekstraksjon og PCR</i>	5
1.5.1 <i>Visualisering med gelelektroforese/kapillær gelelektroforese</i>	6
1.6 <i>Real-time PCR</i>	7
1.6.1 <i>Ct-verdi</i>	9
1.6.2 <i>Effektivitet og sensitivitet</i>	9
1.6.3 <i>Spesifisitet</i>	10
1.7 <i>Primerdesign</i>	10
1.8 <i>Sanger-sekvensering</i>	11
1.9 <i>Hensikt med oppgaven</i>	12
2. Materiale og metode	13
2.1 <i>Stammer</i>	13
2.2 <i>Ekstraksjon av DNA</i>	13
2.2.1 <i>Ekstraksjon ved manuell kokelysering</i>	13
2.2.2 <i>Automatisk ekstraksjon på instrumentet EZ1 Advanced XL</i>	14
2.3 <i>Konvensjonell PCR på Techne TC-512</i>	15
2.3.1 <i>Primere og probe</i>	15
2.3.2 <i>Tillaging av reaksjonsmix</i>	15
2.3.3 <i>Oppsett konvensjonell PCR</i>	16
2.3.4 <i>Visualisering av PCR-produkt med E-gel og DNA LabChip</i>	16
2.4 <i>Real-time PCR på QuantStudio5</i>	17
2.4.1 <i>TaqMan real-time PCR</i>	17
2.4.2 <i>Primere og probe</i>	17
2.4.3 <i>Tillaging av reaksjonsmix</i>	18
2.5 <i>Temperaturgradientanalyse på QuantStudio 5</i>	19
2.6 <i>Undersøkelse av effektivitet for real-time PCR-metoden</i>	20
2.7 <i>Undersøkelse av sensitivitet for real-time PCR-metoden</i>	20
2.8 <i>Undersøkelse av spesifisitet for real-time PCR-metoden</i>	21
2.9 <i>Sekvensering</i>	21

3. Resultater	23
3.1 Konvensjonell PCR.....	23
3.2 Temperaturgradientanalyse.....	23
3.3 Effektivitet.....	24
3.4 Sensitivitet.....	26
3.5 Spesifisitet.....	26
3.6 Sekvensering.....	27
4. Diskusjon	28
5. Konklusjon	32
6. Referanser	33
7. Vedlegg.....	37
7.1 <i>Primere, probe og komponent til reaksjonsmix real-time PCR.....</i>	<i>37</i>
Vedlegg 1 Bestilling av primere og probe fra TIB Molbiol	37
Vedlegg 2 Design av primere og probe.....	41
Vedlegg 3 Tillaging av stockløsning og bruksløsning til primere og probe	43
Vedlegg 4 Reagensvedlegg for PerfeCTa MultiPlex qPCR Supermix.....	44
7.2 <i>Resultater.....</i>	<i>46</i>
Vedlegg 5 E-gel fra konvensjonell PCR.....	46
Vedlegg 6 DNA LabChip fra konvensjonell PCR og andre effektivitetsforsøk	47
Vedlegg 7 Amplifikasjonsplott fra temperaturgradientanalysen.....	48
Vedlegg 8 DNA LabChip fra temperaturgradientanalysen.....	49
Vedlegg 9 Ct-verdier fra andre effektivitetsforsøk	51
Vedlegg 10 Standardkurver for beregning av effektivitet	52
Vedlegg 11 Amplifikasjonsplott fra andre effektivitetsforsøk	53
Vedlegg 12 Sensitivitet	55
Vedlegg 13 Spesifisitet.....	56
Vedlegg 14 Sekvensering	58

1. Innledning

1.1 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae omtales ofte som gruppe B streptokokker (GBS) (1). Det var mikrobiologen Rebecca Lancefield som først klassifiserte streptokokker i gruppe A-W ut ifra hvilket antigen de har i celleveggen (2, kap.11). De fleste stammene av GBS har beta-hemolyse, men 1-2% av stammene er non-hemolytiske (3, kap.4). Det er en gram positiv bakterie og den har dermed et tykkere lag av peptidoglycan i celleveggen enn gram negative bakterier. Peptidoglycan har betydning for strukturen til bakterien og det gjør celleveggen sterk og rigid (2, kap.2).

GBS er en invasiv bakterie og den har flere virulensfaktorer som bidrar til at bakterien kan unngå vertens immunforsvar og gi sykdom (2, kap.11). I tabell 1 vises oversikt over noen av GBS sine virulensfaktorer og deres antatte funksjon i patogenesen.

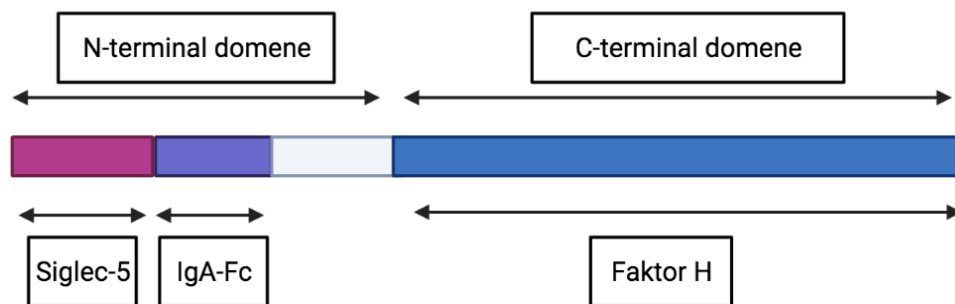
Tabell 1: Virulensfaktorer hos *Streptococcus agalactiae*.

Virulensfaktor	Funksjon
Sialinsyre på kapsel-polysakkarid	Beskytte mot opsonisering og fagocytose
Polysakkarid B	Celleveggbiogenese
Hemolysin	Poredannende og induserer celledød
Overflateproteiner og lipoteikoinsyre	Adhesiner
Hyaluronidase og protease	Vevsskade og celledød
<i>bac</i> -genet	Binde seg til Faktor H, Fc-delen av IgA og Singlec-5

Ytterst har nesten alle GBS et kapsel-polysakkarid med en terminal ende av sialinsyre. Dette er den viktigste virulensfaktoren, og den beskytter bakterien mot opsonisering og fagocytose av vertens immunforsvar (3, kap.4). I celleveggen har GBS et peptidoglycanforankret antigen B, som har vist seg å være viktig for celleveggbiogenese. En studie viste at når *gbcO*-genet hos GBS ble inaktivert, forhindret dette syntese av antigen B og ga en rekke abnormiteter som tilfeldige plasseringer av septa, abnorm cellemorfologi, og defekter i celledeling- og separasjonsprosesser (4). En annen virulensfaktor er toksinet hemolysin som kan danne porer i cellemembraner og indusere celledød i ulike celletyper.

Bakterien har også overflateproteiner og lipoteikoinsyre som fungerer som adhesiner for ulike celletyper. Hyaluronidase og proteaser er virulensfaktorer som kan bidra til vevsskade og celledød (2, kap.11).

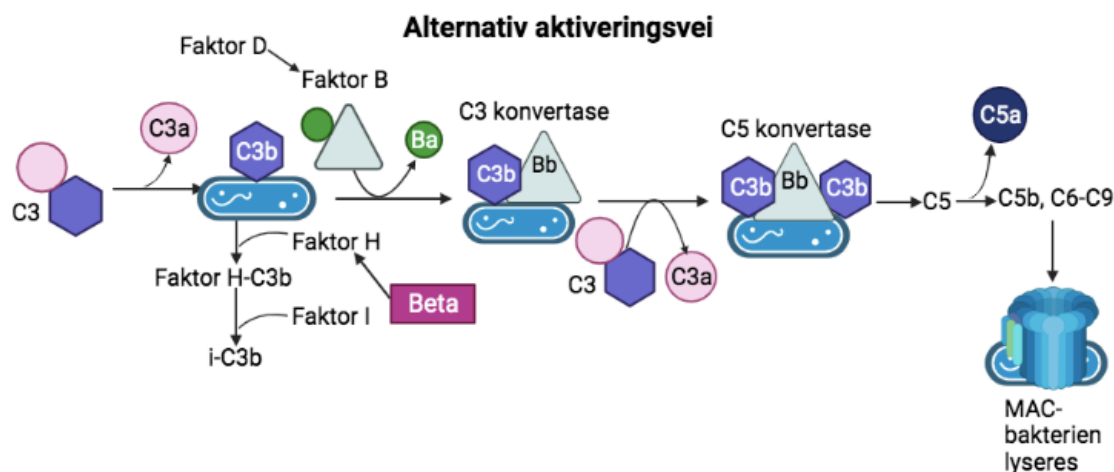
I tillegg finnes en rekke andre virulensfaktorer hvorav de fleste kommer utenfor omfanget av denne oppgaven. *bac*-genet er et av de overflateprotein-kodende genene som kan detekteres ved Nasjonalt referanselaboratorium for GBS og det koder for overflateproteinene Beta. En studie fra 10 land viste at 23% av 1101 GBS stammer hadde *bac*-genet (5). Beta er en del av C-antigenet som var det første overflateproteinantigenet som ble identifisert hos GBS. Dette består av Alfa-protein kodet av *bca*-genet og Beta-protein. Hos stammer med C-antigenet kan ett eller begge av disse proteinene være uttrykt (6).



Created in **BioRender.com**

Figur 1: *bac*-genet koder for overflateproteinene Beta med et N-terminal og C-terminal domene. Beta kan binde seg til Siglec-5 som er en human leukocyt-celleoverflatereseptor. I tillegg kan Beta binde seg til Fc-delen av humant IgA og komplementinhibitoren Faktor H (7). (Figur fra (7) tegnet på nytt med små endringer i BioRender.com)

Beta er bygd opp av N-terminal domene og C-terminal domene, som vist i figur 1. I N-terminal domene har Beta en region på 73 aminosyrer som kan binde seg til Fc-delen av humant IgA. Dette er med på å beskytte bakterien mot vertens immunforsvar. Beta kan også bindes til Siglec-5 som er en leukocyt-overflatereseptor. Dette bidrar til å hindre at bakteriecellen fagocytteres av vertens immunceller. I C-terminal domene har Beta en region som kan binde seg til komplementinhibitoren Faktor H (7).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Figur 2: Den alternative aktiveringsveien aktiveres ved at C3 spaltes til C3a og C3b. C3b binder seg til overflaten av bakterien. Faktor B vil spaltes til Ba og Bb ved hjelp av Faktor D. Bb bindes til C3b på bakterieoverflaten slik at komplekset C4bBb (C3 konvertase) dannes. Komplekset kan spalte C3 til C3a og C3b. C3b binder seg til komplekset og vil tiltrekke seg C5 som spaltes til C5a og C5b. C5b og C6-C9 vil danne membranangrepskomplekset (MAC) som kan lage hull i bakteriens membran slik at bakterien lyses (8, kap.4). Funksjonen til C3a og C5a er blant annet at de kan binde seg til immunceller som mastceller slik at disse blir aktivert, og kan skille ut signalstoffer som histamin og cytokiner (9). Overflateproteinet Beta kan binde seg til komplementinhibitoren Faktor H i den alternative aktiveringsveien. Faktor H kan binde C3b slik at komplekset Faktor H-C3b dannes. Faktor I kan spalte komplekset slik at i-C3i dannes (7). (Figur fra (7) tegnet på nytt i BioRender.com)

Komplementsystemet er en del av det medfødte immunforsvaret og er et kaskadesystem av plasmaproteiner som er viktig i bekjempelsen av patogener (8, kap.4). Det er tre aktiveringsveier av komplementsystemet og Faktor H er et viktig reguleringsprotein i den alternative aktiveringsveien, som vist i figur 2. Binding av Beta til Faktor H er en viktig virulensmekanisme hos GBS, da dette blokkerer fagocytose, ved at komplementfaktor C3b brytes ned slik at den alternative aktiveringsveien stanser. GBS kan da overleve i verten og gi sykdom (7) (10).

1.2 Hvem får infeksjon med GBS?

GBS er ofte forbundet med gravide og nyfødte. Det er en av de vanligste årsakene til infeksjonssykdom hos nyfødte (1). På verdensbasis er det 11-35% av gravide som er bærere av GBS (11). Gravide kan være bærere av GBS vaginalt og/eller rektalt, og kan få GBS-sykdom i forbindelse med svangerskap og fødsel i form av urinveisinfeksjon, endometritt, amnionitt og postpartum sårinfeksjon. Hvis den gravide har en oppadstigende intrauterin infeksjon, kan denne overføres til fosteret og gi intrauterin død eller sykdom hos den nyfødte. Den viktigste smitteveien til nyfødte er ved kontaktsmitte via fødselskanalen. Halvparten av barna som fødes av gravide bærere blir kolonisert, men det er kun 0,5-1% av

de koloniserte barna som får symptomer og blir alvorlig syke. Infeksjon hos nyfødte kan opptre som sepsis, pneumoni, osteomyelitt, meningitt eller en blanding av disse (1).

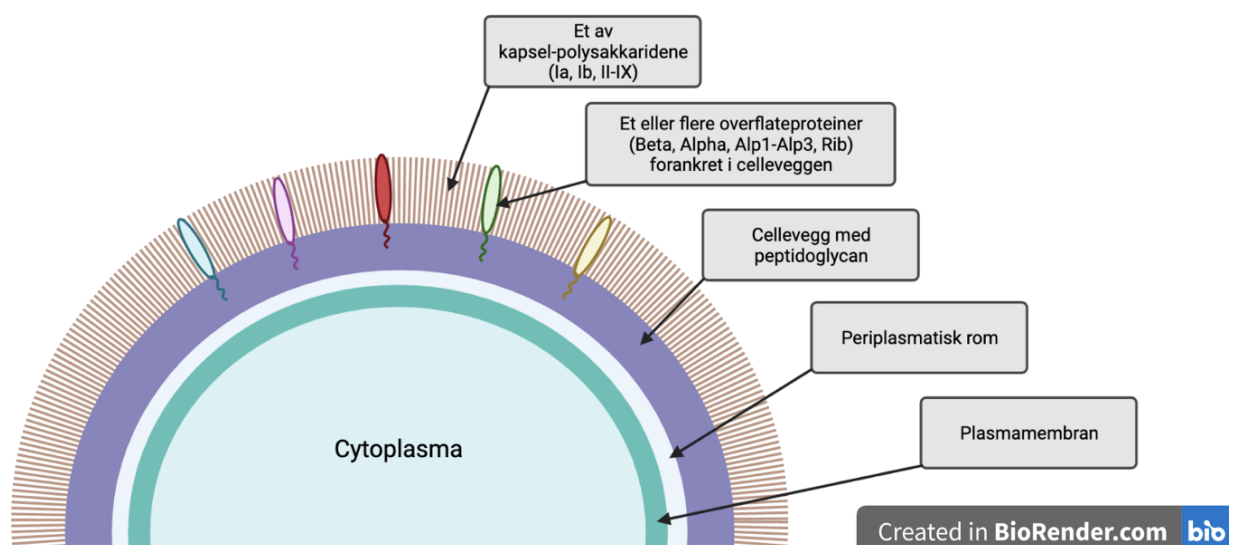
GBS-sykdom kan også oppstå hos voksne, men da er ofte infeksjonen opportunistisk, altså at verten ikke blir syk så lenge immunforsvaret fungerer optimalt. Dette rammer ofte eldre og pasienter med kroniske underliggende sykdommer. Sykdomsbildene kan da være bakteriemie, endokarditt, pneumoni, artritt, osteomyelitt og urinveis- og bløtvevsinfeksjoner (1).

1.3 Behandling

I dag behandles GBS-sykdom med antibiotika, og målet er redusere antall tilfeller av alvorlig GBS-sykdom. Samtidig er det viktig å unngå massiv antibiotikabruk da dette kan medføre utvikling av antibiotikaresistens og gi alvorlige allergiske reaksjoner (12). Gravide kan behandles med intravenøst antibiotikaproylakse under fødsel, som kan forhindre overføring av GBS til barnet. Dersom den gravide har feber eller tegn til intrauterin infeksjon gis bredspektret antibiotikabehandling, som også dekker behandling mot GBS (1).

1.4 Referanselaboratorium for GBS ved St. Olavs Hospital

I 2006 ble Nasjonalt referanselaboratorium for GBS etablert ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs Hospital. Referanselaboratoriet mottar og typer stammer fra pasienter med invasiv GBS sykdom fra alle mikrobiologiske laboratorier i Norge (16).



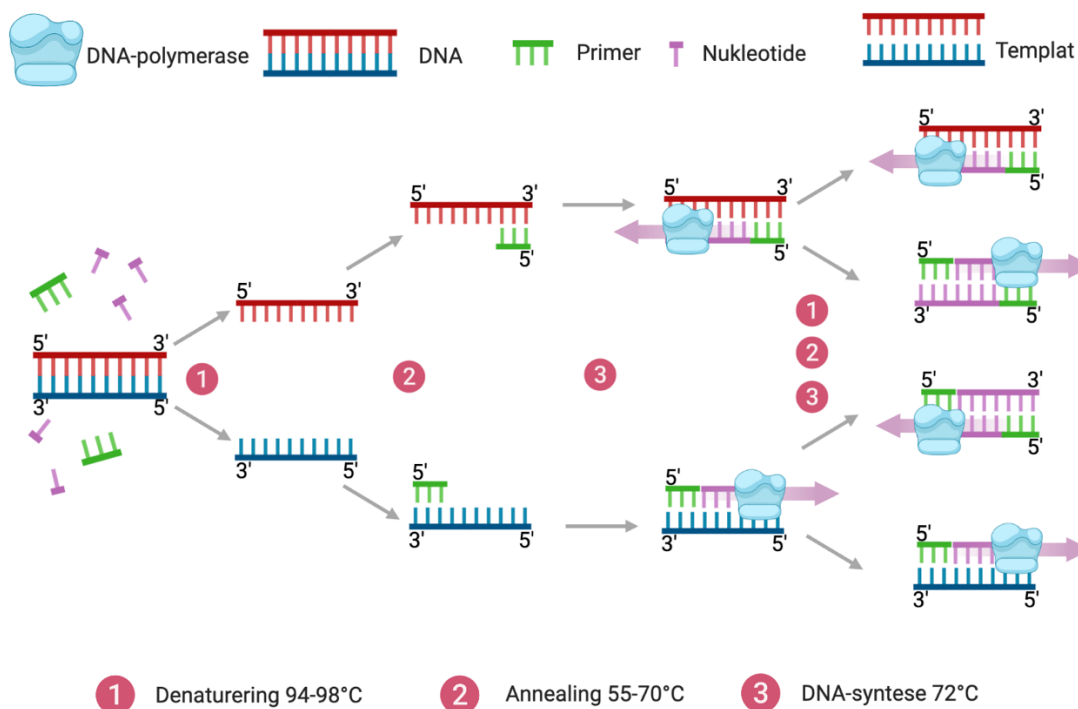
Figur 3: Oppbygging av GBS. Ytterst har bakterien et kapsel-polysakkarid. Innenfor har bakterien et eller flere overflateproteiner forankret celleveggen bestående av peptidoglycan. Innerst er plasmamembranen. Området mellom celleveggen og plasmamembranen kalles periplasmatisk rom (13) (14). Her befinner det seg utskilte proteiner som ikke har klart å trenge gjennom celleveggen (15). (Figur fra (13) (14) tegnet på nytt i BioRender.com)

Stammene serotypes med PCR ved å påvise gener som koder for de 10 kapsel-polysakkaridene (Ia, Ib, II-IX). I tillegg bestemmes subtype ved å påvise gener som koder for ulike overflateproteiner (Beta, Alpha, Alp1-Alp3, Rib). I figur 3 vises oppbygging av GBS med kapselpolysakkaridene og overflateproteinene (16). Hensikten med serotyping og subtyping er å avdekke eventuelle utbrudd, og overvåke hvilke serotyper og subtyper som finnes i befolkningen. Resistens overvåkes også ved referanselaboratoriet (17). Det er også viktig å overvåke stammene med tanke på utvikling av vaksine. Dersom det utvikles vaksine, kan denne være med på å erstatte og redusere bruken av antibiotika, og hindre alvorlig GBS-sykdom hos nyfødte (18).

1.5 Ekstraksjon og PCR

PCR står for polymerasekjedereaksjon og anvendes for å amplifisere DNA-sekvenser (19).

Før det kan anvendes PCR må DNA ekstraheres, slik at DNA blir tilgjengelig. Ved ekstraksjon dannes et isolat av DNA og det er ulike krav til renhet, konsentrasjon, bevaring og mangfold av nukleinsyrene i DNA. Det er viktig med kunnskap om bakterien for å avgjøre hvilke ekstraksjonsmetoder som er egnet for å ekstrahere DNA hos bakterien (20). En PCR-analyse har tre trinn som kan variere i temperatur og varighet (19).



Created in **BioRender.com** **bio**

Figur 4: Prinsippet for PCR. I trinn 1 skjer denaturering ved 94-98°C. Initiell denaturering er det første denatureringstrinnet og utføres ved begynnelsen av PCR. Det skjer en gang i løpet av en PCR-analyse og varigheten er ca. 1-3 minutter. Da blir

hele genomet til to templat-tråder ved at hydrogenbindingene mellom nukleotidene brytes. Etter det første denatureringstrinnet begynner påfølgende sykluser hvor PCR-produkt av ønsket DNA-sekvens denatureres på samme måte. Varigheten er da kortet ned til 0,5-2 minutter og dette trinnet gjentas for ved hver syklus. I trinn 2 senkes temperaturen til annealing-temperatur, som avhenger av smeltetemperaturen til primerne, men er mellom 55-70°C. Ved annealing-temperatur binder reverse- og forward-primer seg til komplementære nukleotider på hver sin templat-tråd. I trinn 3 skjer DNA-syntese ved at temperaturen øker til 68-72°C, som er optimumstemperaturen til DNA-polymerase. DNA-polymerase binder seg til 3'-OH-enden av primerne og syntetiserer nytt DNA i 5'-3'-retning. Trinn 1-3 utgjør én syklus, og gjentas x-antall ganger. For hver syklus vil det i teorien dannes dobbelt så mange DNA-dobbelthelixer som den forrige (21). (Ferdiglaget figur i BioRender.com med noen justeringer)

Til PCR trengs DNA, deoksyribonukleosidtrifosfater (dNTPs), primere, magnesium og DNA-polymerase (22). Primerne angir startpunktet for amplifiseringen og er designet for å binde seg til det området av DNA som er ønskelig å amplifisere (21). I reaksjonsmixer er ofte magnesium tilsatt i form av magnesiumklorid. Magnesium er viktig for at DNA-polymerase skal fungere optimalt og bidrar til at primerne bindes til komplementære nukleotider på DNA (23). Det brukes ofte Taq DNA-polymerase som er et varmestabilt enzym isolert fra bakterien *Thermus aquaticus* (24). Trinnene ved PCR er vist i figur 4, og slik PCR omtales ofte som konvensjonell PCR. Ved konvensjonell PCR er det etter DNA-syntese ofte en final DNA syntese, som anvendes for å sikre at alle PCR-produktene av ønsket DNA-sekvens blir ferdig syntetisert (21).

