HØGSKOLEN I ÅLESUND

Aalesund University College

Bacheloroppgave

BI301305 Bacheloroppgave

Prevalens av Borrelia burgdorferi sensu lato i flått

Kandidatnummer: 1 og 11

Totalt antall sider inkludert forsiden: 76

Innlevert Ålesund, 29/05/2015

HØGSKOLEN I ÅLESUND

Aalesund University College

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

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

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	**Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.**	☒
2.	**Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen:** • ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands. • ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt. • ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt. • har alle referansene oppgitt i litteraturlisten. • ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	☒
3.	**Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å betrakte som fusk og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen §§30 og 31.**	☒
4.	**Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver**	☒
5.	**Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter høgskolens studieforskrift §30**	☒
6.	**Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider**	☒

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veileder: Ann-Kristin Tveten, Gro Hagen og Sahar Olsen

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten (Åndsverkloven §2).
Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage HiÅ med forfatter(ne)s godkjennelse.
Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved Høgskolen i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering: ☒ja ☐nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)? ☐ja ☒nei
(Båndleggingsavtale må fylles ut)
- Hvis ja:
Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over? ☐ja ☐nei

Er oppgaven unntatt offentlighet? ☐ja ☒nei
(inneholder taushetsbelagt informasjon. Jfr. Offl. §13/Fvl. §13)

Dato: 29/05/2015

Forord

Denne bacheloroppgaven er utført av to bioingeniørstudenter ved Høgskolen i Ålesund. Tidsrammen for denne oppgaven lå på litt over to måneder. I denne oppgaven skal vi undersøke prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i en flåttepopulasjon. Oppgaven er vårt avsluttende arbeid for bioingeniørstudiet. Opprinnelig skulle vi egentlig utføre en annen oppgave, men da den ikke ble noe av fikk vi tilbud om denne oppgaven. Vi valgte å gå videre med denne oppgaven fordi det virket som at arbeidet ville være svært lærerikt.

Vi vil benytte denne mulighete til å takke Ann-Kristin Tveten for å ha veiledet oss gjennom denne oppgaven. Hun har hjelpet til med å finne litteratur og har vært tilgjengelig på alle døgnets tider for å svare på spørsmål. Videre har hun bidratt med gode råd. Flåtten som har blitt brukt i oppgaven er rester fra arbeidet som lå bak hennes doktoravhandling. Det ville ikke vært mulig å gjennomføre denne oppgaven uten hennes hjelp og utstyret hun hadde til overs.

Gro Hagen for å ha støttet oss med det praktiske arbeidet, og sett til at arbeidsmetodene har blitt gjennomført på en korrekt måte.

Sahar Olsen, for hennes vilje til å gi gode råd og veilede oss gjennom den krevende skriveprosessen.

Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven er å undersøke prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i vertssøkende flått. Prevalensen blir undersøkt for månedene utenfor høysesongen.

DNA ble isolert fra overflaterenset flått, ved hjelp Dneasy blood & tissue kit.
Borrelia burgdorferi sensu lato DNA ble isolert ved amplifisering av genet nifS (BB084) med PCR.
Resultatene av PCR-produktene ble visualisert ved bruk av gelelektroforese. Positive resultater ble bekreftet ved å sammenligne med positiv kontroll.

Vi forventet at få flått ville gi positivt utslag, på grunn av at flåtten er mindre aktiv utenfor høysesongen. Åtte av 718 flått benyttet i denne oppgaven, ble bekreftet som positive for *Borrelia burgdorferi sensu lato*.
Det gir en prevalens på 1,11%, noe som er mindre enn prevalensen funnet i tidligere studier.

Innhold

1 Innledning **2**
1.1 Problemstilling 3
2 Teori og prinsipp **4**
2.1 Flått 4
2.2 Borrelia burgdorferi sensu lato 6
2.3 PCR 8
2.4 Touchdown PCR 10
2.5 Gelelektroforese 11
3 Materiale og metode **14**
3.1 Utstyr 14
3.1.1 Isolering av DNA fra Ixodes ricinus flått 14
3.1.2 Isolering av DNA fra dyrket renkultur *Borrelia burgdorferi sensu lato* 15
3.1.3 PCR 16
3.1.4 Gelelektroforese 16
3.2 Utføring 16
3.2.1 Isolering av DNA fra Ixodes ricinus flått 16
3.2.2 Isolering av DNA fra dyrket renkultur Borrelia burgdorferi sensu lato 20
3.2.3 PCR 21
3.2.4 Gelelektroforese 22
4 Resultat **25**
5 Diskusjon **29**
6 Konklusjon **33**
6.1 Forslag til videre forskning 33

1 Innledning

Vi har valgt å sette opp denne problemstillingen fordi det var aktuelt å undersøke og det fantes ikke mye forskning på dette. Vi ville ha mer innsikt i hvor mye prevalens det er av *Borrelia burgdorferi sensu lato* hos vertssøkende flått utenom høysesongen.
Denne oppgaven ble valgt fordi det virket det som at denne oppgaven kunne by på mye interessant arbeid. Formålet med oppgaven er å besvare problemstillingen ved å diskutere resultatene og sammenligne de med resultater fra tidligere forsøk.