Enzymet Uracil N-glykosylase (UNG) er ofte tilsatt i reaksjonsmixer til PCR. UNG bryter ned produkter som har vært gjennom en PCR-analyse, og kan fjerne eventuell kontaminasjon fra laboratorieomgivelsene, krysskontaminasjon fra andre prøver eller carry-over kontaminasjon fra tidligere PCR-analyser. Det som er ønskelig å amplifisere vil ikke ødelegges av UNG, fordi enzymet kun fjerner enkeltrådet eller dobbeltrådet DNA som inneholder uracil (25).

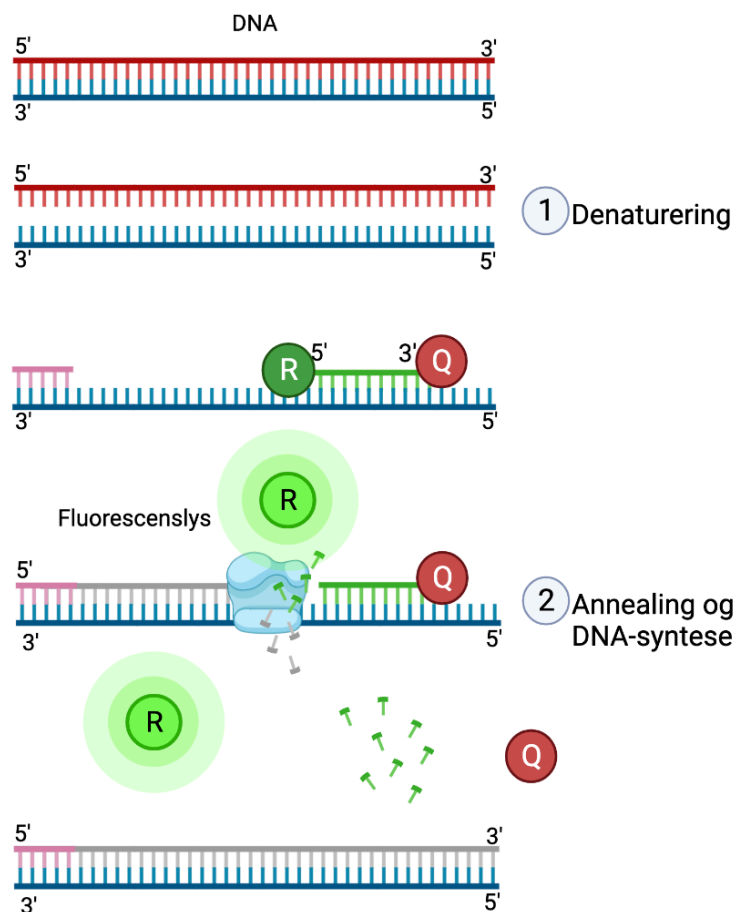
1.5.1 Visualisering med gelelektroforese/kapillær gelelektroforese

For å visualisere PCR-produkt etter konvensjonell PCR benyttes gelelektroforese eller kapillær gelelektroforese (26). Ved gelelektroforese benyttes en gel som er laget av agarose eller polyakrylamid mellom to tynne glassplater. Prøvene og ladder (størrelsesmarkør) avsettes i brønner i gelen, og gelen kan ha ulik porestørrelse og konsentrasjon (27). Ved kapillær gelelektroforese anvendes et kapillær med en gel, hvor prøven og ladder kan vandre gjennom. Gelene plasseres i et elektrisk felt. Prinsippet for metodene er at elektrisk ladde partikler vil vandre med ulik hastighet i det elektriske feltet ut ifra molekylvekt og ladning. Vandringsen skjer mellom en anode og katode. Partikler med positiv ladning vil

vandre mot anoden, mens partikler med negativ ladning vil vandre mot katoden. DNA er et negativt ladet molekyl og vil vandre mot katoden. DNA-sekvensene separeres ut ifra størrelse og tykkelse på porene i gelene. De minste DNA-sekvensene vil vandre raskest og lengst gjennom gelene. Ved begge metodene detekteres molekylvekten til PCR-produktet som bånd, og det angir størrelsen til DNA-sekvensen i basepar ved å sammenligne med en ladder. I tillegg kan det ved kapillær gelelektroforese visualiseres topper i et kromatogram som kan sammenlignes med kromatogram for ladder (28). Dersom det er for mye magnesium i reaksjonsmixen som benyttes ved PCR, kan dette føre til at primerne binder seg uspesifikt til DNA. Dette kan resultere i at det ved gelelektroforese eller kapillær gelelektroforese observeres uspesifikke bånd eller topper (23).

1.6 Real-time PCR

Real-time PCR anvendes for å detektere forekomst og mengde av en DNA-sekvens. Til real-time PCR trengs komponentene som beskrevet i 1.5, men i tillegg en komponent som kan synliggjøre DNA-sekvensen (22). Det kan benyttes en TaqMan-probe, som er en sekvens med en reporter på 5'-enden og quencher på 3'-enden. Reporter og quencher er kovalent bundet til hverandre. Quencher vil absorbere fluorescenslyset fra reporter så lenge TaqMan-probe er intakt (29).

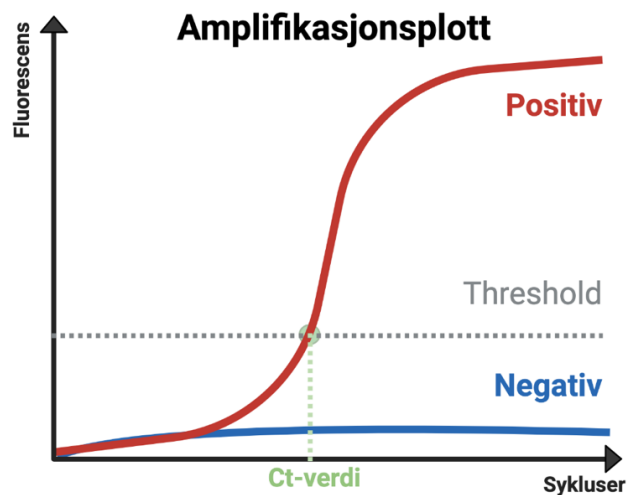


Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Figur 5: Real-time PCR med TaqMan-probe. Det skjer to trinn og det er her vist for en templat-tråd. I trinn 1 skjer denaturering av DNA. I trinn 2 senkes temperaturen til annealing-temperatur, og primerne og TaqMan-proben bindes til templat. Videre skjer DNA-syntese ved at Taq DNA-polymerase syntetiserer nytt DNA. I tillegg vil Taq DNA-polymerase når den kommer til der TaqMan-probe er bundet, kløyve nukleotidene mellom quencher og reporter. Quencher vil da ikke lenger absorbere fluorescenslyset fra reporter. Det vil da bli fluorescenssignal fra reporter som kan detekteres av et filter i et real-time PCR-instrument. Det er proporsjonalitet mellom fluorescenslyst og mengden DNA som er syntetisert. Til slutt vil Taq DNA-polymerase syntetisere ferdig ny DNA-tråd (29) (30). (Figur fra (29) tegnet på nytt i BioRender.com)

Ved 2-step real-time PCR skjer de samme tre trinnene som beskrevet i 1.5, men trinn 2 og 3 er sammenslått. Trinnene ved real-time PCR med TaqMan-probe er vist i figur 5. Taq DNA-polymerase kan kløyve TaqMan-proben fordi den har 5'-3' exonuclease-aktivitet. Dette er at Taq DNA-polymerase kan fjerne nukleotider i 5'-3'-retning for så å sette inn nye. I tillegg har Taq DNA-polymerase 3'-5' exonuclease-aktivitet som gjør at den kan gå tilbake i 3'-5'-retning og rette opp dersom den har satt inn feil nukleotider (31).

1.6.1 Ct-verdi



Created in BioRender.com bio

Figur 6: Ved real-time PCR detekteres Cycle Thresholds (Ct-verdier) i et amplifikasjonsplott. På x-aksen er antall sykluser og på y-aksen er fluorescens. En Ct-verdi er antall sykluser som er nødvendig for at fluorescenssignalet skal være sterkt nok til at amplifikasjonskurven krysser threshold. For at en prøve skal regnes som positiv forutsetter dette at amplifikasjonskurven krysser threshold og har en sigmoid form. Amplifikasjonskurver som er under threshold og som krysser threshold med unormal form regnes som negative. Ct-verdien er omvendt proporsjonal med mengden DNA-sekvens i prøven. Det betyr at jo lavere Ct-verdi desto høyere konsentrasjon er det av DNA-sekvensen i prøven (32). (Ferdiglaget figur i BioRender.com med noen justeringer)

Ved real-time PCR detekteres en Cycle Threshold verdi (Ct-verdi), og dette punktet er vist i figur 6. For at en prøve skal få en Ct-verdi forutsetter det at DNA-konsentrasjonen i prøven ikke er for høy i forhold til mengden magnesium i reaksjonsmix. DNA er et negativt ladet molekyl og magnesium er positivt. Dersom magnesium er bundet til for mye DNA i prøven vil ikke Taq DNA-polymerase og primerne kunne utøve sine funksjoner. PCR-reaksjonen vil dermed ikke finne sted og amplifikasjonskurven til prøven vil ikke krysse threshold og prøven blir negativ. Dersom prøven for eksempel fortynnes i 1:10 kan den bli positiv, da det kan være tilstrekkelig med magnesium til primere og Taq DNA-polymerase (23).

1.6.2 Effektivitet og sensitivitet

Effektivitet er et mål på PCR-metodens evne til amplifisering. For å vurdere effektivitet settes det opp PCR med 10-folds fortynningsrekke i paralleller. De gjennomsnittlige Ct-verdiene til hver fortynning i fortynningsrekkene anvendes for å lage en standardkurve. Med 10-folds fortynningsrekke er det ideelt med sju punkter i standardkurven. Det skal i teorien være en differanse i gjennomsnittlig Ct-verdi på rundt 3,3 mellom hver fortynning i fortynningsrekkene. Dette vil gi en effektivitet på 100%, som betyr at det dobles antall DNA-sekvenser for hver syklus. Det er ønskelig at effektiviteten skal være så nære 100% som mulig (33). Effektivitet skal ligge mellom 90-110%, men kan variere litt hos ulike laboratorier

(34, kap.9). Dersom differansen mellom fortynningene er mer enn 3,3 gir dette en lavere effektivitet, og er differansen mindre enn 3,3 gir dette en effektivitet over 100% (35). En effektivitet over 100% er teoretisk ikke mulig. Årsaker til effektivitet over 100% kan være inhibitorer, kontaminasjon, pipette presisjonsfeil, pipette kalibreringsfeil eller feil ved fortynning (33). Ut ifra standardkurven beregnes det en determinasjonskoeffisient (R^2) og denne sier noe om sammenhengene mellom dataene. Er R^2 0,99 eller høyere tyder dette på god presisjon (35).

Standardkurven benyttes til å finne deteksjonsgrensen til PCR-metoden, og deteksjonsgrensen sier noe om metodens sensitivitet. Det beregnes et kopitall ved bruk av en kopitall-kalkulator, hvor det settes inn kjent utgangskonsentrasjon (ufortynnet prøve) og bakteriens genomstørrelse. Kalkulatoren benytter formel 1 (36).

$$Kopitall = \frac{[DNA]ng/\mu L * 6,022 * 10^{23}}{Genomets lengde * 1 * 10^9 * 660} \quad (F1)$$

Kopitallet og den høyeste fortynningen (laveste konsentrasjon) som gir Ct-verdi brukes til utregning av deteksjonsgrensen til PCR-metoden.

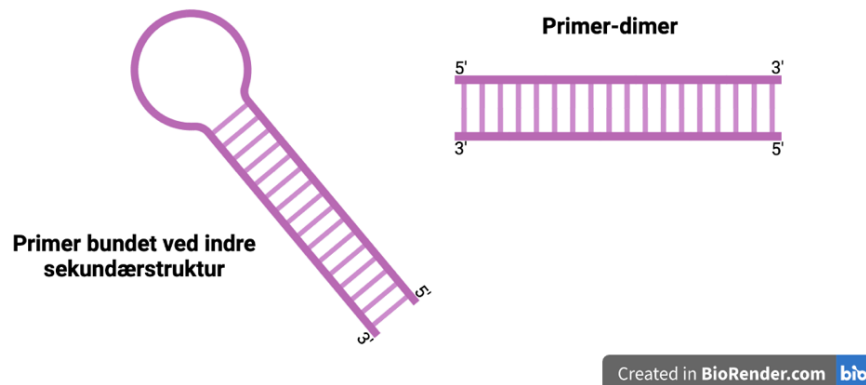
1.6.3 Spesifisitet

Spesifisitet til en real-time PCR-metode kan utføres ved å analysere et PCR-oppsett med x-antall kjente positive og negative prøver for DNA-sekvensen som skal detekteres. Høyere spesifisitet reduserer sjansen for prøver med falske positive resultater (37).

1.7 Primerdesign

Det er viktig å designe primere av god kvalitet slik at de kan binde seg spesifikt til unik DNA-sekvens. Ved primerdesign vil antall basepar mellom forward og revers primer, inkludert baseparene for disse, anslå den teoretiske båndstørrelsen for båndene ved kapillær gelelektroforese eller gelelektroforese. Primerne må være spesifikke og ikke amplifisere noe annet enn det som er målet for PCR-reaksjonen. Det finnes flere nettsider av for eksempel primerprodusenter, hvor det tilbys algoritmer med forslag til primerpar. Primerne fremstilles kjemisk ved at nukleotider settes sammen. Nukleotidene skal være komplementære med DNA-sekvensen som skal detekteres. 3'-enden av primer må være komplementær til templat slik at DNA-polymerase får angitt sitt startpunkt. Det er vanlig å ha guanin eller cytosin i 3'-enden, fordi det er en sterkere hydrogenbinding mellom disse

enn mellom adenin og tymin. Lengden på primerne er oftest mellom 18-30 nukleotider. Jo kortere primerne er jo mer effektivt vil de binde seg til ønsket DNA-sekvens (38).

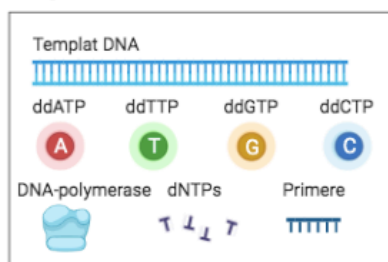


Figur 7: Primeren bør ikke ha en indre sekundærstruktur, da dette kan resultere i at primeren binder seg til seg selv, og DNA-polymerase kan ikke binde seg. Primer-dimer er uspesifikt produkt som dannes når primerne binder seg til hverandre. Begge tilfeller forhindrer DNA-syntese (38). (Figur fra (39) tegnet i BioRender.com)

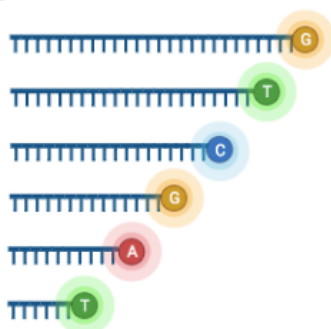
I figur 7 er det vist indre sekundærstruktur og primer-dimer som må tas hensyn til ved primerdesign (38).

1.8 Sanger-sekvensering

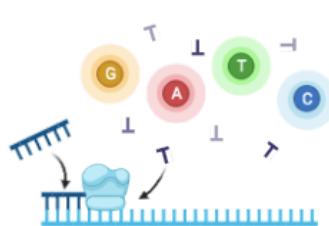
Reagenser



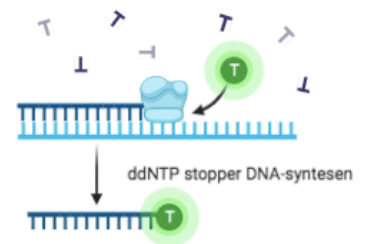
③ DNA prøve merket med fluorofor



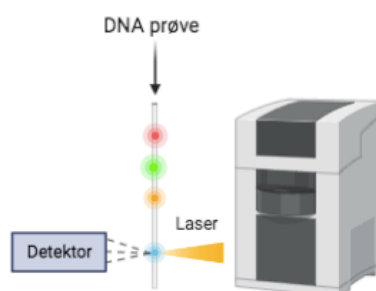
① Annealing og DNA-syntese



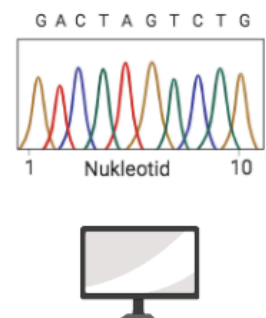
② ddNTP bindes og stopper DNA-syntesen



④ Kapillær gelelektroforese og deteksjon av fluorescens



⑤ Sekvensanalyse



Created in BioRender.com bio

Figur 8: Trinnene ved Sanger-sekvensering for en templat-tråd. Først blir DNA denaturert. I trinn 1 vil primerne binde seg og deretter vil DNA-polymerase syntetisere DNA ved å sette inn dNTP. Når en dideoksyribonukleosidtrifosfat (ddNTP) bindes til templat i trinn 2 vil DNA-syntesen stoppe opp. I trinn 3 er de fluorofor-merkede DNA-fragmentene som er dannet etter at DNA-syntesen har stoppet opp. I trinn 4 vil nukleotidrekkefølgen avleses på et instrument med kapillær gelelektroforese. DNA-fragmentene merket med fluorofor vandrer gjennom et elektrisk felt ut ifra molekylvekt. De vil bestråles av en laser som eksiterer fluoroforene og fluorescenslyset vil detekteres av et filter. I trinn 5 vises nukleotidsekvensen til DNA-sekvensen og hvert nukleotid får en topp i et sekvenskromatogram (40). (Ferdiglaget figur i bioRender.com med noen justeringer)

For å verifisere at det er detektert ønskelig DNA-sekvens ved PCR kan det utføres Sanger-sekvensering med PCR-produkt. Sanger-sekvensering går ut på å kunne lese av nukleotidrekkefølgen til en DNA-sekvens, og trinnene er vist i figur 8. Metoden er oppkalt og utviklet av biokjemikeren Frederick Sanger. Til sekvensering trengs primere, DNA-polymerase, templat, dNTPs og dideoksyribonukleosidtrifosfatene (ddNTPs): ddATP, ddTTP, ddGTP og ddCTP. Hver ddNTP er merket med en fluorofor og mangler en hydroksylgruppe på 3'-enden. Dersom en ddNTP binder seg vil DNA-syntesen stoppe opp, da mangel på hydroksylgruppe medfører at ingen flere dNTP kan binde seg. Fluoroforene til ddNTPs angir nukleotidene i DNA-sekvensen (40). Dersom det er for høy konsentrasjon av PCR-produkt i sekvenseringsreaksjonen kan dette medføre at magnesium blir brukt opp ved å binde seg til DNA, eller at dNTPs brukes opp for fort slik et det blir for korte sekvenseringsprodukter (41).

1.9 Hensikt med oppgaven

I dag anvendes tre konvensjonelle PCR-metoder for å påvise serotyper og subtyper av GBS. For å påvise *bac*-genet utføres det singel-PCR, mens for genene for serotypene og de andre subtypene utføres multiplex PCR (16). Konvensjonell PCR tar tid og krever ressurser, da det først må settes opp PCR, for så gelelektroforese eller kapillær gelelektroforese. Det er ønskelig at real-time PCR skal avhjelpe bioingeniørene ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi. Hensikten med bacheloroppgaven er å utvikle og validere en real-time PCR-metode for deteksjon av *bac*-genet hos GBS. Dersom real-time PCR for *bac*-genet kan anvendes, vil denne bidra i arbeidet med overgangen fra konvensjonell PCR til real-time PCR. Denne oppgaven skal besvare problemstillingen: *hvorfor bør det anvendes real-time PCR i stedet for konvensjonell PCR for deteksjon av bac-genet hos GBS?*

2. Materiale og metode

2.1 Stammer

Fra stammebanken til GBS referanselaboratorium ble det valgt ut renkulturer av tidligere typede stammer fra pasienter med invasiv GBS sykdom (kliniske stammer) og referansestammer. Disse ble tatt ut fra fryser, sådd ut på blodagar og inkubert i ett døgn ved $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ og 5% CO_2 (42). Det ble anvendt to referansestammer, en bestilt fra National Collection of Type Cultures (NCTC) og en bestilt fra Culture Collection University of Gothenburg (CCUG). NCTC 11078, også kjent som A909, ble anvendt som positiv kontroll og denne er positiv for *bac*-genet. Denne brukes som positiv kontroll i rutinen ved referanselaboratoriet. CCUG 29784 ble anvendt som negativ kontroll og denne er negativ for *bac*-genet. Molecular Grade Water (MGW)(G-Biosciences) ble også anvendt som negativ kontroll. Det ble også valgt ut 60 kliniske stammer, 30 positive og 30 negative for *bac*-genet. Hver av de 60 kliniske stammene ble tildelt et prøvenummer, og oversikt over disse er vist i vedlegg 13.

2.2 Ekstraksjon av DNA

Stammene ble ekstrahert ved manuell kokelysering og automatisk ekstraksjon på instrumentet EZ1 Advanced XL (Qiagen). I tabell 2 vises oversikt over ekstraksjonsmetoder for utvalgte stammer.

Tabell 2: Ekstraksjonsmetodene som ble utført på utvalgte stammer.

Stammer	Ekstraksjonsmetoder
Referansestammene NCTC 11078 og CCUG 29784	Manuell kokelysering og Automatisk ekstraksjon på instrumentet EZ1 Advanced XL
60 kliniske stammer	Manuell kokelysering

2.2.1 Ekstraksjon ved manuell kokelysering

Én koloni fra blodagar ble slemmet opp i buffermix bestående av 100 μL TrisEDTA-buffer (10mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Sigma, 1mM EDTA) og 100 μL Lysisbuffer fra Rikshospitalet (1% Triton-X100, 0,5% Tween 20, 10mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane-HCl pH 8,0, 1mM EDTA). Oppslemmingen ble inkubert ved 95°C ved 300rpm (revolutions per minute) i 15 minutter på Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf). Det ble det utført

en sentrifugering ved 14500rpm i to minutter for å samle cellerester i bunnen. 100µL av supernatanten ble pipetert over i nye 0,5mL mikrorør. Videre omtales denne ekstraksjonsmetoden for kokelysering og lysatet ble anvendt til PCR-oppsett (43). Prinsippet for metoden går ut på at lysisbufferen lyserer bakteriecellene ved høy temperatur (44). TrisEDTA-buffer holder pH stabil og fungerer som bevaringsmiddel slik at DNA ikke degraderes (45).

2.2.2 Automatisk ekstraksjon på instrumentet EZ1 Advanced XL

Det ble laget en tykk oppslemming av kolonier i buffermix ved å stryke en øse 3-5 ganger over den første sektoren på blodagar. Buffermix besto av 200µL TrisEDTA-buffer (10mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Sigma, 1mM EDTA), tilsatt 15µL Lysozyme (Sigma, 20mg/mL), 5µL Proteinase K (Qiagen, 20mg/mL) og 5µL Mutanolysin (Sigma, 10.000 U/mL). Videre ble det utført to inkuberinger på Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf). Første i 15 minutter ved 37°C ved 300rpm og andre i 15 minutter ved 65°C ved 300rpm. Prøvene ble romtemperert, tilsatt 4µL RNase A (Ribonuklease A) (Qiagen, 100mg/ml), før prøvene ble satt på instrumentet EZ1 Advanced XL. Kitet «Reagent Cartridges, Tissue 6» (Qiagen) ble benyttet på instrumentet. Videre omtales denne ekstraksjonsmetoden som EZ1 og eluatet ble benyttet til PCR-oppsett (43) (46).

TrisEDTA-buffer har samme funksjon som ved kokelysering (45). Lysozyme lyserer bakteriecellene ved å kløyve peptidoglycan og aktivere autolytiske enzymer i celleveggen (47). Proteinase K er et enzym som bryter ned proteiner (48). Mutanolysin lyserer også bakteriecellene på en varsom måte slik at DNA, som er et ustabil molekyl, ikke degraderes (49). RNase A bryter ned RNA dersom dette er til stede i prøven. Dette forhindrer at primerne binder seg uspesifikt til RNA under PCR (50).

Automatisk ekstraksjon på EZ1 Advanced XL baseres på Booms metode (51). Prinsippet går ut på at DNA bindes til magnetiske partikler dekket med silika. Deretter vil en magnet separere de magnetiske partiklene med DNA fra resten av prøvematerialet. Videre vil disse overføres til brønner med ulike vaskeløsninger slik at ubundet materiale fjernes. Til slutt blir DNA frigjort fra de magnetiske partiklene ved varmebehandling og DNA-et vil overføres til eluatrør (46).

2.3 Konvensjonell PCR på Techne TC-512

Det ble satt opp konvensjonell PCR på instrumentet Techne TC-512 (Bibby Scientific av ThermoFisher Scientific). Dette er PCR-metoden som anvendes for deteksjon av *bac*-genet i dag. PCR-programmet som ble anvendt er vist i tabell 3. Det ble benyttet «0,2mL Non-skirted 96-well PCR Plate» (Thermo Scientific av ThermoFisher Scientific).

Tabell 3: PCR-programmet som ble anvendt på Techne TC-512.

Initiell denaturering	Denaturering	Annealing	DNA-syntese	Final DNA-syntese	Hold
	36 sykluser				
96°C 3 minutter	95°C 1 minutt	58°C 45 sekunder	72°C 45 sekunder	72°C 10 minutter	10°C ∞

2.3.1 Primere og probe

Det ble anvendt primerne GBS 1360S og GBS 1937A og disse er designet av Johan A.

Mæland, Odd Gunnar Brakstad, Lars Bevanger og Augusta I. Kvam (52)(53).

Nukleotidsekvensene er vist i tabell 4. Ved bruk av disse primerne har PCR-produktet en teoretisk båndstørrelse på omtrent 652 basepar

Tabell 4: Nukleotidsekvensene til primere brukt ved konvensjonell PCR.

ID	Sekvens
GBS 1360S	5'-GTGAAATTGTATAAGGCTATGAGTGAGAGCTTGGAG-3'
GBS 1937A	5'-CCGTTTTAGAATCTTTCTGCTCTGGTGTTTTAGGAACTTG-3'

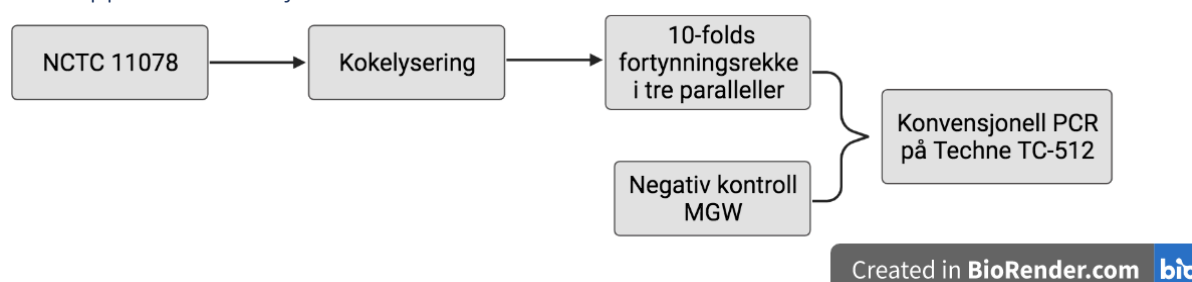
2.3.2 Tillaging av reaksjonsmix

«GeneAmp dNTP Mix with dTTP» (Applied Biosystems av ThermoFisher Scientific), MGW og kitet «AmpliAq Gold DNA Polymerase with Buffer II & MgCl₂» (Applied Biosystems av ThermoFisher Scientific) benyttes ved tillaging av reaksjonsmix. Reaksjonsmix var ferdiglaget uten AmpliAq Gold og tillagingen av reaksjonsmix for en prøve er ført opp i tabell 5. I hver brønn ble det tilsatt reaksjonsmix (24µL) og prøve (1µL). Til PCR-oppsett ble det tilsatt ufortynnete og fortynnete prøver. Det ble fortynnet med Elueringsbuffer (Qiagen, 10mM Tris-Cl pH 8,5), fordi det er et godt bevaringsmiddel for DNA.

Tabell 5: Tillaging av reaksjonsmix for en prøve ved konvensjonell PCR.

	µL per prøve
dNTP	1,25
Forward primer GBS 1360S	1,0
Revers primer GBS 1937A	1,0
10xPCR buffer	2,5
MgCl₂	1,5
MGW	16,5
AmpliTaq Gold	0,25
SUM	24

2.3.3 Oppsett konvensjonell PCR



Figur 9: Viser en oversikt over oppsett for konvensjonell PCR for stamme NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering. Det ble satt opp lysat i 10-folds fortynningsrekke i tre paralleller. MGW ble anvendt som negativ kontroll i PCR-oppsett. (Laget i BioRender.com)

Det ble satt opp konvensjonell PCR for stamme NCTC 11078. I figur 9 vises en oversikt over hva som ble satt opp i PCR-oppsettet.

2.3.4 Visualisering av PCR-produkt med E-gel og DNA LabChip

For å visualisere PCR-produkt fra konvensjonell PCR ble det anvendt metodene kapillær gelelektroforese og gelelektroforese. Prinsippet for metodene er beskrevet i 1.5.1. Det ble utført gelelektroforese ved å benytte 12 brønners E-geler med 2% Agarose (Invitrogen av ThermoFisher Scientific). E-gelene besto av etidiumbromid, som er et fluorescerende fargestoff som binder seg til DNA (54). PCR-produkt (5 µL) og MGW (15µL) ble overført til E-gel brønnene. Deretter ble E-gelene satt på Invitrogen E-gel iBase Power System (Invitrogen av ThermoFisher Scientific), før fotografering i instrumentet Gel Doc XR+ (BIORAD). I Gel Doc XR+ ble E-gelene belyst med UV-lys og båndene ble synliggjort (55).

Det ble utført kapillær gelelektroforese ved å anvende DNA LabChip (Agilent Technologies). Denne ble tilsatt PCR-produkt og reagensene gel-dye, markører og ladder fra «Agilent DNA 1000 Reagent kit» (Agilent Technologies). Markørene hadde 15 og 1500 basepar. Til slutt ble DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) med program tilpasset for 1000 basepar (56).

Gel-dye inneholder fargemolekyler som bindes til DNA-sekvensene i PCR-produktet. Når DNA-sekvensene vandrer gjennom gelen i kapillæret vil de passere en laser. Når fargemolekylene bestråles av laseren vil de sende ut et fluorescenssignal som detekteres av et filter. Tiden det tar for hver DNA-sekvens å passere laseren omgjøres til bånd i et «gel-bilde». Båndene sammenlignes med ladder for å angi antall basepar til DNA-sekvensene (57).

2.4 Real-time PCR på QuantStudio5

2.4.1 TaqMan real-time PCR

Det ble anvendt real-time PCR-instrumentet QuantStudio 5 (Applied Biosystems av ThermoFisher Scientific) for å etablere en TaqMan real-time PCR-metode for deteksjon av *bac*-genet. Metoden ble basert på allerede eksisterende protokoller for oppsett av real-time PCR ved seksjon for medisin og FoU (forskning og utvikling) ved AMM. Det ble benyttet «MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate» (Applied Biosystems av ThermoFisher Scientific). For synliggjøring av *bac*-genet ble det anvendt TaqMan-proben *bac*-probe, med reporteren 6FAM på 5'-enden og quencheren BBQ på 3'-enden (Vedlegg 1). Trinnene ved TaqMan real-time PCR er beskrevet i 1.6. I instrumentet bestråles prøvene av laserlys med bølgelengde $470\pm 15\text{nm}$ (58). Når *bac*-probe kløyves av Taq DNA-polymerase vil dette medføre økt fluorescenssignal som filtreres gjennom et filter og detekteres av QuantStudio 5. Bølgelengden på fluorescenssignalet er $520\pm 15\text{nm}$ (58).

2.4.2 Primere og probe

Det ble det anvendt forward-primer (*bac*-stud-F), reverse-primer (*bac*-stud-R) og *bac*-probe designet av Torunn Gresdal Rønning i «Primer Quest Tool» på nettsiden til «Integrated DNA Technologies» (IDT) (59). Nukleotidsekvensene til primerne og probe er vist i tabell 6. (Vedlegg 1 og 2) Primerne og probe var bestilt fra «TIB Molbiol». Det ble først tillaget en $100\mu\text{M}$ stockløsning av primere og probe. Ut ifra disse ble det laget $12\mu\text{M}$ bruksløsning av

hver primer og 8µM bruksløsning av probe. Dette er også konsentrasjoner som brukes ved andre real-time PCR-metoder ved seksjon medisin og FoU ved AMM. Tillaging er vist i vedlegg 3. Videre ble bruksløsningene tilsatt i reaksjonsmix, som ble anvendt ved real-time PCR. Ved bruk av disse primerne og denne proben har PCR-produktet en teoretisk båndstørrelse på omtrent 112 basepar.

Tabell 6: Nukleotidsekvensene til primere og probe som ble brukt ved real-time PCR.

ID	Sekvens
bac-stud-F	5'-TCCACCGAAGCAGACTAAAC-3'
bac-stud-R	5'-TCCAGTAGCCAGTGCTTTATG-3'
bac-probe	5'-6FAM-ACCCAAGGCAGTCAAGTAGAGATTGC-BBQ-3'

2.4.3 Tillaging av reaksjonsmix

Reaksjonsmix til PCR-oppsettene ble laget ved å blande Perfecta custom multiplex qPCR SuperMix (Quantabio) med bac-stud-F, bac-stud-R, bac-probe og MGW. Reagensvedlegg for Perfecta custom multiplex qPCR Supermix er vist i vedlegg 4. Tillaging av reaksjonsmix for en prøve er ført opp i tabell 7. I hver brønn i PCR-oppsettet ble det tilsatt reaksjonsmix (18µL) og prøve (2µL). Det ble tilsatt ufortynnede og fortynnede prøver. Til fortynningene ble det brukt Elueringsbuffer (Qiagen, 10mM Tris-Cl pH 8,5), fordi det er et godt bevaringsmiddel for DNA.

Tabell 7: Tillaging av reaksjonsmix for en prøve TaqMan real-time PCR.

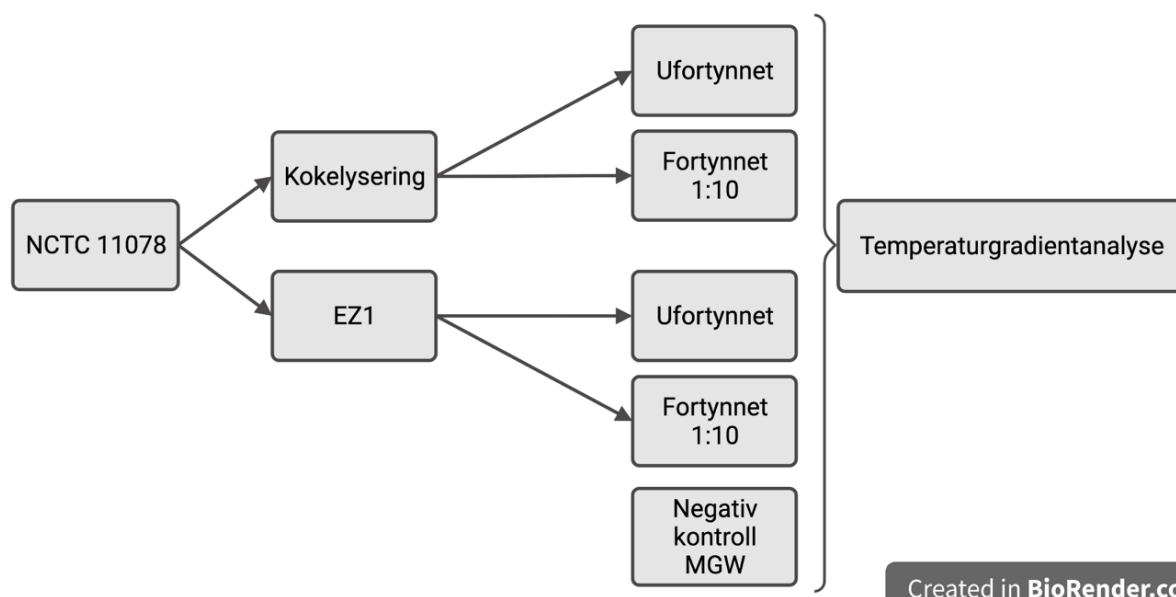
	µL per prøve
Perfecta custom multiplex qPCR SuperMix	10
bac-stud-F	0,5
bac-stud-R	0,5
bac-probe	0,5
MGW	6,5
SUM	18

2.5 Temperaturgradientanalyse på QuantStudio 5

Det ble utført en temperaturgradientanalyse med seks ulike annealing-temperaturer på QuantStudio 5 med PCR-programmet vist i tabell 8.

Tabell 8: PCR-programmet som ble anvendt på QuantStudio 5.

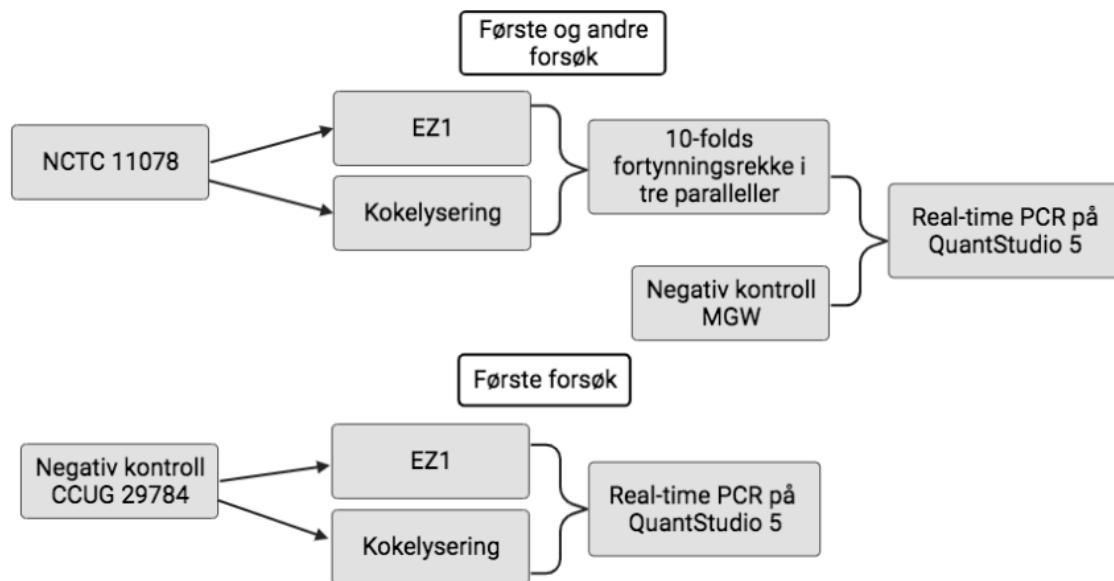
UNG-steg	Initiell denaturering og aktivering av Taq DNA-polymerase	Denaturering	Annealing og DNA-syntese
			35 sykluser
45°C 5 minutter	95°C 3 minutter	95°C 10 sekunder	54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C 30 sekunder



Figur 10: Oversikt over PCR-oppsett til temperaturgradientanalyse. Det ble satt opp PCR-oppsett for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering og EZ1, både ufortynnet og fortynnet 1:10. MGW ble benyttet som negativ kontroll. (Laget i BioRender.com)

I figur 10 vises en oversikt over hva som ble satt opp ved temperaturgradientanalysen. Hver prøve og negativ kontroll ble satt opp ved alle valgte annealing-temperaturer i PCR-programmet. PCR-produktene fra temperaturgradientanalysen ble overført til DNA LabChip og analysert på 2100 Bioanalyser, som beskrevet i 2.3.4.

2.6 Undersøkelse av effektivitet for real-time PCR-metoden



Created in **BioRender.com** bio

Figur 11: Viser en oversikt over PCR-oppsett ved undersøkelse av effektivitet på QuantStudio 5. Det ble anvendt NCTC 11078 og CCUG 29784 ekstrahert ved kokelysering og EZ1. MGW ble tatt med som negativ kontroll ved begge forsøk. CCUG 29784 ble kun tatt med som negativ kontroll i første forsøk. (Laget i BioRender.com)

Det ble undersøkt effektivitet til real-time PCR-metoden ved bruk av begge ekstraksjonsmetodene. Det ble satt opp samme PCR-oppsett to ganger, og i figur 11 vises en oversikt over hva som ble satt opp. Forskjellen fra første til andre forsøk var at det ble byttet pipettespiss og vortexet mellom hver 10-folds fortynning. Det ble også tint nytt lysat og eluat av NCTC 11078. Til forsøkene ble det anvendt samme PCR-program som beskrevet i 2.5, men med en annealing-temperatur på 60°C. PCR-produkt fra andre effektivitetsforsøk ble overført til DNA LabChip og analysert på 2100 Bioanalyzer, som beskrevet i 2.3.4.

2.7 Undersøkelse av sensitivitet for real-time PCR-metoden

Det ble undersøkt sensitivitet for real-time PCR-metoden ved bruk av begge ekstraksjonsmetodene. På instrumentet Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen av ThermoFisher Scientific) ble det målt DNA-konsentrasjon for lysat og eluat av NCTC 11078 fra effektivitetsundersøkelsen. Det ble laget bruksløsning til to standarder, interkontroll og prøvene ved å blande Qubit ds HS Reagent (Invitrogen av ThermoFisher Scientific) og Qubit ds HS buffer (Invitrogen av ThermoFisher Scientific). Det ble benyttet standardene Qubit dsDNA HS Standard #1 (Invitrogen av ThermoFisher Scientific) og Qubit dsDNA HS Standard #2 (Invitrogen av ThermoFisher Scientific). I tillegg ble det analysert en internkontroll som ble laget ut ifra bruksløsning og Standard #2 (60).

Prinsippet på Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen av ThermoFisher Scientific) baserer seg på at fluorescerende fargemolekyler bindes til isolert dobbelttrådet DNA. Når fargemolekylene kommer i kontakt med isolert DNA sendes det ut fluorescenslys. Fluorescens plottes inn på standardkurven og konsentrasjonen av DNA i prøven avleses. Det er direkte proporsjonalitet mellom fluorescenslys og konsentrasjonen av DNA (61).

2.8 Undersøkelse av spesifisitet for real-time PCR-metoden

Det ble undersøkt for spesifisitet ved å analysere 60 kliniske stammer på QuantStudio 5.

Disse ble ekstrahert ved kokelysning. NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysning ble anvendt som positiv kontroll, og MGW ble anvendt som negativ kontroll. Til dette PCR-oppsettet ble det brukt samme PCR-program som beskrevet i 2.5, men med annealing-temperatur på 60°C.

2.9 Sekvensering

Det ble utført to sekvenseringer av Torunn Gresdal Rønning. Fremgangsmåten for sekvensering er beskrevet i St. Olavs Hospital EQS-prosedyre «Spatyping» (62). Til sekvensering ble det valgt ut åtte stammer fra spesifisitetsundersøkelsen som var positive for *bac*-genet og hadde ulike kapselpolysakkarid. De utvalgte stammene er vist i tabell 9. Prinsippet for sekvensering er Sanger-sekvensering og dette er beskrevet i 1.8.