Vi begynte å jobbe med oppgaven 16. Mars 2015 og innleveringsfristen var satt til 29. mai. De første to uke gikk med til å planlegge arbeidet. Mesteparten av teorien var ferdiskrevet i påsken, før vi begynte med den praktiske delen av oppgaven. Den første mai hadde laboratoriearbeidet blitt fullført. Tiden frem mot innleveringsfristen ble brukt til å skrive ferdig resten av oppgaven. Alt det nødvendige materialet lå tilgjengelig, da det var igjen fra tidligere forsøk. Derfor var det ikke nødvendig å kjøpe inn utstyr eller reagenser.

Borrelia burgdorferi sensu lato er en sykdomsfremkallende bakterie som bruker flåttarten *Ixodes ricinus* som vertsorganisme. Eksperimentelle forsøk blir brukt for å påvise prevalens av bakterien i et stort utvalg vertssøkende flått. Flåtten har blitt samlet inn over tre år, i vår- og høstmånedene. Innsamlingen ble gjort i naturområdet; Engesetdalen, Skodje kommune. Innsamlingsmetoden, som ble tatt i bruk i forbindelse med et forskningsprosjekt, gikk ut på å trekke ett hvitt flanellhåndkle gjennom vegetasjon i naturen. Flåtten som ble samlet inn ble ført over på samlebrett, i oppbevaringsbrønner, og fryst ned. For å hindre flukt fra brønnene, har det vært nødvendig å isolere flåtten. Dette ble gjort ved å trekke en forsegling over oppbevaringsbrønnene. Vi mottok i alt 8 samlebrett, for flått, der hvert brett inneholdt 96 brønner.

Hensikten med de forsøkene som ble gjennomført har vært å undersøke prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i *Ixodes ricinus* flått. Flåtten vi ble tildelt var hovedsakelig nymfer. For å påvise prevalens av flåttbårne vektorer så er det nødvendig at genmateriale fra vektorene ekstraheres fra flåtten. Total genomisk DNA fra vertsorganismen samt DNA fra vektorer som sopp og bakterier ekstraheres ved å følge prosedyren; ”DNA isolering fra Ixode ricinus flått”. Quiagen’s DNeasy Blood & Tissue Ferdig kit ble brukt til å isolere DNA fra prøvene.

PCR ble brukt som metode for å amplifisere DNA til *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Til påvisning av *Borrelia burgdorferi sensu lato* amplifiseres genet; nifS (BB084). Programinnstillingen som heter Touchdown PCR ble brukt for å kopiere DNA. Resultatene fra PCR ble påvist av Gel elektroforese.

I teoridelen har vi forsøkt å klargjøre en teoretisk plattform. Relevant informasjon om *Ixodes ricinus* og dens rolle som patogen vektor for sykdomsfremkallende mikroorganismer har blitt klarert. Det har blitt satt fokus på *Borrelia burgdorferi sensu lato*, siden det er denne mikroorganismen vi ønsker å påvise. Teorien som er aktuelt for de forskjellige metodene vi har jobbet med har blitt avgrenset, på grunn av den omfattende litteraturen om disse metodene. Under materiale og metode har vi forsøkt å beskrive fremgangsmåten så tydelig at forsøket kan gjentas, av noen som har grunnleggende kunnskaper, innenfor metodikken. Resultatene gir en oversikt over hvilke flått som har blitt identifisert som bærer av *Borrelia burgdorferi sensu lato.* Diskusjonen tar for seg resultatene og setter disse inn i sammenheng med tidligere forskning som har blitt gjort på dette området.