Tabell 9: Utvalgte åtte stammer positive for *bac*-gen fra spesifisitetsundersøkelsen.

Prøvenummer	Kapsel-polysakkarid
10	IX
8	IX
67	Ib
62	Ib
59	V
44	V
50	II
13	II

Ved første sekvensering ble det anvendt PCR-produkt fra spesifisitetsundersøkelsen. Til andre sekvensering ble det anvendt PCR-produkt fra et real-time PCR-oppsett med reaksjonsmix uten *bac*-probe. Dette PCR-oppsettet ble satt opp for de samme åtte stammene, i tillegg til NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysning. Ved andre sekvensering ble stamme 50 erstattet med NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysning. Nukleotidsekvensen til

sekvenseringsproduktet ble undersøkt i programmet «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST). PCR-produktene fra PCR-oppsettet med reaksjonsmix uten bac-probe ble også overført til en DNA LabChip og analysert på 2100 Bioanalyser, som beskrevet i 2.3.4 (56).

3. Resultater

3.1 Konvensjonell PCR

Det ble satt opp konvensjonell PCR med metoden som anvendes i dag for deteksjon av *bac*-genet. I vedlegg 5 vises resultat fra E-gel for de tre parallellene av NCTC 11078 som ble ekstrahert ved kokelysering. Resultatet viser at hver parallell fikk to bånd. I vedlegg 6 vises resultat fra DNA LabChip på 2100 Bioanalyser for de samme tre parallellene. Resultatet viser at hver parallell fikk tre bånd med forventet båndstørrelse. Negativ kontroll (MGW) ble negativ. I tillegg vises fire bånd med forventet båndstørrelse, for PCR-produkt fra det andre effektivitetsforsøket. I tabell 10 vises båndintensitet og antall basepar for båndene fra DNA LabChip på 2100 Bioanalyser og E-gel.

Tabell 10: Båndintensitet og antall basepar for båndene fra DNA LabChip og E-gel for PCR-produkt fra konvensjonell PCR og andre effektivitetsforsøk.

	PCR-produkt konvensjonell PCR	PCR-produkt andre effektivitetsforsøk
E-gel	Bånd 1: Sterk intensitet Bånd 2: Svakere intensitet	-
DNA LabChip på 2100 Bioanalyser	Bånd 1: Sterk intensitet Bånd 2 og 3: Svakere intensitet	Bånd 1 og 2: Sterk intensitet Bånd 3 og 4: Litt svakere intensitet
Antall basepar sammenlignet med ladder	E-gel: - DNA LabChip: Ca. 652	Ca. 112

3.2 Temperaturgradientanalyse

Det ble utført en temperaturgradientanalyse for å finne egnet annealing-temperatur for real-time PCR-metoden. Egnet annealing-temperatur ble 60°C. I tabell 11 vises Ct-verdier ved de ulike annealing-temperaturene. Ekstraksjon ved EZ1 ga lavere Ct-verdier enn ekstraksjon ved kokelysering. I vedlegg 7 vises amplifikasjonsplott for prøvene. Ved alle annealing-temperaturene fikk hver prøve en amplifikasjonskurve som krysset threshold, og dermed en Ct-verdi. Negativ kontroll (MGW) ble negativ ved hver annealing-temperatur.

Tabell 11: Ct-verdier fra temperaturgradientanalysen.

Annealing-temperatur	Ct-verdi			
	NCTC 11078	NCTC 11078	NCTC 11078	NCTC 11078
	Ekstrahert ved	Ekstrahert ved	Ekstrahert ved	Ekstrahert ved
	EZ1	EZ1	kokelysering	kokelysering
	Ufortynnet	Fortynnet 1:10	Ufortynnet	Fortynnet 1:10
54°C	11,389	14,542	19,110	22,005
56°C	11,274	14,942	18,982	22,184
58°C	11,656	14,951	19,333	22,306
60°C	11,418	15,228	19,368	22,307
62°C	11,660	15,065	18,974	22,545
64°C	11,802	15,096	19,363	22,535

For å undersøke om primerne hadde bundet seg uspesifikt og gitt uspesifikke bånd ved temperaturgradientanalysen ble PCR-produkt overført til DNA LabChip og analysert på 2100 Bioanalyser. Båndene fikk forventet båndstørrelse da båndene ble på omtrent 112 basepar sammenlignet med ladder. Det ble ingen uspesifikke bånd, kun et bånd for hvert PCR-produkt. I vedlegg 8 vises resultat fra DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyser. For noen prøver klarte ikke Bioanalyser 2100 å detektere øvre markør (1500 basepar), og dette måtte justeres manuelt i dataprogrammet på instrumentet. I vedlegg 8 vises en tynnere lilla strek som øvre markør for prøvene som ble justert.

3.3 Effektivitet

For å undersøke effektivitet for real-time PCR-metoden ble det utført to forsøk med ekstraksjonsmetodene kokelysering og EZ1. Effektivitet for ekstraksjon ved EZ1 ble 96% og 92% for ekstraksjon ved kokelysering. Det ble ikke tatt med resultat fra første effektivitetsforsøk da beregningene ga effektivitet utenfor grensene 90-110%. I vedlegg 9 er det ført opp Ct-verdiene for hver fortykning i parallellene for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1 og kokelysering. Middelerverdiene av Ct-verdiene for hver fortykning i de tre parallellene er ført opp i tabell 12 og 13. Disse og standardavviket ble brukt for å beregne %CV med formel 2.

$$\%CV = \frac{\text{Standardavvik}}{\text{Middelerverdi}} * 100\% \quad (F2)$$

Tabell 12: Middelerverdi av Ct-verdier for hver fortynning i de tre parallellene og beregnet %CV av NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1.

Fortynning	Middelerverdi av Ct-verdier	%CV
UF	11,968	2,3
1:10	15,228	0,5
1:10 ²	18,827	0,1
1:10 ³	22,256	0,4
1:10 ⁴	25,751	0,2
1:10 ⁵	29,096	0,1
1:10 ⁶	32,451	0,6

Tabell 13: Middelerverdi av Ct-verdiene for hver fortynning i de tre parallellene og beregnet %CV av NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering.

Fortynning	Middelerverdi av Ct-verdier	%CV
UF	20,079	1,2
1:10	23,150	0,4
1:10 ²	26,503	1,3
1:10 ³	30,196	0,1
1:10 ⁴	34,201	0,9

Middelerverdiene til Ct-verdiene ble anvendt for å lage to standardkurver, en for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering og en for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1. Standardkurvene er vist i vedlegg 10. Stigningstallet ble -3,433 ved EZ1 og -3,529 ved kokelysering.

Stigningstallene ble benyttet i formel 3 for å beregne effektivitet til real-time PCR-metoden for hver ekstraksjonsmetode.

$$E = (10^{-1/\text{stigningstall}} - 1) * 100\% \quad (\text{F3})$$

Det ble beregnet R² ut ifra standardkurvene. R² for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1 ble 0,9999 og for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering ble R² 0,9972. I vedlegg 11 vises amplifikasjonsplott for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1 og for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering. De negative kontrollene (CCUG 29784 ekstrahert ved kokelysering og EZ1) ble

negative ved første effektivitetsforsøk. Disse to kontrollene ble dermed ikke tatt med i andre effektivitetsforsøk. Negativ kontroll (MGW) ble negativ ved begge effektivitetsforsøkene.

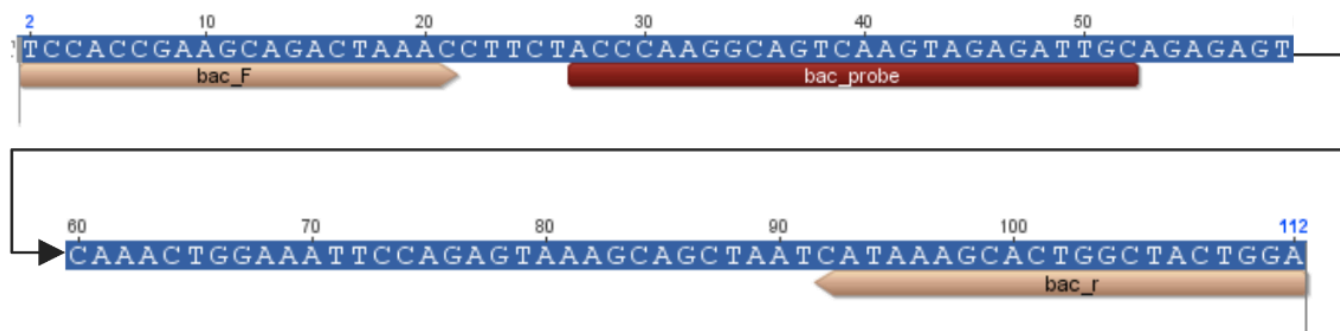
3.4 Sensitivitet

For å undersøke sensitivitet og bestemme deteksjonsgrense for hver av ekstraksjonsmetodene ble det målt DNA-konsentrasjon. DNA-konsentrasjonen for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering ble 0,564ng/μL, og 117ng/μL for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1. Deteksjonsgrensen for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering ble 49,48 kopier, og 102,6 kopier for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1. Ved måling av DNA-konsentrasjon fikk internkontroll en verdi på 9,71ng/μL og var innenfor grenseverdiene 9-11ng/μL satt av referanselaboratoriet. DNA-konsentrasjon og deteksjonsgrense for ekstraksjonsmetodene er ført opp i vedlegg 12. For å beregne deteksjonsgrensen for hver ekstraksjonsmetode ble det anvendt en kopitall-kalkulator for real-time PCR (36). Det ble lagt inn målt DNA-konsentrasjon for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering og EZ1, og 2,08Mb som er genomstørrelsen for GBS (39).

3.5 Spesifisitet

Det ble undersøkt spesifisitet for 30 *bac*-gen negative og 30 *bac*-gen positive stammer. De 30 *bac*-gen positive stammene fikk Ct-verdier, mens de 30 *bac*-gen negative stammene fikk ikke Ct-verdier. Ct-verdiene til de 30 *bac*-gen positive stammene er ført opp i tabell 20 i vedlegg 13. Stammene var tidligere typet ved konvensjonell PCR ved referanselaboratoriet, og de fikk samme resultat på real-time PCR. Positiv kontroll (NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering) ble positiv og negativ kontroll (MGW) ble negativ.

3.6 Sekvensering



Figur 12: Nukleotidsekvens etter andre sekvensering. Det er lagt inn bac-stud-F, bac-probe og bac-stud-R i nukleotidsekvensen. Bac-stud-F og bac-probe er identisk med nukleotidsekvens i 5' til 3'-retning, mens bac-stud-R er revers komplementær til nukleotidsekvens.

Det ble utført to sekvenseringer med PCR-produkt fra åtte utvalgte stammer som var positive for *bac*-genet. Første sekvensering med PCR-produkt fra spesifisitetundersøkelsen ga uønskede resultater, da den ene primeren ga korte nukleotidsekvenser, mens den andre primeren ga lengre nukleotidsekvenser. Andre sekvensering ga en nukleotidsekvens på 111 basepar som vist i figur 12 laget i programmet «Geneious 9.0.2». Sju av åtte utvalgte stammer fikk denne nukleotidsekvensen, men for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering ble sekvenseringsproduktene for korte til å overlape.

```

Query 1 TCCACCGAAGCAGACTAAACCTTCTACCCAAGGCAGTCAAGTAGAGATTGCAGAGAGTCA 60
      |||
Sbjct 147706 TCCACCGAAGCAGACTAAACCTTCTACCCAAGGCAGTCAAGTAGAGATTGCAGAGAGTCA 147647

Query 61 AACTGGA AAA-TTCCAGAGTAAAGCAGCTAATCATAAAGCACTGGCTACTGGA 111
      |||
Sbjct 147646 AACTGGA AAAATTCCAGAGTAAAGCAGCTAATCATAAAGCACTGGCTACTGGA 147595
  
```

Figur 13: Viser utført BLAST av nukleotidsekvensen på nettsiden National Library of Medicine. Det ble valgt stamme 01173 til sammenlikning da denne var en av stammene med høyest samsvar i prosent. I posisjon 70 mangler det adenin.

Ved undersøkelse i BLAST ga nukleotidsekvensen 99,11% samsvar med GBS stamme 01173, bortsett fra at nukleotidsekvensen manglet adenin i posisjon 70. Resultatet er vist i figur 13. Til denne sekvenseringen ble det benyttet PCR-produkt fra real-time PCR-oppsettet med reaksjonsmix uten bac-probe. På QuantStudio 5 ble det ingen Ct-verdier, men resultatet fra DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyzer i vedlegg 14 viser at DNA ble kopiert opp.

4. Diskusjon

Hensikten med oppgaven var å etablere en real-time PCR-metode for deteksjon av *bac*-genet hos GBS. For å validere metoden ble det utført en temperaturgradientanalyse, undersøkt effektivitet, sensitivitet og spesifisitet. I tillegg ble det utført Sanger-sekvensering og undersøkelse av sekvenseringsprodukt i BLAST. Real-time PCR-metoden ble også sammenlignet med den gamle konvensjonelle PCR-metoden.

I etableringsprosessen ble det utført ekstraksjonsmetodene kokelysering og EZ1, da det er disse som anvendes i rutinen ved referanselaboratoriet. For NCTC 11078 positiv for *bac*-gen ble det utført ekstraksjon ved EZ1 og kokelysering, fordi det var ønskelig å se om ekstraksjonsmetodene hadde forskjell i effektivitet og sensitivitet. CCUG 29784 negativ for *bac*-gen ble også ekstrahert ved kokelysering og EZ1, og ble benyttet som kvalitetskontroll av real-time PCR-metoden. For de 60 kliniske stammene ble det kun utført kokelysering, fordi det er ønskelig å anvende denne ekstraksjonsmetoden dersom real-time PCR-metoden skal tas i bruk. Årsaken til dette er at kokelysering er rimeligere og tar kortere tid enn ekstraksjon ved EZ1.

De anvendte kontrollene CCUG 29784 ekstrahert ved kokelysering og EZ1, NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering og EZ1 og MGW ble analysert for å kvalitetssikre real-time PCR-metoden. Ved alle PCR-oppsett ble kontrollene godkjente og dermed kunne prøveresultatene vurderes som positive eller negative. I tillegg ble internkontrollen ved måling av DNA-konsentrasjon godkjent.

Ved temperaturgradientanalysen ble det valgt annealing-temperatur ved å analysere prøver som var uforynnet og fortynnet 1:10. En uforynnet prøve kan ha høy DNA-konsentrasjon. Hvis dette er tilfellet, kan magnesium i reaksjonsmix brukes opp ved å binde seg til DNA i prøven. Dette kan medføre at primere og Taq DNA-polymerase ikke kan utøve sine funksjoner. I tillegg kan det resultere i at amplifikasjonskurven ikke vil krysse threshold og det vil ikke avleses en Ct-verdi. For å sikre avlesing av Ct-verdier ble det derfor også analysert fortynnede prøver, da disse har lavere DNA-konsentrasjon enn uforynnede.

Ved temperaturgradientanalysen fikk ufortynnete og fortynnete prøver Ct-verdier for begge ekstraksjonsmetodene, og det er ikke nødvendig å fortynne GBS-prøvene før analysering. I tillegg var det lite avvik mellom Ct-verdiene ved de ulike annealing-temperaturene. På bakgrunn av dette var alle annealing-temperaturene egnet, og det ble valgt annealing-temperatur ut ifra praktiske årsaker. Ved andre real-time PCR-metoder ved seksjon for medisin og FoU ved AMM, anvendes ofte 60°C som annealing-temperatur. Det ble dermed valgt 60°C til denne metoden også.

Ved analysering av DNA LabChip fra temperaturgradientanalysen på 2100 Bioanalyzer, ble det ingen uspesifikke bånd. Dette tyder på at primerne og probe har bundet seg til sine komplementære nukleotider på templat, og er designet på en egnet måte for deteksjon av *bac*-genet. I tillegg viser det at primerne ikke binder seg uspesifikt til andre deler av GBS-genomet, og at de ikke danner primer-dimere og har indre sekundærstrukturer.

Ved effektivitetsundersøkelsen ble det utført to forsøk. Første forsøk ga ikke god effektivitet og det ble antatt at det skyldtes dårlig blanding ved tillaging av 10-folds fortynningsrekkene. Ved andre forsøk ble det derfor byttet pipettespiss og vortexet mellom hver fortynning ved oppsett av 10-folds fortynningsrekkene. Det resulterte i bedre effektivitet enn første forsøk. Begge ekstraksjonsmetodene ga god effektivitet, som kom innenfor oppgitte grenser. Dette betyr at metoden har god evne til å amplifisere *bac*-genet. I tillegg viser de lave %CV-verdiene god presisjon ved pipettering. Likevel ble det bedre effektivitet ved ekstraksjon med EZ1 enn kokelysering, og dette kan skyldes at EZ1 gir renere isolert DNA.

Det er ønskelig at en standardkurve har minst sju punkter for å trekke en pålitelig linje til graf som benyttes til utregning av effektivitet. Da må utgangskonsentrasjonen (ufortynnet prøve) være høy nok til at det detekteres Ct-verdier for seks fortynninger i tillegg til ufortynnet prøve. Det ble detektert flere Ct-verdier for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1 enn for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering, som vist i vedlegg 9. Standardkurven for EZ1 oppfylte krav for en optimal standardkurve, og årsaken til deteksjon av flere Ct-verdier kan skyldes at det ble målt en høyere DNA-konsentrasjon ved EZ1. For at det skulle blitt detektert flere Ct-verdier for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering burde den ufortynnete prøven hatt en høyere DNA-konsentrasjon. For å oppnå enda bedre effektivitet

kunne effektivitetsundersøkelsen blitt gjentatt flere ganger og med flere paralleller. R^2 beregnet fra standardkurvene i vedlegg 10 viser godt samsvar mellom dataene og god presisjon.

Real-time PCR-metoden har god sensitivitet for begge ekstraksjonsmetodene, da kopitallene som angir deteksjonsgrensene ble relativt lave. Dermed kan begge ekstraksjonsmetodene tas i bruk ved real-time PCR-metoden. Ut ifra deteksjonsgrensene ser det ut som at kokylisering har bedre deteksjonsgrense enn EZ1. Likevel kan ikke deteksjonsgrensene sammenlignes da lysat og eluat har ulik utgangskonsentrasjon. For å direkte kunne sammenligne deteksjonsgrensene burde ufortynnet lysat og eluat hatt samme utgangskonsentrasjon. Effektivitetsundersøkelsen kunne blitt satt opp med flere fortynningsrekker og andre fortynningsfaktorer som for eksempel 1:5 eller 1:2. Dette kunne gitt flere Ct-verdier å basere standardkurvene på, og en mer nøyaktig deteksjonsgrense.

Ved sammenligning av konvensjonell PCR og real-time PCR viste den konvensjonelle PCR-metoden dårligere sensitivitet. Årsaken til dette var at det ved konvensjonell PCR ble observert færre og svakere bånd for resultatene fra DNA LabChip på 2100 Bioanalyser og E-gel. Det ble derimot observert flere og tykkere bånd for resultatene fra DNA LabChip på 2100 Bioanalyser for prøvene fra andre effektivitetsforsøk. Årsaker til forskjell i sensitivitet kan være ulikt primerdesign og at det anvendes ulike polymeraser og reaksjonsmixer. I tillegg kan en årsak være at det tilsettes 10% lysat/eluat ved real-time PCR og 2% lysat/eluat ved konvensjonell PCR. Det er derfor forventet at båndene blir 2,5 ganger sterkere ved real-time PCR. For å sammenligne PCR-metodene burde det vært lik mengde eluat/lysat og reaksjonsmix. Dette ble ikke undersøkt, fordi det var ønskelig å sammenligne sensitivitet for den konvensjonelle PCR-metoden slik den utføres i dag ved referanselaboratoriet, med sensitivitet for den nye metoden.

Spesifisitetsundersøkelsen viser at real-time PCR-metoden har god spesifisitet, fordi det var overensstemmelse mellom real-time PCR-metoden og tidligere resultater fra konvensjonell PCR for *bac*-genet for de 60 kliniske stammene. Det ble ikke undersøkt for uspesifikke bånd for disse stammene. Likevel viser tidligere utprøvnings av real-time PCR-metoden på 2100 Bioanalyser at ingen uspesifikke bånd har blitt detektert. Ettersom den nye real-time PCR-

metoden er mer sensitiv enn den konvensjonelle metoden, kan det tenkes at stammebanken ved referanselaboratoriet kan inneholde stammer som er falsk negative for *bac*-genet. Dette var derimot ikke tilfellet for stammene som ble analysert ved spesifisitetsundersøkelsen.

For å verifisere at *bac*-genet hadde blitt detektert ved real-time PCR-metoden ble det gjennomført sekvensering av PCR-produkt. Første sekvensering ble ikke optimal, da den ene templat-tråden ga korte sekvenseringsprodukt. Dette skyldtes sannsynligvis at *bac*-proben forstyrret DNA-polymerasen under sekvensering. Det ble dermed satt opp et nytt real-time PCR-oppsett med reaksjonsmix uten *bac*-probe, og deretter sekvensering. Ved andre sekvensering ga begge templat-trådene ønskelig sekvenseringsprodukt. NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering fikk derimot korte sekvenseringsprodukter. Dette kan skyldes for høy konsentrasjon av PCR-produkt, som for eksempel kan føre til at dNTPs brukes opp for raskt, eller at magnesium brukes opp ved å binde seg til DNA. Ved å gjenta sekvensering for denne prøven ville det antakeligvis blitt lengre sekvenseringsprodukt som kunne overlappet. Ved undersøkelse i BLAST stemte nukleotidsekvensen i sekvenseringsproduktet med GBS genomet. Årsaken til bortfall av adenin kan være at filteret ikke har klart å skille fluorescenssignalet til adenin-nukleotidene fra hverandre.

Det er flere årsaker til at det lønner seg å ta i bruk real-time PCR-metoden. Fordelen med PCR-programmet til metoden er at det har samme temperaturprofil og tidsperioder som andre PCR-program som brukes i rutinen ved seksjon for medisin og FoU ved AMM. På denne måten kan GBS prøver settes opp med andre analyser, og arbeidet kan overtas mellom bioingeniører. Ved analysering på QuantStudio 5 kvalitetssikres resultatene på en bedre måte da de lagres og overføres direkte til et datasystem, hvor de kan kontrolleres i ettertid. På denne måten unngår bioingeniøren manuell håndtering av resultat og sjansen for feilregistrering. For real-time PCR skjer PCR-reaksjon og deteksjon i en og samme prosess, mens for konvensjonell PCR må det først settes opp PCR, for så E-gel eller DNA LabChip på 2100 Bioanalyzer. Flere manuelle steg gir større sjanse for å gjøre feil, som for eksempel feil-pipetteringer. Real-time PCR vil dermed ta kortere tid og det vil gjøre arbeidet mindre tidkrevende for bioingeniørene. I tillegg vil det gi sikrere resultat på grunn av mindre manuell håndtering.

5. Konklusjon

I denne bacheloroppgaven har det blitt etablert en real-time PCR-metode for deteksjon av *bac*-genet hos GBS. Denne metoden kan tas i bruk og vil kunne avhjelpe bioingeniørene ved referanselaboratoriet i framtiden. Metoden har god effektivitet, sensitivitet og spesifisitet. Sekvensering ga forventet sekvenseringsprodukt, og primere og probe har bundet seg til sine komplementære nukleotider. Metoden er kun testet ved bruk av renkultur av GBS dyrket på blodagar, og den er dermed ikke egnet til bruk ved analysering av direktemateriale uten å gjøre en ny validering først. Videre kan denne real-time PCR-metoden bidra i arbeidet med overgangen fra konvensjonell PCR til real-time PCR ved referanselaboratoriet.

6. Referanser

1. Folkehelseinstituttet. Streptokokker gruppe B, systemisk sykdom [Internett]. Folkehelseinstituttet. 2019 [sitert 21. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/streptokokker-gruppe-b-systemisk-sy/>
2. Rollag H, Müller F, Tønjum(red.) T. Medisinsk mikrobiologi. 4. utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2019.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Streptococcus agalactiae. I: Medical Microbiology. 9. utg. USA: ELSEVIER; 2021.
4. Caliot É, Dramsi S, Chapot-Chartier MP, Courtin P, Kulakauskas S, Péchoux C, mfl. Role of the Group B antigen of Streptococcus agalactiae: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis. PLoS Pathog. 2012;8(6):e1002756.
5. Kong F, Gidding HF, Berner R, Gilbert GL. Streptococcus agalactiae Cbeta protein gene (bac) sequence types, based on the repeated region of the cell-wall-spanning domain: relationship to virulence and a proposed standardized nomenclature. J Med Microbiol. juli 2006;55(Pt 7):829–37.
6. Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface Proteins of Streptococcus agalactiae and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. Clin Microbiol Rev. januar 2005;18(1):102–27.
7. Frontiers in immunology. Frontiers | Streptococcus agalactiae Non-Pilus, Cell Wall-Anchored Proteins: Involvement in Colonization and Pathogenesis and Potential as Vaccine Candidates | Immunology [Internett]. 2018 [sitert 24. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00602/full>
8. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3. utg. Bergen: Fagbokforlaget; 2017.
9. Vikse J. komplementsystemet. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2021 [sitert 1. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/komplementsystemet>
10. Maruvada R, Prasadarao NV, Rubens CE. Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B Streptococcus promotes complement degradation. FASEB J. november 2009;23(11):3967–77.
11. Russell NJ, Seale AC, O’Driscoll M, O’Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, mfl. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. Clin Infect Dis. 6. november 2017;65(suppl_2):S100–11.
12. Gruppe B-streptokokker hos gravide og fødende kvinner – Nasjonal faglig retningslinje.pdf [Internett]. [sitert 30. mars 2022]. Tilgjengelig på: https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/gruppe-b-streptokokker-hos-gravide-og-fodende-kvinner/Gruppe%20B-streptokokker%20hos%20gravide%20og%20f%C3%B8dende%20kvinner%20%E2%80%93%20Nasjonal%20faglig%20retningslinje.pdf/_attachment/inline/3583a5d6-1936-451e-879f-2e5d6ff24bb0:34fe5aad119fa0a460c5e659349841d8f4bc1c96/Gruppe%20B-streptokokker%20hos%20gravide%20og%20f%C3%B8dende%20kvinner%20%E2%80%93%20Nasjonal%20faglig%20retningslinje.pdf
13. Bacteria cell wall gram positive and gram negative vector image on VectorStock [Internett]. VectorStock. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/bacteria-cell-wall-gram-positive-and-gram-negative-vector-23107941>

14. Fischetti VA. Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Spectr.* juli 2019;7(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0012–2018.
15. Periplasmic Space - en oversikt | ScienceDirect-emner [Internett]. [sitert 11. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/periplasmic-space>
16. Nasjonalt referanselaboratorium GBS [Internett]. St. Olavs hospital. 2021 [sitert 24. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/nasjonalt-referanselaboratorium-gbs>
17. AMM Årsrapport GBS 2020.pdf [Internett]. [sitert 28. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://stolav.no/Laboratoriemedisin/Avdeling%20for%20medisinsk%20mikrobiologi/%C3%85rsrapport%20GBS/AMM%20%C3%85rsrapport%20GBS%202020.pdf>
18. Carreras-Abad C, Ramkhelawon L, Heath PT, Le Doare K. A Vaccine Against Group B Streptococcus: Recent Advances. *Infect Drug Resist.* 29. april 2020;13:1263–72.
19. Fossum S, Dissen E. PCR – polymerasekjedereaksjon. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2021 [sitert 4. april 2022]. Tilgjengelig på: http://sml.snl.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon
20. Noone JC, Tunsjø VBOHS. DNA-ekstraksjon: Mengde er ikke synonymt med mangfold [Internett]. *Bioingeniøren.* [sitert 14. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.bioingenioren.no/fag/fag-originalartikkel/dna-ekstraksjon-mengde-er-ikke-synonymt-med-mangfold/>
21. ThermoFisher Scientific. PCR Cycling Parameters—Six Key Considerations for Success - NO [Internett]. [sitert 30. mars 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>
22. Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Oslo. PCR - Institutt for biovitenskap [Internett]. [sitert 17. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>
23. What is the Role of MgCl₂ in PCR? [Internett]. Excedr. 2022 [sitert 19. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.excedr.com/resources/what-is-the-role-of-mgcl2-in-pcr/>
24. Børresen-Dale AL. Taq-polymerase. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 23. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/Taq-polymerase>
25. What is UNG/UDG? - NO [Internett]. [sitert 22. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-ung-udg.html>
26. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* mars 2013;133(3):e6.
27. Institutt for biovitenskap ved Universitetet i Oslo. Gelelektroforese - Institutt for biovitenskap [Internett]. [sitert 13. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gelelektrofor.html>
28. Carl A.Burtis, David E.Bruns. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 7. utg. St.Louis, Missouri USA: Elsevier;
29. How TaqMan Assays Work - NO [Internett]. [sitert 1. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>
30. Why TaqMan Assay Design is Important - NO [Internett]. [sitert 22. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/why-taqman-assay-design-is-important.html>

- time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/why-taqman-assay-design-important.html
31. Taq Polymerase - an overview | ScienceDirect Topics [Internett]. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taq-polymerase>
 32. Real-Time PCR: Understanding Ct - NO [Internett]. [sitert 1. april 2022]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html)
 33. Efficiency of Real-Time PCR - NO [Internett]. [sitert 29. april 2022]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html)
 34. Michael McPherson, Simon Møller. PCR. 2. utg. Taylor & Francis Group; 2006.
 35. Poor PCR Efficiency - NO [Internett]. [sitert 19. april 2022]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html)
 36. Copy number calculator for realtime PCR | Science Primer [Internett]. [sitert 27. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>
 37. Braut GS. spesifisitet. I: Store norske leksikon [Internett]. 2020 [sitert 29. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://snl.no/spesifisitet>
 38. PCR Primer Design Tips [Internett]. Behind the Bench. 2019 [sitert 11. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
 39. Hairpin and self-complementary and Primer-dimer. [Internett]. ResearchGate. [sitert 18. mai 2022]. Tilgjengelig på: https://www.researchgate.net/figure/Hairpin-and-self-complementary-and-Primer-dimer_fig2_327911853
 40. Haugen MN. Sanger-sekvensering. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 28. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/Sanger-sekvensering>
 41. A Few Thoughts on Troubleshooting of DNA Sequencing - Part II [Internett]. SEQme Magazine. [sitert 19. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.seqme.eu/en/magazine/sanger-troubleshooting-part-two>
 42. Lyng RV. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 16381, GBS referansestammer- mottak utsåing og oppbevaring, revisjon 1.7.
 43. Olaisen C. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 16350, GBS referansestammer-preanalyse, revisjon 2.2.
 44. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel)*. 8. mars 2017;8(3):83.
 45. Tris EDTA (TE) Buffer oppskrift BZ210 Lavpris | Biochemazone™ [Internett]. [sitert 14. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://biochemazone.com/product/tris-edta-te-buffer-ph-8/>
 46. Halvorsen-Fredheim SS, Skjærvik A, Westerhus E. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 38423, EZ1 Advanced XL, ekstraksjon av bakterielt DNA, bruk og vedlikehold, revisjon 1.1.
 47. Lysozyme - an overview | ScienceDirect Topics [Internett]. [sitert 14. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/lysozyme>
 48. Proteinase K Interchim.pdf [Internett]. [sitert 14. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.interchim.fr/ft/8/85870n.pdf>
 49. MERCK. Lysing enzymes [Internett]. MERCK. Tilgjengelig på:

- <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/lysing-enzymes>
50. Vaaje-Kolstad G, Stenløkk KSR. RNase A. I: Store norske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 15. mai 2022]. Tilgjengelig på: http://snl.no/RNase_A
 51. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* mars 1990;28(3):495–503.
 52. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Molecular Profiles of Group B Streptococcal Surface Protein Antigen Genes: Relationship to Molecular Serotypes. *J Clin Microbiol.* februar 2002;40(2):620–6.
 53. Maeland JA, Brakstad OG, Bevanger L, Kvam AI. Streptococcus agalactiae beta gene and gene product variations. *J Med Microbiol.* desember 1997;46(12):999–1005.
 54. Institutt for biovitenskap. Etidiumbromid - Institutt for biovitenskap [Internett]. [sitert 7. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/e/etidumbr.html>
 55. Rønning TG, Westerhus E. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 16366, E-gel, brukerveiledning AMM, revisjon 2.0.
 56. Flakne AMS. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 22786, Agilent 2100 Bioanalyzer, DNA 7500 DNA 1000, revisjon 1.8.
 57. Principles of Sample Analysis on a Chip | Centre for Molecular Medicine and Therapeutics [Internett]. [sitert 13. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://cmmt.ubc.ca/facilities-services/bioanalyzer/principles-of-sample-analysis-on-a-chip/>
 58. MAN0017162_QS5HIDInstrument_UG.pdf [Internett]. [sitert 22. april 2022]. Tilgjengelig på: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017162_QS5HIDInstrument_UG.pdf
 59. PrimerQuest - design qPCR assays | IDT [Internett]. Integrated DNA Technologies. [sitert 4. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>
 60. Rønning TG. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 40811, Måling av DNA-konsentrasjon - Qubit fluorometer, Medisinsk mikrobiologi, revisjon 1.1.
 61. Thermo Fisher Scientific. Quantitation: Comparing Qubit fluorometer to the Nanodrop One UV/Vis absorbance [Internett]. 2016 [sitert 6. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.youtube.com/watch?v=y7DLoGxg0k0>
 62. Skjærvik A, Sæbø KS. St. Olavs Hospital EQS-prosedyre 15032, Spatyping, revisjon 5.5.

7. Vedlegg

7.1 Primere, probe og komponent til reaksjonsmix real-time PCR

Vedlegg 1 Bestilling av primere og probe fra TIB Molbiol

Vedlegg 1 viser bestilling av bac-stud-F, bac-stud-R og bac-probe fra TIB Molbiol.

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin
 Dept. of
 Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 Dr. Camilla Olaisen
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge



Billing address:
 St. Olavs Hospital
 Fakturamottak
 Box 2622
 N-6405 Molde
 Norge

Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de
 Consultation
 design@tib-molbiol.de
 Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

Packing list: 22102510 Date: 11.02.2022 Page 1 of 1
 P.O. number: WS#94497 Invoice No.: 22801731 Shipping: DHL 9528566515

Seq. No. 2156310	Name: bac_stud_F	Length: 20 mer	
TCCACCgAAgCgACTAAAC			
Synthesis Scale: ---	Condition: HPLC 2.0 OD I	Purification: HPLC	Amount in OD: 2,00
Seq. No. 2156311	Name: bac_stud_R	Length: 21 mer	
TCCAgTAGCCAgTgCTTTATg			
Synthesis Scale: ---	Condition: HPLC 2.0 OD I	Purification: HPLC	Amount in OD: 2,00
Seq. No. 2156312	Name: bac_probe	Length: 26 mer	
6FAM-ACCCAAggCAgTCAAgTAGAgATTgC--BBQ			
Synthesis Scale: ---	Condition: TM 2.0 OD Iyo	Purification: HPLC	Amount in OD: 2,00
Seq. No. 2156313	Name: cpsI-la-6-7-F	Length: 29 mer	
gAATTgATAACTTTTgTggATTgCgATgA			
Synthesis Scale: ---	Condition: HPLC 10.0 OD	Purification: HPLC	Amount in OD: 10,00
Seq. No. 2156314	Name: CpsN-5-R	Length: 24 mer	
CTCTTCACTCTTTAgTgTAGgTAT			
Synthesis Scale: ---	Condition: HPLC 5.0 OD I	Purification: HPLC	Amount in OD: 5,00
Seq. No. 2156315	Name: CpsJ-8-F	Length: 24 mer	
TATTTgggAggTAATCAAgAgACA			
Synthesis Scale: ---	Condition: HPLC 5.0 OD I	Purification: HPLC	Amount in OD: 5,00
1 x Shipping WPX 1 DHL NOR / CH / UK			

Goods received: 14.feb 2022 C.Olaisen
 Date, Signature



We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Drogge
 Handelsregister HRB 15165 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg
 VSt.No.: DE 814 918 770 | IS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 DUNS no. 312829815 | ILX 4280159350007 | EORI No. DE 4906143
 Gummer, bank, Lopenstrasse 53, D-10245 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 709 00
 SWIFT/BIC: TIBS DE 33 100

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Dr. Camilla Olaisen
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Product Description no. 2156310 **bac_stud_F**
 TIB reference no: 022102510 20-mer 11.02.2022

5' - TCCACCgAAgCAgACTAAAC

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification:

5'-Modifications:

Number of bases:

Wobble bases and GC content:

8,9 nmol / 8,9 µM
 Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: HPLC 2.0 OD I
 no
 A: 8 G: 3 C: 7 T: 2 total 20
 Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 50.0 %

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient ϵ 223780 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺ 6387,7 g / mol
 Molecular weight free acid: 6064,1 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 4488,7 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 28,5 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 2,0 OD
 Molar amount: 8,9 nmol
 Amount in µg mass units: 57,1 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution:
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of: 447 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of: 179 µl
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of: 89 µl
 (To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, if dissolved in 1 ml: 0,057 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml: 1 : 114 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in: 571 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 54,5 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 51,0 °C
 Melting point G/C-content rule 60,0 °C
 54,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

ΔG / ΔH / ΔS -139,3 / -613,4 / -1590,8 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T H = A/C R = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Droege
 Handelsregister HRB 91463 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT No.: DE 814 018 770 | BIS code: 2934 9990 / for kits 3822 0000
 DUNS no. 512829815 | EIN 426019030007 | EORI No. DE 4806453

Commerzbank, Koppenstrasse 95, D-10245 Berlin
 BIC: COMDE33HAN33HAN33
 SWIFT/BIC: COMDE33HAN33HAN33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresburgstraße 22-23 · D-12105 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3VEST
 attn. Dr. Camilla Olaisen
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Product Description no. 2156311 **bac_stud_R**
 TIB reference no: 022102510 21-mer 11.02.2022

5' - TCCAgTAgCCAgTgCTTTATg

Amount / Concentration for product of 1 ml

Synthesis scale and purification :

5-Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

9,3 nmol / 9,3 µM
 Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: HPLC 2.0 OD 1
 NO
 A: 4 G: 5 C: 5 T: 7 total 21
 Wobble: 0 Mod: 0 GC-contents 47,6 %

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient ϵ 214900 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺ 6752,9 g / mol
 Molecular weight free acid : 6412,3 g / mol
 Picomoles per OD₂₆₀ 4653,3 pmol / OD
 Micrograms per OD₂₆₀ 31,4 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD₂₆₀ 2,0 OD
 Molar amount : 9,3 nmol
 Amount in µg mass units : 62,8 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution :
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of : 465 µl
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of : 186 µl
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of : 93 µl
 (To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, if dissolved in 1 ml : 0,053 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml : 1 : 126 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in : 628 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C) 54,5 °C
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C) 51,0 °C
 Melting point GC/C-content rule 62,0 °C
 54,9 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S -143,5 / -639,6 / -1664,6 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUPAC Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C R = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thio

We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify, that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.



Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Dreier
 Handelsregister HRB 93163 B
 Registergericht Berlin Charlottenburg

VAT-No. DE 814 018 770 | IBAN code: 2934 9990 / für kits 3822 0000
 DCNS no. 312829815 | IAN 4200199390007 | EORI No. DE 4906433

Güntherbank, Köpenickerstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE66 1008 0000 0781 7709 00
 SWIFT/BIC BRES DE 33

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
 Eresbergstraße 22-23 · D-12103 Berlin · Germany
 Tel. +49 30 78 79 94-55 · Fax +49 30 78 79 94-99
 WWW.TIB-MOLBIOL.COM



Orders, quotes
 dna@tib-molbiol.de

Consultation
 design@tib-molbiol.de

Troubleshooting
 service@tib-molbiol.de

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH · Eresbergstraße 22-23 · D-12103 Berlin

Dept. of Medical Microbiology MRSA
 St.Olavs Hospital
 LAB3 VEST
 attn. Dr. Camilla Olaisen
 Erling Skjalgssons gate 1
 N-7030 Trondheim
 Norge

Product Description no. 2156312 **bac_probe**
 TIB reference no: 022102510 26-mer 11.02.2022

5' - 6FAM-ACCCAAggCAgTCAAgTAgAgATTgC--BBQ

Amount / Concentration for product of 1 ml
 Synthesis scale and purification: 6,7 nmol / 6,7 µM
 5-Modifications: Synthesis: 0,00 µmol Purification: HPLC Condition: TM 2.0 OD lyo no
 Number of bases: A: 9 G: 7 C: 6 T: 4 total 26
 Wobble bases and GC content: Wobble: 0 Mod.: 0 GC-contents 50.0 %

Chemical properties and constant factors of the product:
 Molar extinction coefficient ε 298770 l / mol cm
 Molecular weight ammonium salt NH₄⁺ 8439,1 g / mol
 Molecular weight free acid: 8013,4 g / mol
 Picomoles per OD 3369,6 pmol / OD
 Micrograms per OD 28,4 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)
 Amount in optical units OD 2,0 OD
 Molar amount: 6,7 nmol
 Amount in µg mass units: 56,9 µg
Molar concentration when delivered in 1 ml solution:
 20 µM (20 pmol/µl) requires a volume of: 6,7 µM (pmol / µl)
 50 µM (50 pmol/µl) requires a volume of: 337 µl
 100 µM (100 pmol/µl) requires a volume of: 135 µl (To prepare stock solutions of different concentration)
 67 µl

Mass concentration (for hybridization):
 Concentration, if dissolved in 1 ml: 0,057 µg / µl
 Dilution to prepare a solution with 0,5 µg/ml: 1 : 114 dilution factor from a 1 ml solution
 To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in: 569 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)
 Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)
 Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)
 Melting point GC-content rule 62,0 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:
 ΔG / ΔH / ΔS -183.3 / -799.9 / -2069.3 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUPAC Code)
 S = G/C Y = C/T K = A/C R = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.
 W = A/T B = A/G G = G/T B = C/G/T V = A/C/D I = Inosin s = Thio



Xi We, the exporter of goods covered by this document, declare that except where otherwise indicated, these goods are of preferential European Economic Area Origin. We hereby certify that this invoice is true and correct and that these goods are of German origin.

Geschäftsführer (GM) Dr. Marcus Dreose Handelsregister HRB 93163 B Registergericht Berlin Charlottenburg
 VIB No.: DE 814 018 770 | IBAN code: 2014 9900 / für kfs 3822 0000
 DUNS no. 312829815 | EIN 4280159350007 | EORI No. DE 4806435
 Commerzbank, Koppenstrasse 93, D-10243 Berlin
 IBAN DE44 1006 0000 0781 7769 00
 SWIFT/BIC CODES DE 21 100

Vedlegg 2 Design av primere og probe

Vedlegg 2 viser en oversikt over nukleotidsekvensene for bac-stud-F, bac-stud-R og bac-probe. De er designet i PrimerQuest Tool på nettsiden IDT av Torunn Gresdal Rønning. Det vises også posisjonen for primerne og probe i *bac* genomet.