1.1 Problemstilling

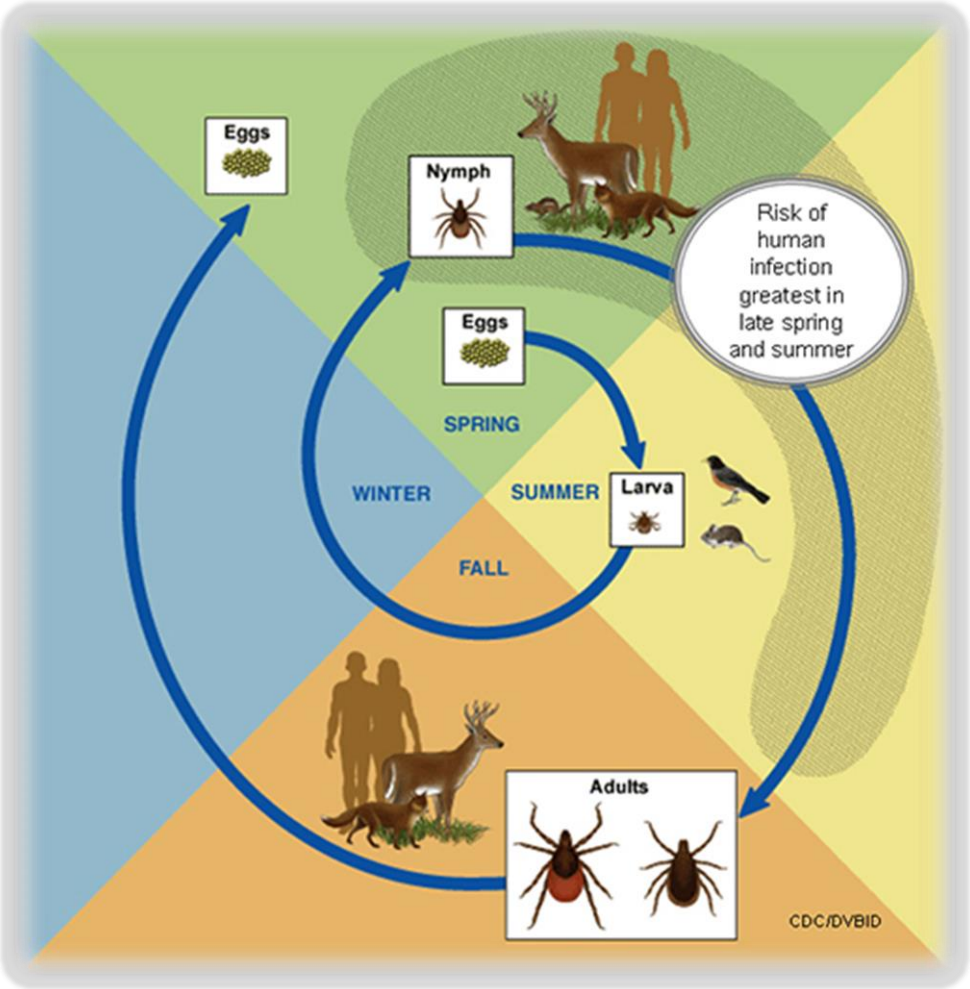
Finne prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i vertssøkende flått som har blitt samlet inn i Møre og Romdal utenfor høysesongen.

2 Teori og prinsipp

2.1 Flått

Bilde 1. Flåttarten Ixodes ricinus sitter på vegetasjon og venter på en vert.[1]

Flått klassifiseres som arachnida, og er små blodsugende midd. Livssyklusen til *Ixodes ricinus*, skogflåtten, har fire stadier; egg, larve, nymfe og voksen.[5] For å gjennomføre sin livssyklus må flåtten vokse, og til dette trenger flåtten næringsstoffer som hentes i fra vertsblod. Larven ernærer seg på verten i to til seks dager, nymfer i tre til åtte dager og voksne flått i seks til tolv dager.[6] Fugler og pattedyr er vanlige vertsdyr for skogflåtten.[51] Mange flått vil dø før de i det hele tatt finner en vert å ernære seg fra. Livssyklusen til en flått vil kunne vare fra to til seks år. [2] [3]



Bilde 2. Oversikt over livssyklus til flått som viser hvilke verter som benyttes under de forskjellige stadiene.[4]

Flåtten virker som vektor for ulike patogene mikroorganismer som virus, sopp og bakterier.[7] Disse kan overføres til vertsdyr når flåtten fester seg på verten. For å finne en vert, bruker flåtten sine sanser til å registrere endringer i miljøet.[5] Den detekterer pust og kroppslukt, i tillegg til at forskjeller i karbondioksid, kroppstemperatur, fuktighet og vibrasjoner blir oppfattet. De kan oppdage disse forskjellene ved hjelp av et sanseorgan som kalles Hallers organ.[5] Fuktige miljø er å foretrekke ettersom at den tørker fort ut. Vegetasjon som har trafikkerte omgivelser regnes som steder der flått trives. Flåtten klatrer til toppen av vegetasjon, der de holder seg fast med bakføttene, slik at de kan stikke ut framføttene.[5] Dermed er den klar til å klatre over på passerende dyr. Når flåtten finner en vert, så klatrer den over, og fester seg på overflaten til verten. Når flåtten har funnet et sted der huden er tynn nok til å bli penetrert, griper den tak i huden, biter seg fast, og fører materøret inn i underhuden.