[TORUNN GRESDAL RØNNING](#) TOGGLE DROPDOWN



- [PRODUCTS & SERVICES](#)
- [APPLICATIONS & TECHNOLOGIES](#)
- [SUPPORT & EDUCATION](#)
- [TOOLS](#)
- [COMPANY](#)

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN
RESULTS
ABOUT
HELP

Sequence 1 Assay Set 1 Details

[BACK TO RESULTS](#)

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 112

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward TCCACCGAAGCAGACTAAAC (Sense)	3273	3293	20	62	50
Probe ACCCAAGGCAGTCAAGTAGAGATTGC (Sense)	3298	3324	26	68	50
Reverse TCCAGTAGCCAGTGCTTTATG (AntiSense)	3364	3385	21	62	47.6

Base	Sequence
1	AAAAATTATTGCAGGAAGTTATTATTCGGAATGGAAGAATGAAAGGTTAAAAATAATATACCCAATTTAATATGCAGTTCATATTGGAAGGGTATACTGT
101	AGATAAATAAAATATTGGAGGATATCGATATGTTTAAATCTAATTATGAAAGAAAAATGCGTTATTCCATTCGTAAATTTAGTGTAGGAGTAGCTAGTGT
201	AGCGGTACGTAGTTTGTTCATGGGAAGCGTTGCTCATGCAAGTGAGCTTGTAAGGACGATAGTGTGAAGACTACCGAGGTTGCAGCTAAGCCCTATCCA
301	AGTATGGCTCAAACAGATCAAGGAAATAATTCATCATCCTCGGAACTTGAGACAACAAAGATGGAAATTCCTACAACA GACATAAAAAAAGCTGTTGAAC
401	CGGTCGAGAAAAACAGCTGGGAAACATCTGCCACTGATACTGGAAAACGAGAGAAACAATTACAACAATGGAAAAATA ATCTAAAAAATGATGTGGATAA
501	CACAATCTATCTCATGAACAGAAAAATGAGTTTAAAAACAAAAATGATGAAACAAATGATTCGTGATGCATTATTAGA ATTAGAAAAATCAATTTAACGAA
601	ACTAATAGACTGTTACACATCAAACAACATGAAGAAGTTGAGAAAGATAAGAAAGCTAAGCAACAGAAAACCTCTGAAA CAGTCAGATACGAAAGTAGATC
701	TAAGCAATATTGACAAAGAGCTTAATCATCAAAAAAGTCAAGTTGAAAAAATGGCAGAGCAAAAGGGAATCACAAATG AAGATAAAGATTCTATGCTGAA

801	AAAAATCGAAGATATTTCGTAACAAGCTCAACAAGCAGATAAAAAAGAAGATGCCGAAGTAAAGGTTTCGTGAAGAACT AGGTAAACTCTTTAGTTCAACT
901	AAAGCTGGTCTGGATCAAGAAATTCAGAGCATGTGAAGAAAGAAACGAGTAGTGAGGAAAATACTCAGAAAGTTGAT GAACACTATGCTAATAGCCTTC
1001	AGAACCTTGCTCAAAAATCTCTTGAAGAACTAGATAAGGCAACTACCAATGAACAAGCTACACAAGTTAAAAATCAAT TCTTAGAAAACGCTCAAAAGCT
1101	CAAAGAAATACAACCTCTTATCAAAGAAACGAATGTGAAATTTGTATAAGGCTATGAGTGAGAGCTTGGAGCAGGTTGA GAAGGAATTA AACATAATTCG
1201	GAAGCTAATTTAGAAGATTTGGTTGCGAAATCTAAAGAAATCGTAAGAGAATACGAAGGAAAACCTTAATCAATCTAAA AATCTTCCAGAATTAAGCAAC
1301	TAGAAGAGGAAGCTCATTGAAAGTTGAAACAAGTTGTGGAGGATTTTAGAAAAAATTTAAAACGTCAGAGCAAGTGA CACCAAAAAACGTGTCAAACG
1401	AGATTTAGCTGCTAATGAAAATAATCAACAAAAGATTGAGTTAACAGTTTCACCAGAGAATATCACTGTATATGAAGG TGAAGACGTGAAATTTACAGTC
1501	ACAGCTAAAAGTGATTGGAAGACGACGTTGGACTTCAGTGATCTTTTAACAAAATATAATCCGTCTGTATCAGATAGA ATTAGTACAAATTATAAGACTA
1601	ACACGGATAATCATAAGATTGCCGAAATCACTATCAAGAATTTGAAGCTAAATGAAAGTCAAACAGTGACTCTAAAAG CTAAAGATGATTCTGGCAATGT
1701	AGTTGAAAAAACATTCCTATTACAGTGCAAAGAAAGAGGAGAAACAAGTTCTTAAAACACCAGAGCAGAAAGATTC TAAAACGGAAGAAAAGGTTCTCT
1801	CAAGAACCAAAATCAAATGACAAGAATCAATTACAAGAGTTGATTAAATCAGCTCAACAAGAACTGGAAAAGTTAGAA AAAGCAATAAAGAATTAATGG
1901	AGCAACCAGAGATTCATCCAATCCAGAGTATGGTATTCAAAAATCTATTTGGGAGTCACAAAAAGAGCCTATCCAGG AAGCCATAACAAGTTTAAAGAA
2001	GATTATTGGTGATTTCATCTTCAAATACTACACAGAGCACTATTTTAACAAATATAAATCTGATTTTATGAATTATCA ACTTCATGCACAAATGGAGATG
2101	CTGACTAGAAAAGTGGTTCAGTATATGAACAAATATCCTGATAATGCAGAAATTA AAAAGATATTTGAGTCAGATATG AAGAGAACGAAAGAAGATAATT
2201	ACGGAAGTTTAGAAAATGATGCTTTGAAAGGCTATTTGAGAAATATTTCTTACACCATTTAATAAAAATTAAGCAGA TTGTAGATGATTTGGATAAAAA
2301	AGTAGAACAAAGATCAGCCAGCACCAATTCGGGAAAATTCAGAAATGGATCAGGCTAAGGAAAAGGCTAAGATTGCTGT ATCGAAGTATATGAGTAAGGTT
2401	TTAGATGGAGTTCATCAACATCTGCAGAAGAAAAATCACAGTAAAATTTGTTGATCTTTTAAAGAACTTGAAGCGATT AAACAACAAACTATTTTTGATA
2501	TTGACAATGCAAAGACTGAAGTAGAGATTGATAACTTAGTACACGATGCATTCTCAAAAATGAATGCTACTGTTGCTA AATTTCAAAAAGGTCTAGAGAC
2601	AAATACGCCAGAACTCCAGATACACCGAAGATTCCAGAGCTACCTCAAGCCCCAGATACACCGCAGGCTCCAGACAC ACCGCATGTTCCGGAATCACCA
2701	AAGCCCCAGAAGCACCGGTGTTCCGGAATCACCAAAGACTCCAGAAGCACCGCATGTTCCGGAATCACCAAAGACT CCAGAAGCACCAAAGATTCCGG
2801	AACCCCTAAGACTCCAGACGTCCCTAAGCTTCCAGACGTCCCTAAGCTTCCAGATGCACCGAAGTTACCAGATGGGT TAAATAAAGTTGGACAAGCAGT
2901	ATTTACATCAACTGATGGAAATACTAAGGTTACGGTTGTATTTGATAAACCTACAGATGCTGATAAGTTACATCTCAA GGAAGTAACGACGAAAGAGTTG
3001	GCTGATAAAATGCTCATAAAAACAGGAGGAGGAACAGTTCGTGTGTTTACTTATCTCTTTCTAAAGGAGGCAAGGAA ACACATGTCAATGGAGAACGAA
3101	CTGTTCCGGCTCGCGCTTGGGCAGACTGGCTCAGATGTTACAGTCTATCACGTAAAGGAAAATGGCGACCTTGAGCGTA TTCCTTCTAAAGTTGAAAATGG
3201	GCAAGTTGTTTTTAAAACGAACCACTTCAGTTTGTGTTGCGATTAAGACACTTTCTAAGGATCAAAAATGTT AC

3273	<u>TCCACCGAAGCAGACTAAAC</u> CTTCT
3298	<u>ACCCAAGGCAGTCAAGTAGAGATTGC</u> AGAGAGTCAAACCTGGAAAATTCCAGAGTAAAGCAGCTAAT
3364	<u>CATAAAGCACTGGCTACTGGA</u> AATGAAACAGTGGCAA
3401	AAGGAAATCCTACATCAACAACGGAAAAGAAATTGCCATATACAGGAGTGGCATCTAATCTAGTTCTTGAAATTATGG GTCTCCTTGGTTTGATTGGAAC
3501	TTCATTTCATCGCAATGAAAAGAAGAAATCATGATTCAGTTTTTTAAAAATATCCACTTTTCGATATCTAGCATTTGAT TGGTTATCTGTGGATGATTCTA
3601	AAGATGTTACCTATCGTTGGTATGTAACAATTATAAGTCATTTTCATATAAAAAGAGGCTCTTTGTCAACTGTAGTTGGT TGAAACAACGTACAAACTAGAA
3701	AGGACGCATTTTTGTCTTTCTTTTTTGATGTTGAGGGCAATGAAAATACGCTTTTTGAAGTTTTCAAATTCGGAAAAC TA

Vedlegg 3 Tillaging av stockløsning og bruksløsning til primere og probe

I tabell 14 er det ført opp tillaging av stockløsning og bruksløsning for bac-stud-F, bac-stud-R og bac-probe til real-time PCR-analyser på QuantStudio 5.

Tabell 14: Tillaging av stockløsning og bruksløsning av primere og probe

	Tillaging av stockløsning (100µM)	Tillaging av bruksløsning primer=12µM, probe=8µM
bac-stud-F	Tilsett 89µL MGW	Ta ut 24µL av stockløsning og tilsett 176µL MGW
bac-stud-R	Tilsett 93µL MGW	Ta ut 24µL av stockløsning og tilsett 176µL MGW
bac-probe	Tilsett 67µL MGW	Ta ut 16µL av stockløsning og tilsett 184µL MGW

Vedlegg 4 Reagensvedlegg for PerfeCTa MultiPlex qPCR Supermix

Vedlegg 4 er reagensvedlegg til PerfeCTa MultiPlex qPCR SuperMix som var en komponent i reaksjonsmix som ble anvendt til real-time PCR-metoden.



PerfeCTa® MultiPlex qPCR SuperMix

Cat. No 95063-200 Size: 200 x 50- μ L reactions
95063-01K 1000 x 50- μ L reactions

Store at -25°C to -15°C
protected from light

Description

PerfeCTa MultiPlex qPCR SuperMix is a 2X concentrated, ready-to-use reaction cocktail for real-time quantitative PCR (qPCR) that contains all components, except primers, probes and templates. The system transcends multiplex limitations of conventional PCR master mixes, enabling unbiased amplification of up to five target sequences in a single tube. Suppression of low copy amplicons by high copy reference targets in the amplification is a common problem in multiplex PCR. This can skew, or mask the apparent representation and quantification of low copy target sequences. PerfeCTa MultiPlex qPCR SuperMix delivers dynamic range and sensitivity to multiplexed qPCR that is comparable to that for singleplex qPCR probe assays without the need for limiting or variable primer concentrations.

A key component of this supermix is AccuStart™ Taq DNA polymerase, which contains monoclonal antibodies that bind to the polymerase and keep it inactive prior to the initial PCR denaturation step. Upon heat activation (2 minutes at 95°C), the antibodies denature irreversibly, releasing fully active, unmodified Taq DNA polymerase. This enables specific and efficient primer extension with the convenience of room temperature reaction assembly.

Instrument Compatibility

Different real-time PCR systems employ different strategies for the normalization of fluorescent signals and correction of well-to-well optical variations. It is critical to match the appropriate qPCR reagent to your specific instrument. PerfeCTa MultiPlex qPCR SuperMix does not contain an internal reference dye to allow greater flexibility in your choice of reporter fluorophores and instrument platforms. Concentrated solutions of ROX™ Reference Dye or Low ROX Reference Dye are provided separately. In general, instruments that utilize variable excitation wavelengths that are tuned to each respective dye detection channel provide superior sensitivities and dynamic ranges for multiplex probe applications. Your choice of probe reporter dyes and any optional internal reference dye must be matched to the excitation and emission optics of your particular instrument. Please consult the user manual for your real-time PCR system.

Components

PerfeCTa Multiplex qPCR Supermix	2X reaction buffer containing optimized concentrations of MgCl ₂ , dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), AccuStart Taq DNA Polymerase, and stabilizers.
ROX Reference Dye (50X)	50X concentrated ROX solution optimized for Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, or StepOnePlus™
Low ROX Reference Dye (50X)	50X concentrated ROX solution optimized for systems using 580 nm to 585 nm excitation wavelength for the ROX dye channel: Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViA™ 7, or Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™

Storage and Stability

Store components in a constant temperature freezer at -25°C to -15°C protected from light upon receipt. Repeated freezing and thawing of the Supermix is not recommended. For lot specific expiry date, refer to package label, Certificate of Analysis or Product Specification Form.

Guidelines for Multiplex qPCR:

- The design of highly specific primers and probes is a critical and challenging aspect of successful multiplex qPCR. Each primer and probe should have similar thermodynamic properties to support efficient PCR amplification using a common temperature cycling program for all amplicons. The use of computer aided primer design programs is encouraged in order to minimize the potential for internal secondary structure and complementation at 3'-ends within each primer, primer pairs, and primer/probe combinations
- Amplicon size should be consistent for each target sequence and limited to approximately 65 - 100 bp.



Guidelines for qPCR continued:

- Limiting primer concentration for high copy genes is acceptable, but not required. A final concentration of 300 nM each primer and 100 to 250 nM probe is effective for most applications. Each probe for a multiplex assay should be labeled using dyes with minimal spectral overlap and non-fluorescent quencher compounds. Matching dyes with discrete fluorescent excitation and emission optima improves the accuracy of the multicomponenting, or dye deconvolution algorithms employed by the real-time PCR analysis software.
- Preparation of a reaction cocktail is recommended to reduce pipetting errors and maximize assay precision. Assemble the reaction cocktail with all required components except sample template (genomic DNA or cDNA) and dispense equal aliquots into each reaction tube. Add the DNA template to each reaction as the final step. Addition of samples as 5 to 10- μ L volumes will improve assay precision.
- Suggested input quantities of template are: cDNA corresponding to 10 pg to 1 μ g of total RNA; 100 pg to 1 μ g genomic DNA
- After sealing each reaction, vortex gently to mix contents. Centrifuge briefly to collect components at the bottom of the reaction tube.

Reaction Assembly

Component	Volume for 50- μ L rxn.	Final Concentration
PerfeCt _{ta} Multiplex qPCR SuperMix (2X)	25 μ L	1x
Forward primers	variable	100 – 500 nM
Reverse primers	variable	100 – 500 nM
Probes	variable	100 – 250 nM
ROX or Low ROX Reference Dye (50X)	1 μ L	<i>optional</i>
Nuclease-free water	variable	
Template(s)	<u>5 – 10 μL</u>	variable
Final Volume (μ L)	50 μ L	

Reaction Protocol

Incubate complete reaction mix in a real-time thermal detection system as follows:

Initial denaturation:	95°C, 2 to 3 min
PCR cycling (30-45 cycles):	95°C, 10 to 15 s
	55 – 65°C, 60s (collect and analyze data)

Full activation of AccuStart Taq DNA polymerase occurs within 30 seconds at 95°C. Initial denaturation times greater than 3 minutes are usually not required. However, amplification of gDNA targets may benefit from a prolonged initial denaturation step (5-10 min) to fully denature and fragment the template. This minimizes the potential for renaturation of long fragments and/or repetitive sequence regions that can impair replication of the target sequence by the PCR process.

Quality Control

Kit components are free of contaminating DNase and RNase. PerfeCt_{ta} Multiplex qPCR SuperMix is functionally tested in a four-plex TaqMan qPCR using variable concentrations of one target sequence from 100 to 1 x 10⁷ copies and 1 x 10⁸ copies each of three other target sequences. Kinetic analysis must demonstrate linear resolution over six orders of dynamic range ($r^2 > 0.995$) and a PCR efficiency > 90%.

Limited Label Licenses

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this manual and for use with components contained in the kit only. Quantabio, LLC. grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this manual, and additional protocols available at www.quantabio.com. Some of these additional protocols have been provided by Quantabio product users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by Quantabio, LLC. Quantabio, LLC. neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Other than expressly stated licenses, Quantabio, LLC. makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. Quantabio, LLC. specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. Quantabio, LLC. may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

©2021 Quantabio, LLC. 100 Cummings Center Suite 407J Beverly, MA 01915; Telephone number: 1-888-959-5165.

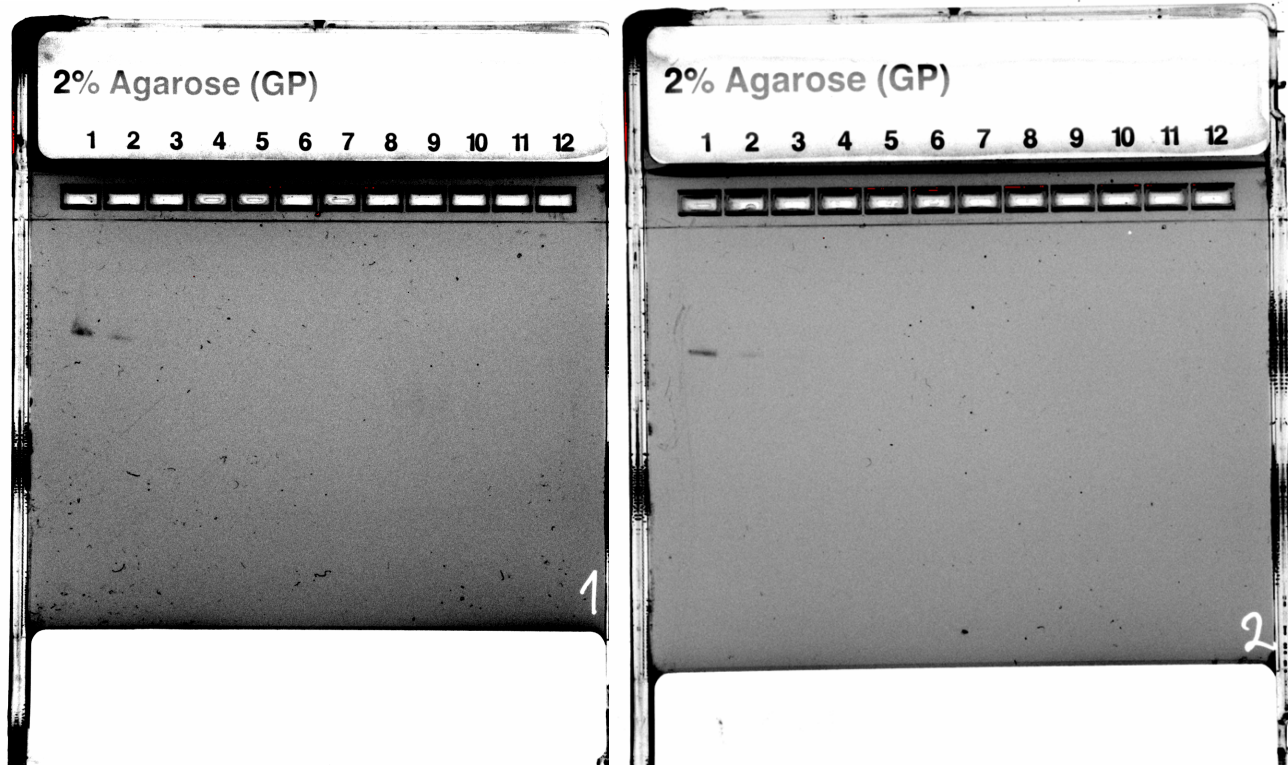
Quantabio products are manufactured in Beverly, Massachusetts, Frederick, Maryland and Hilden, Germany.

Intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention or treatment of a disease.

PerfeCt_{ta} and AccuStart are trademarks of Quantabio, LLC. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. LightCycler is a registered Trademark of Roche. Applied Biosystems, StepOne, StepOnePlus, ViiA, and ROX are trademarks Life Technologies Corporation. Stratagene, MX3000P, MX3005P and MX4000 are trademarks of Agilent Technologies, Inc.

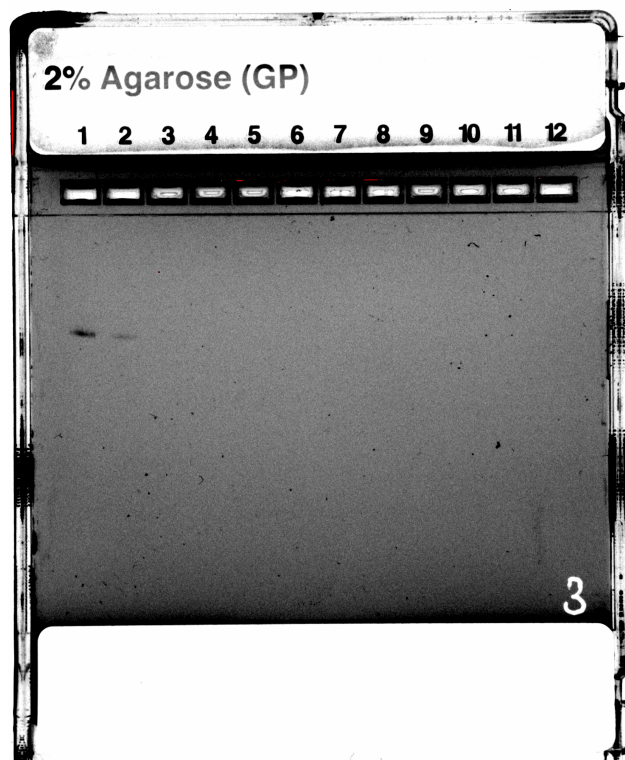
7.2 Resultater

Vedlegg 5 E-gel fra konvensjonell PCR



Figur 14: Resultat fra E-gel til 10-folds fortynningsrekke parallell 1 og 2 fra konvensjonell PCR.

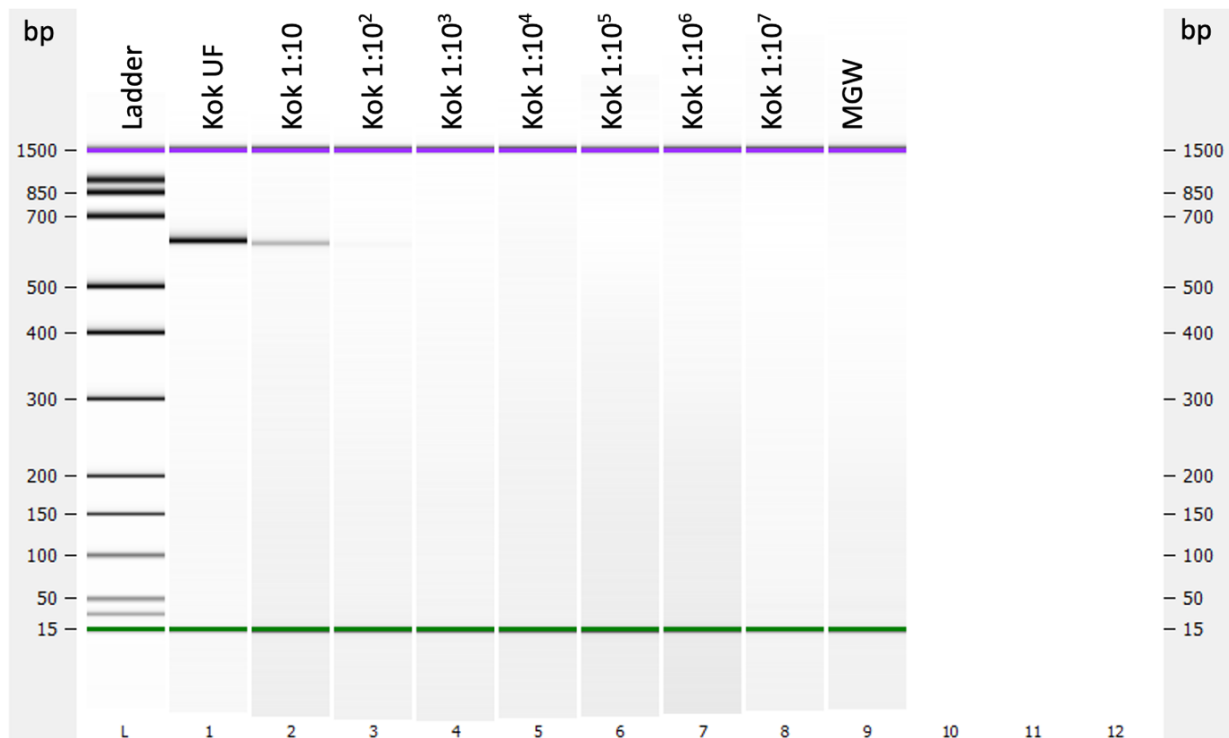
I figur 14 vises resultat fra E-gel til 10-foldsfortynningsrekke parallell 1 og 2 konvensjonell PCR.



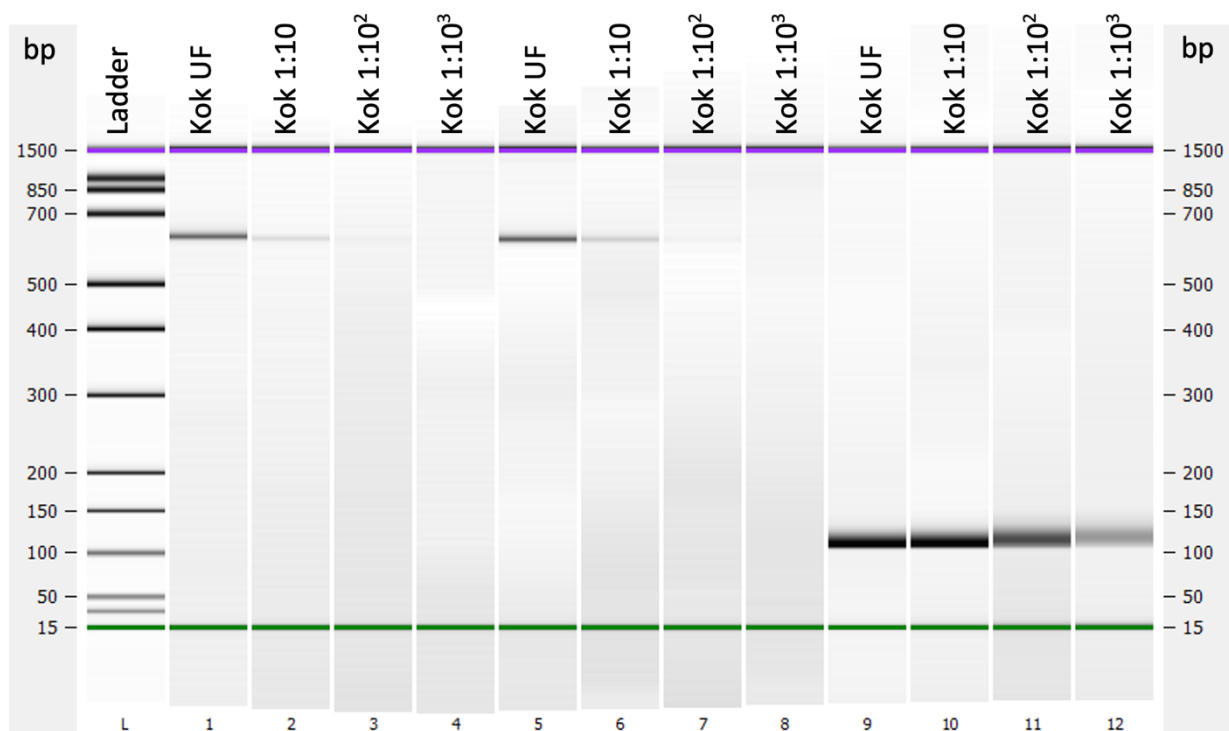
Figur 15: Resultat fra E-gel til 10-folds fortynningsrekke parallell 3 fra konvensjonell PCR.

I figur 15 vises resultat fra E-gel til 10-folds fortynningsrekke parallell 3 konvensjonell PCR.

Vedlegg 6 DNA LabChip fra konvensjonell PCR og andre effektivitetsforsøk



Figur 16: Gel-bilde resultat fra DNA LabChip for negativ kontroll og parallel 1 konvensjonell PCR. Viser tre bånd for uforynnet prøve og de to første fortyningene av NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysning. Negativ kontroll (MGW) ble negativ da det ikke ble dannet noen bånd.

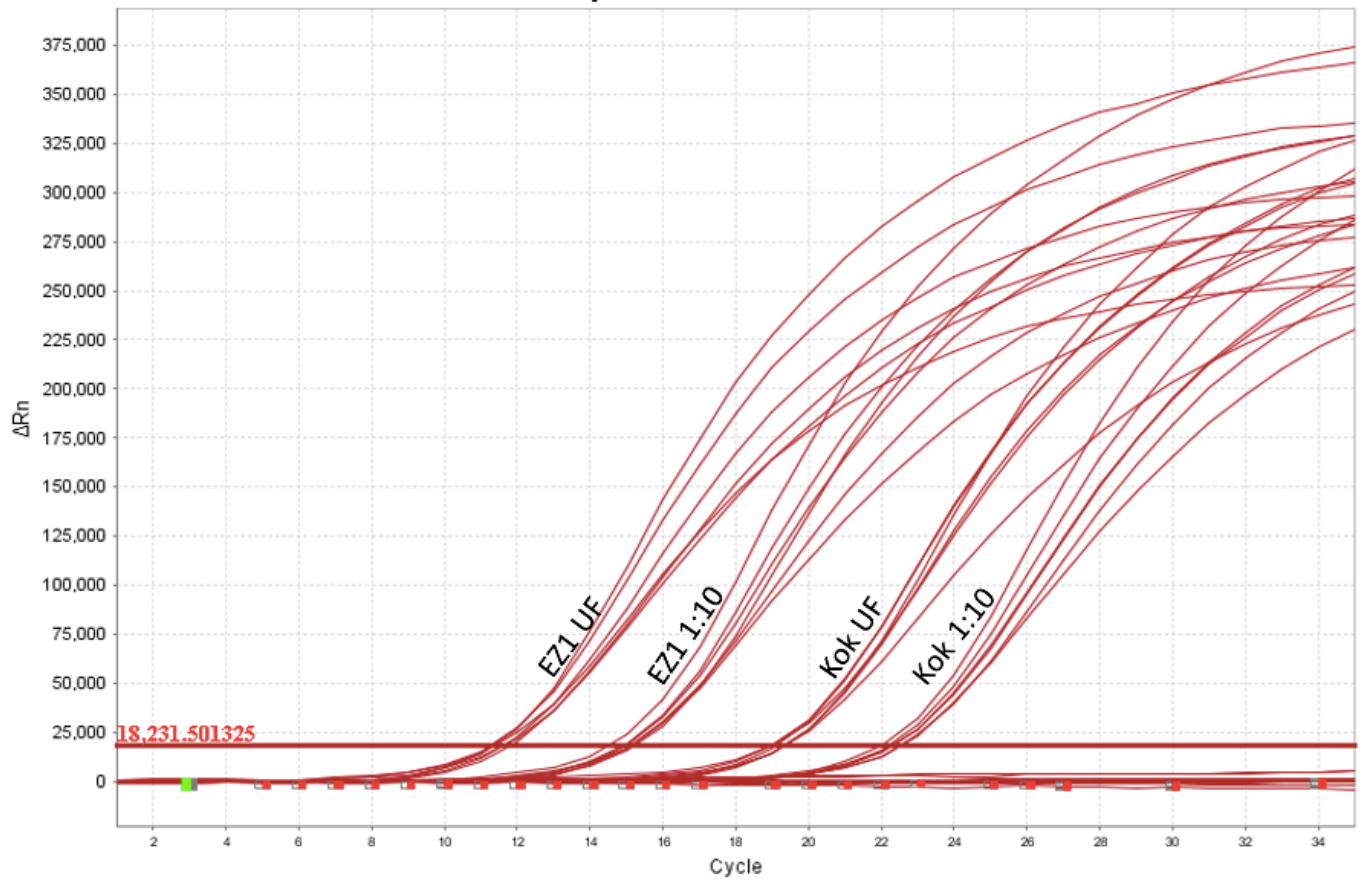


Figur 17: Gel-bilde resultat fra DNA LabChip for parallel 2 og 3 konvensjonell PCR. Begge parallellene viser tre bånd for uforynnet prøve og de to første fortyningene av NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysning. I tillegg vises fire bånd fra andre effektivitetsforsøk med NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysning.

I figur 16 og 17 vises gel-bilde resultat fra DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyser fra konvensjonell PCR og andre effektivitetsforsøk.

Vedlegg 7 Amplifikasjonsplott fra temperaturgradientanalysen

Amplification Plot

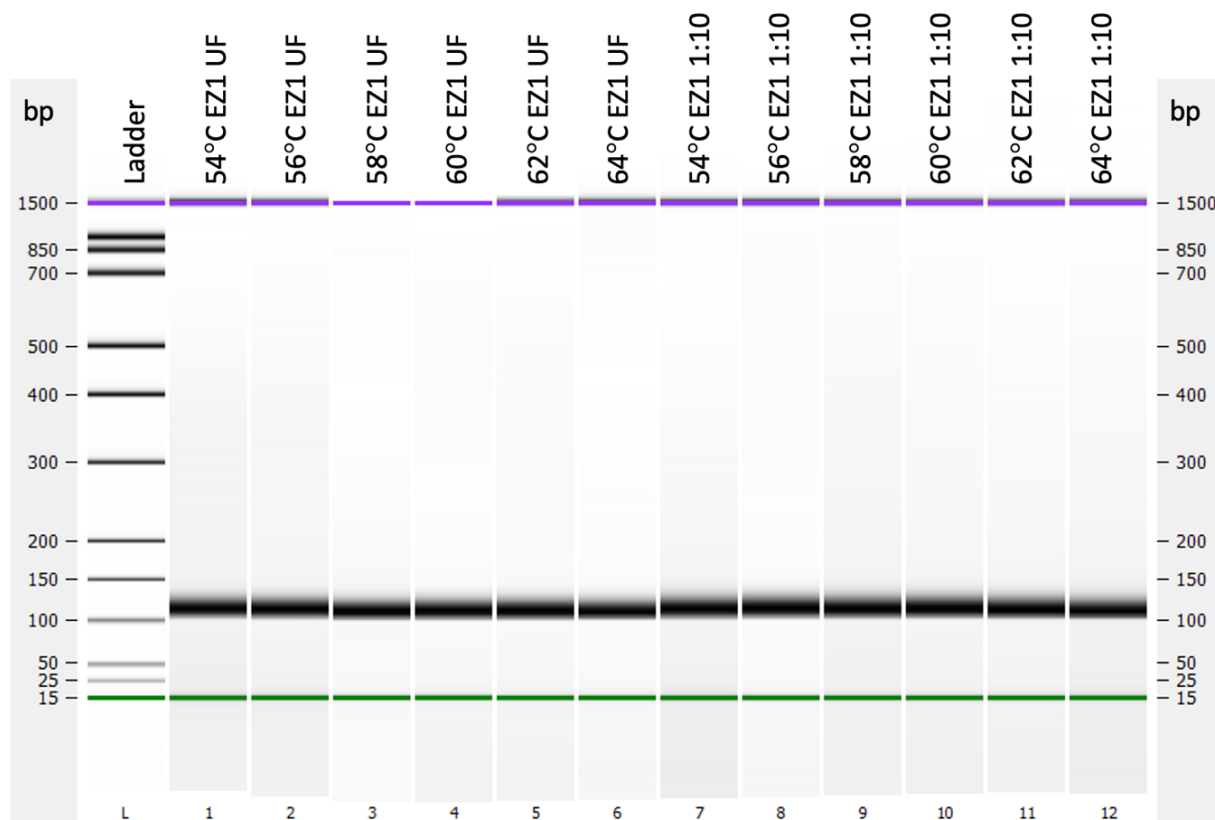


■ bac

Figur 18: Amplifikasjonsplott fra temperaturgradientanalysen. Hver prøve fikk en Ct-verdi ved alle annealing-temperaturene. Negativ kontroll (MGW) fikk ikke en Ct-verdi.

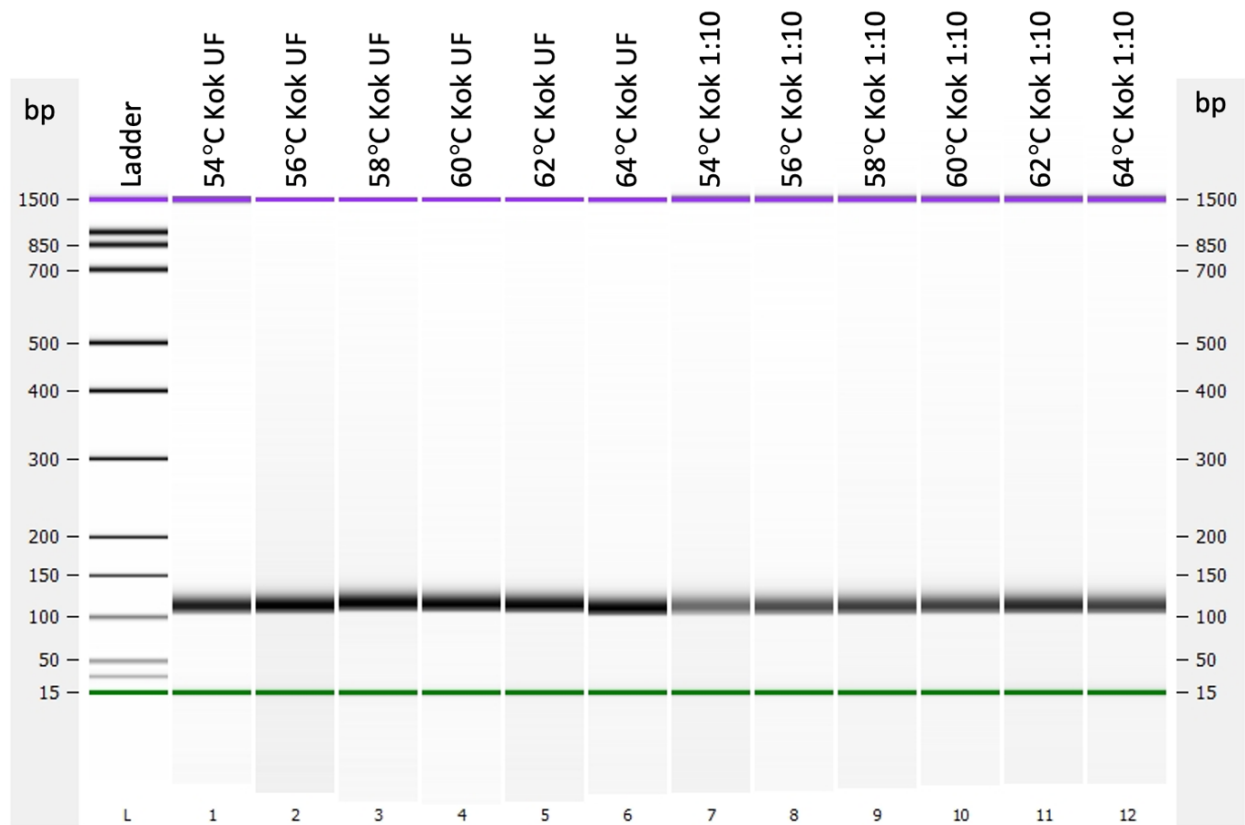
I figur 18 vises amplifikasjonsplott fra temperaturgradientanalysen.

Vedlegg 8 DNA LabChip fra temperaturgradientanalysen



Figur 19: Gel-bilde resultat DNA LabChip for PCR-produkt fra temperaturgradientanalysen. Det er vist bånd for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1 for ufortynnede og 1:10 fortynnede prøver. Båndene er på omtrent 112 basepar sammenlignet med ladder.

I figur 19 vises gel-bilde resultat fra DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyser for PCR-produkt fra temperaturgradientanalysen. For prøve 3 og 4 ble det utført manuell justering av øvre markør.



Figur 20: Gel-bilde resultat for PCR-produkt fra temperaturgradientanalysen. Det er vist bånd for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering (kok) for uforynnede og 1:10 fortynnede prøver. Båndene er på omtrent 112 basepar sammenlignet med ladder.

I figur 20 vises gel-bilde resultat fra DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyser for PCR-produkt fra temperaturgradientanalysen. For prøve 2-6 ble det utført manuell justering av øvre markør.

Vedlegg 9 Ct-verdier fra andre effektivitetsforsøk

I tabell 15 og 16 vises Ct-verdiene for hver parallell fra andre effektivitetsforsøk.

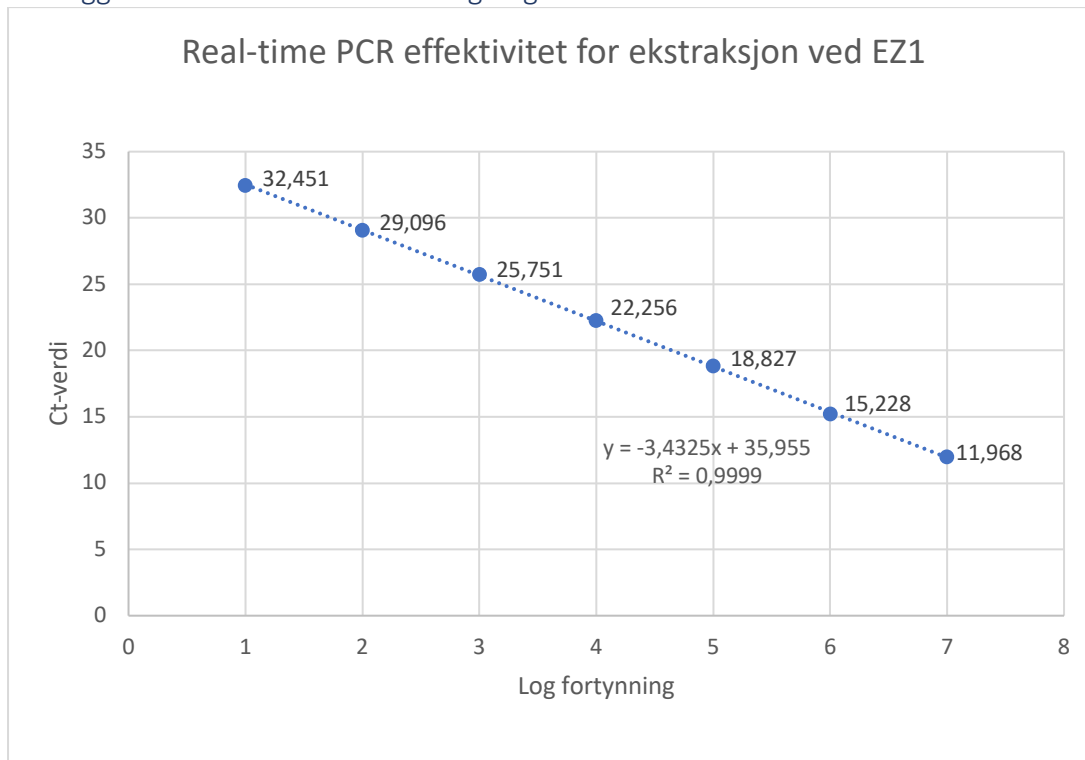
Tabell 15: Ct-verdier for de tre parallellene av NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1 fra andre effektivitetsforsøk.

Fortynning	Ct-verdi		
	NCTC 11078 Ekstrahert ved EZ1 Parallell 1	NCTC 11078 Ekstrahert ved EZ1 Parallell 2	NCTC 11078 Ekstrahert ved EZ1 Parallell 3
UF	11,947	12,254	11,703
1:10	15,296	15,243	15,145
1:10 ²	18,801	18,856	18,825
1:10 ³	22,338	22,145	22,285
1:10 ⁴	25,808	25,705	25,741
1:10 ⁵	29,095	29,132	29,061
1:10 ⁶	32,213	32,532	32,608

Tabell 16: Ct-verdier for de tre parallellene av NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering fra andre effektivitetsforsøk.

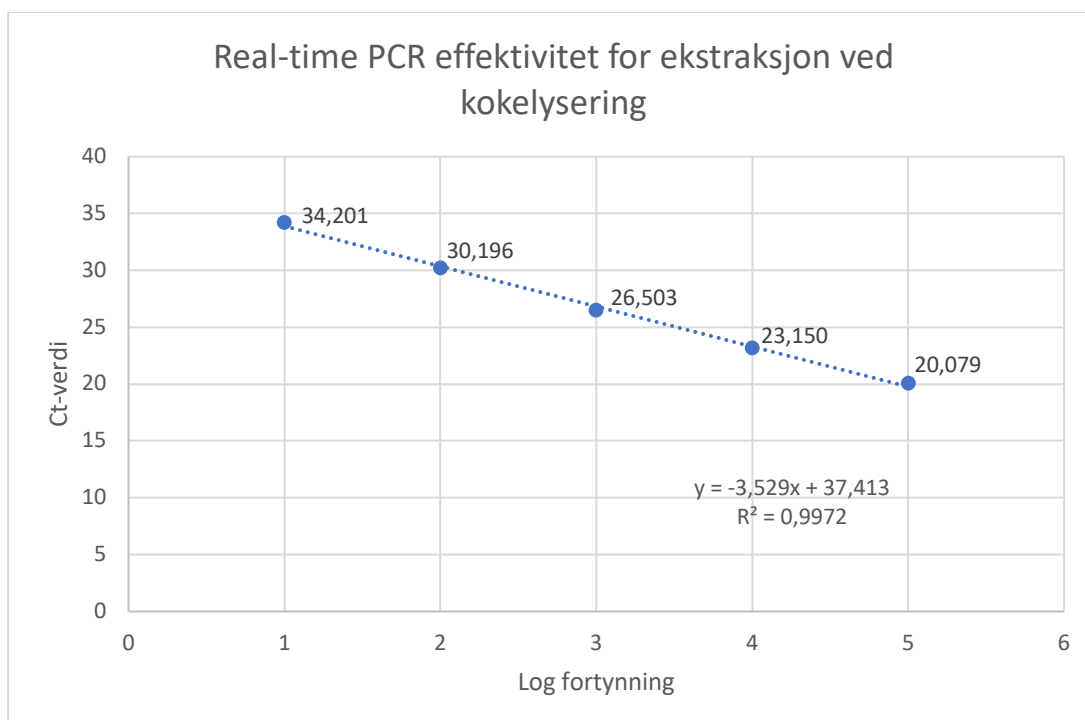
Fortynning	Ct-verdi		
	NCTC 11078 Ekstrahert ved kokelysering Parallell 1	NCTC 11078 Ekstrahert ved kokelysering Parallell 2	NCTC 11078 Ekstrahert ved kokelysering Parallell 3
UF	19,809	20,207	20,221
1:10	23,258	23,074	23,118
1:10 ²	26,608	26,128	26,774
1:10 ³	30,176	30,186	30,224
1:10 ⁴	34,570	34,018	34,015

Vedlegg 10 Standardkurver for beregning av effektivitet



Figur 21: Standardkurve for effektivitet for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1. På y-aksen er Ct-verdi og på x-aksen er log til fortyning.

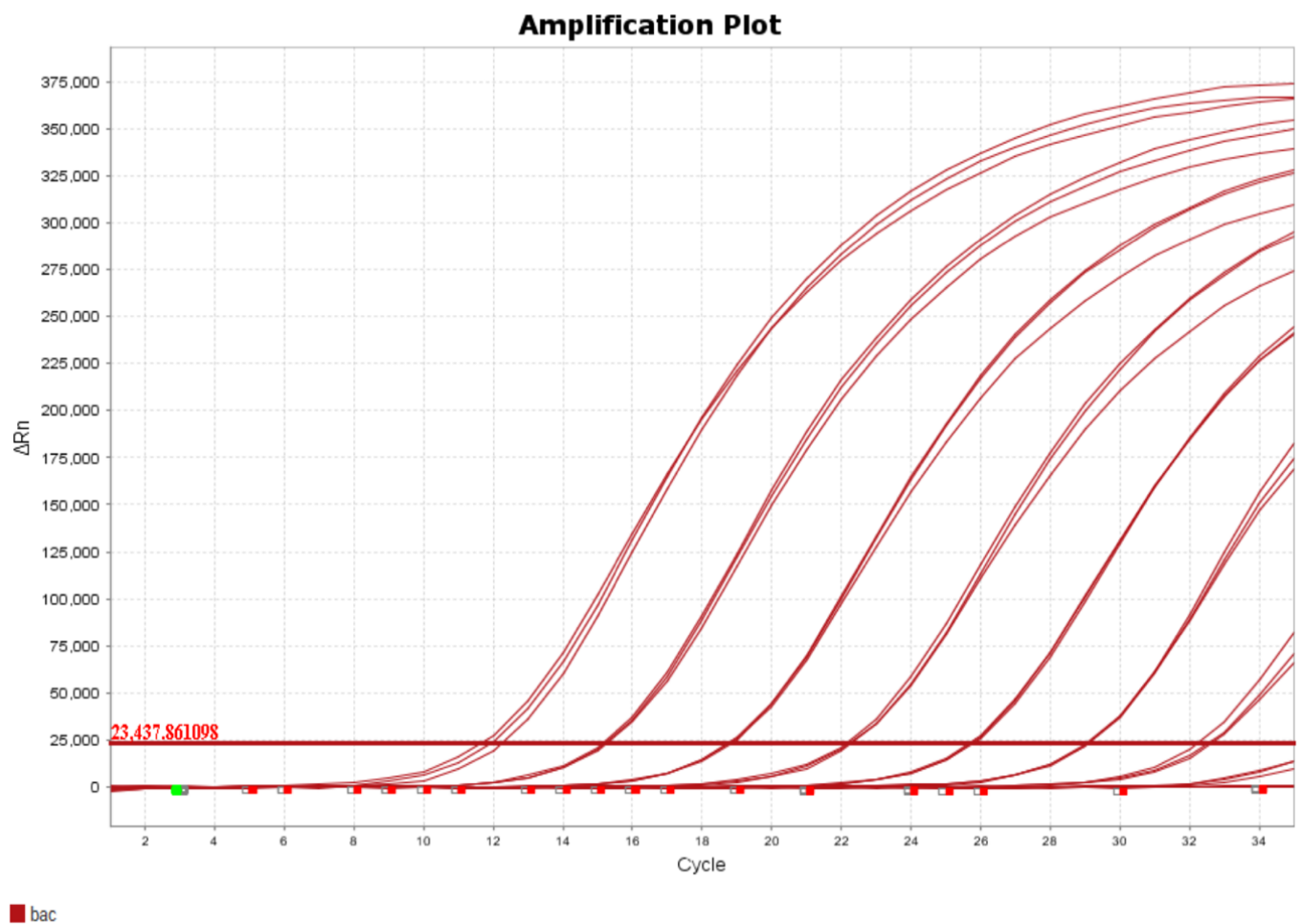
I figur 21 vises en standardkurve for effektivitet for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1.



Figur 22: Standardkurve for effektivitet for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysring. På y-aksen er Ct-verdi og på x-aksen log til fortyning.

I figur 22 vises en standardkurve for effektivitet for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysring.

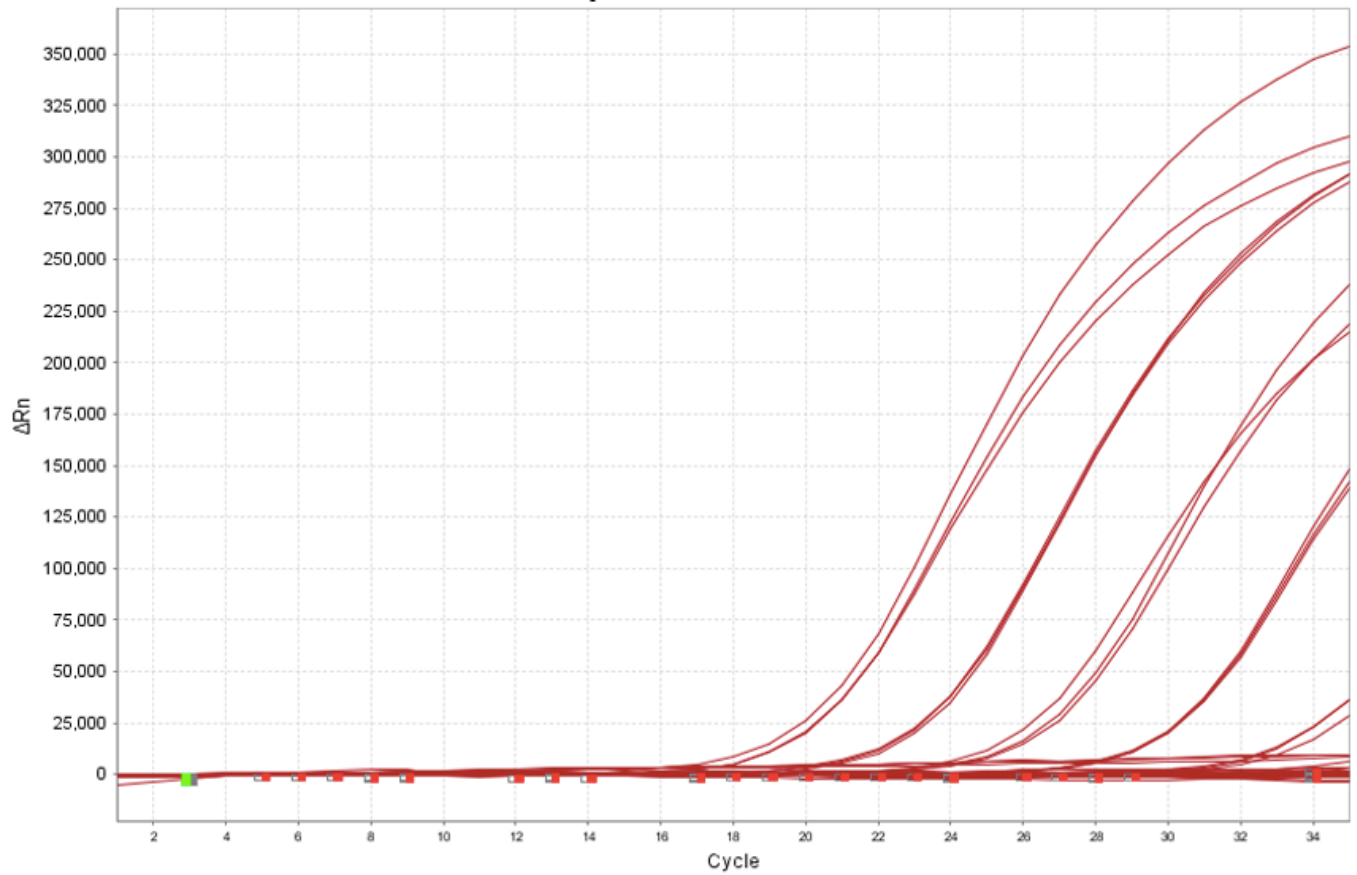
Vedlegg 11 Amplifikasjonsplott fra andre effektivitetsforsøk



Figur 23: Amplifikasjonsplott fra andre effektivitetsforsøk for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1. For de tre parallellene ble det en Ct-verdi for ufortynnet og de seks første fortyningene.

I figur 23 vises amplifikasjonsplott fra andre effektivitetsforsøk for NCTC 11078 ekstrahert ved EZ1.

Amplification Plot



■ bac

Figur 24: Amplifikasjonsplott fra andre effektivitetsforsøk for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering. For de tre parallellene ble det en Ct-verdi for ufortynnet og de fire første fortyningene.

I figur 24 vises amplifikasjonsplott fra andre effektivitetsforsøk for NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering.

Vedlegg 12 Sensitivitet

I tabell 17 og 18 vises beregningene som ble gjort for å finne deteksjonsgrensen. Det ble brukt en kopitall-kalkulator, hvor det ble lagt inn målt DNA konsentrasjon for EZ1/kokelysert og genomstørrelsen til GBS på 2,08Mb.

Tabell 17: Målt DNA-konsentrasjon for kokelysering. Konsentrasjonen ble anvendt for å finne deteksjonsgrensen for kokelysering. Konsentrasjonen ble multiplisert med 2 da det tilsettes 2µL i PCR-oppsettet. Deretter ble det anvendt en kopitall-kalkulator for real-time PCR for å finne deteksjonsgrensen. For kokelysering ble deteksjonsgrensen 49,48.

Fortynning	Målt DNA konsentrasjon-kokelysering (ng/µL)	Målt DNA-konsentrasjon*2µL	Kopitall beregnet på genomstørrelsen til GBS på 2,08Mb
UF	0,564	1,128	4,948*10 ⁵
1:10	0,0564	0,1128	4,948*10 ⁴
1:10 ²	0,00564	0,01128	4,948*10 ³
1:10 ³	0,000564	0,001128	4,948*10 ²
1:10 ⁴	0,0000564	0,0001128	49,48

Tabell 18: Målt DNA-konsentrasjon for EZ1. Konsentrasjonen ble anvendt for å finne deteksjonsgrensen for EZ1. Konsentrasjonen ble multiplisert med 2 da det tilsettes 2µL i PCR-oppsettet. Deretter ble det anvendt en kopitall-kalkulator for real-time PCR for å finne deteksjonsgrensen. For EZ1 ble deteksjonsgrensen 102,6.

Fortynning	Målt DNA konsentrasjon- EZ1 (ng/µL)	Målt DNA-konsentrasjon*2µL	Kopitall beregnet på genomstørrelsen til GBS på 2,08Mb
UF	117	234	1,026*10 ⁸
1:10	11,7	23,4	1,026*10 ⁷
1:10 ²	1,17	2,34	1,026*10 ⁶
1:10 ³	0,117	0,234	1,026*10 ⁵
1:10 ⁴	0,0117	0,0234	1,026*10 ⁴
1:10 ⁵	0,00117	0,00234	1026
1:10 ⁶	0,000117	0,000234	102,6

Vedlegg 13 Spesifisitet

I tabell 19 og 20 vises en oversikt over de utvalgte 60 klinisk stammene. GBS

referanselaboratorium har tidligere utført konvensjonell PCR for disse stammene. I

tabellene er det ført opp resultat fra spesifisitetsundersøkelsen. De 30 *bac*-gen negative fikk ikke Ct-verdier, mens de 30 *bac*-gen positive fikk Ct-verdier.

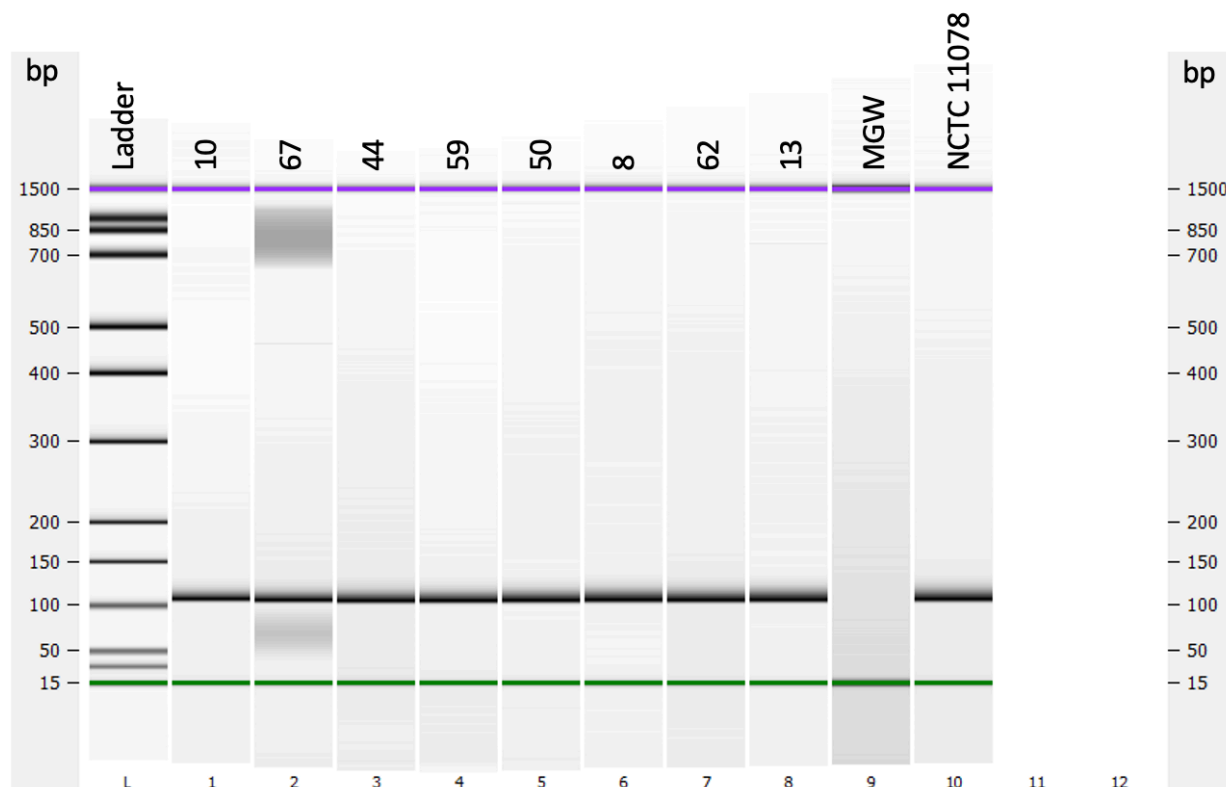
Tabell 19: Oversikt over de 30 *bac*-gen negative stammene og tilhørende prøvenummer.

Nr	Fryseposisjon	Kapsel-polysakkarid	Alp-gen	Konvensjonell PCR <i>bac</i> -genet	Real-time PCR <i>bac</i> -genet
74	GBS 2021 05 slot F3	VIII	alp2/3	neg	neg
100	GBS 2021 05 slot H9	NT	epsilon	neg	neg
28	GBS 2021 06 slot D4	VIII	alp2/3	neg	neg
80	GBS 2021 07 slot I9	Ia	epsilon	neg	neg
49	GBS 2022 01 slot A1	IV	alp2/3	neg	neg
42	GBS 2022 01 slot A2	III	rib	neg	neg
31	GBS 2022 01 slot A3	III	rib	neg	neg
33	GBS 2022 01 slot A4	Ia	bca	neg	neg
18	GBS 2022 01 slot A5	II	epsilon	neg	neg
88	GBS 2022 01 slot A6	Ia	rib	neg	neg
85	GBS 2022 01 slot A7	III	rib	neg	neg
27	GBS 2022 01 slot A8	V	alp2/3	neg	neg
43	GBS 2022 01 slot A9	V	alp 2/3	neg	neg
92	GBS 2022 01 slot B3	III	rib	neg	neg
71	GBS 2022 01 slot B5	Ia	epsilon	neg	neg
60	GBS 2022 01 slot B6	II	epsilon	neg	neg
30	GBS 2022 01 slot B7	V	neg	neg	neg
87	GBS 2022 01 slot B8	Ia	bca	neg	neg
58	GBS 2022 01 slot B9	V	epsilon	neg	neg
55	GBS 2022 01 slot C1	III	rib	neg	neg
75	GBS 2022 01 slot C2	V	alp2/3	neg	neg
94	GBS 2022 01 slot C3	Ia	rib	neg	neg
79	GBS 2022 01 slot C4	III	rib	neg	neg
66	GBS 2022 01 slot C5	Ia	epsilon	neg	neg
98	GBS 2022 01 slot C6	IV	epsilon	neg	neg
97	GBS 2022 01 slot C7	VI	bca	neg	neg
12	GBS 2022 01 slot C8	IV	epsilon	neg	neg
26	GBS 2022 01 slot D1	IV	epsilon	neg	neg
29	GBS 2022 01 slot E1	Ib	alp2/3	neg	neg
11	GBS 2022 01 slot E5	Ib	alp2/3	neg	neg

Tabell 20: Oversikt over de 30 bac-gen positive stammene og tilhørende prøvenummer.

Nr	Fryseposisjon	Kapsel-polysakkarid	Alp-gen	Konvensjonell PCR bac-genet	Real-time PCR bac-genet	Ct-verdi
81	GBS 2021 03 slot I7	V	bca	pos	pos	19,958
10	GBS 2021 05 slot A4	IX	bca	pos	pos	19,183
67	GBS 2021 05 slot C4	Ib	rib	pos	pos	19,699
44	GBS 2021 05 slot C8	V	rib	pos	pos	22,051
59	GBS 2021 05 slot G7	V	alp2/3	pos	pos	19,343
57	GBS 2021 05 slot G8	Ib	bca	pos	pos	19,648
20	GBS 2021 05 slot H2	Ib	bca	pos	pos	10,039
50	GBS 2021 05 slot H7	II	bca	pos	pos	20,074
8	GBS 2021 05 slot I4	IX	bca	pos	pos	20,239
62	GBS 2021 05 slot I6	Ib	bca	pos	pos	19,264
13	GBS 2021 06 slot A4	II	bca	pos	pos	19,405
69	GBS 2021 06 slot B7	II	bca	pos	pos	20,002
86	GBS 2021 06 slot C4	Ib	bca	pos	pos	18,726
52	GBS 2021 06 slot D5	II	bca	pos	pos	21,243
96	GBS 2021 06 slot D7	II	bca	pos	pos	19,557
47	GBS 2021 06 slot E3	Ib	bca	pos	pos	20,630
68	GBS 2021 06 slot E7	IX	bca	pos	pos	23,102
77	GBS 2021 06 slot E8	Ib	bca	pos	pos	20,283
3	GBS 2021 06 slot F5	II	bca	pos	pos	18,789
5	GBS 2021 06 slot F7	II	bca	pos	pos	19,968
34	GBS 2021 06 slot G4	II	bca	pos	pos	19,283
56	GBS 2021 06 slot G7	II	bca	pos	pos	19,336
51	GBS 2021 06 slot G8	Ib	bca	pos	pos	20,190
22	GBS 2021 06 slot H1	II	bca	pos	pos	19,800
40	GBS 2021 06 slot I1	II	bca	pos	pos	19,994
36	GBS 2021 07 slot A1	Ib	bca	pos	pos	21,344
17	GBS 2021 07 slot B2	V	alp2/3	pos	pos	19,539
73	GBS 2021 07 slot B3	II	bca	pos	pos	18,966
90	GBS 2021 07 slot B5	II	bca	pos	pos	20,210
7	GBS 2021 07 slot B8	IX	bca	pos	pos	21,492

Vedlegg 14 Sekvensering



Figur 25: Resultat DNA LabChip fra PCR-produktet fra real-time PCR med reaksjonsmix uten bac-probe. Åtte utvalgte stammer som var positive for bac-gen og NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering har fått et bånd på omtrent 112 basepar. Negativ kontroll (MGW) ble negativ da det ikke ble dannet noen bånd.

På QuantStudio 5 ble det ikke noen Ct-verdier for real-time PCR med reaksjonsmix uten bac-probe. Ut ifra resultatet på DNA LabChip analysert på 2100 Bioanalyser i figur 25 vises det likevel at DNA har blitt kopiert opp, da hver av de åtte utvalgte stammene og NCTC 11078 ekstrahert ved kokelysering har fått et bånd på omtrent 112 basepar sammenlignet med ladder.