En god sikring til verten er nødvendig for at flåtten skal fullføre måltidet sitt. En flått vil skille ut en substans fra spyttkjertlene sine som virker som sement, ved at den legger seg rundt matrøret som dermed støpes fast.[6] Matrøret kan også ha brodder som ankrer flåtten fast i huden.[6] For at verten ikke skal bli irritert til å fjerne flåtten, skiller den ut lokalbedøvende stoffer, samtidig med at matrøret borres inn i huden.[6] Flåtten vil bruke flere dager på å hente ut blod fra verten. Når de har fullført måltidet sitt, løsner flåtten fra verten og gjør seg klar for neste del av livssyklusen. Om verten er bærer av patogene mikroorganismer så tas disse opp av flåtten gjennom blodmåltidet. Hvis tilfellet er at flåtten er smittebærer så kan den smitte verten gjennom spytt som skilles ut.[7] Det finnes over 800 flåttarter i verden, men av dem er det bare to som overfører sykdom til mennesker.[7] Disse er; Ixodidae (Hard flått) og Argasidae (myk flått). De fleste flåttbitt vil dermed ikke tilføre verten sykdomsfremkallende mikroorganismer.
Dette prosjektet tar for seg arten Ixodes ricinus. Arten er kjent for å overføre flere forskjellige patogene mikroorganismer. Noen av disse er; *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Babesia divergens* og *Babesia microti*.[5,51]

2.2 Borrelia burgdorferi sensu lato

Klassifiseres som en spiroket, en gram negativ bakterie som forårsaker sykdommen borreliose.[8] Mennesker blir smittet med bakterien ved å få den tilført gjennom et flåttbitt. *Borrelia burgdorferi sensu lato* omfatter rundt 15 genospecies på verdensbasis og av de er det bare fem som er patogene for mennesker.[9]
Nymfene fører til 90% av de kliniske tilfellene av lyme borreliose.[10] Dette er svært problematisk ettersom 64% av europeiske pasienter ikke husker å ha blitt bitt.[10] Problemet blir da at de tidlige symptomene kan bli ignorert. De mest vanlige symptomene til lyme borreliose er feber, hodepine, slapphet, muskelsmerter, influensalignende tilstander og erythema migrans.[11], [21] Sykdomsutviklingen til lyme borreliose er delt opp i tre stadier.[10]

Primærstadiet kjennetegnes ved det tidlige symptomet; erythema migrans, som er et utslett som oppstår 3-30 dager etter bitt.[12],[13],[8] Gjennomsnittelig oppstår utslettet syv dager etter pasienten blir bitt[10], og hvis det forblir ubehandlet kan det vedvare opptil 2-3 uker.[10] I mange tilfeller vil ikke utslettet oppstå i de tidlige stadiene etter infeksjon.[12]

Influensalignende symptomer vil også gi indikasjoner på at en infeksjon har opptred i det første stadiet.[14] Utslettet kan forårsakes av alle de patogene genospecies. Det er typisk at utslettet primært oppstår der hvor flåtten biter seg fast.[12] Siden flåtten liker å oppholde seg i et fuktig miljø, setter den seg ofte på kroppsområder som vanligvis ikke betraktes av individer.[51] Eksempler på slike områder er lysken, armhulen og knehasen.[51]

Bilde 3. Illustrasjon av Erythema migrans[15]

B. Afzelii, *B. Garinii* og *B. Burgdoferi sensu stricto* er de mest vanlige patogeniske subspecies som fører til sykdom i Norge[16], og ellers i Europa.[17],[18] *B.afzelii* har hovedsaklig gnagere som smittebærer, og *B.garinii* har fugler og gnagere som smittebærere.[8] [19] De er koblet til komplikasjoner i huden og i nervesystemet.[17] *Borrelia burgdorferi sensu stricto* blir også hodedsakelig funnet i gnagere.[19] Den er knyttet til komplikasjoner i ledd og i nervesystemet.[17] [8]

Hvis de første symptomene på sykdommen ikke blir oppdaget, og en ikke får behandling, vil bakteriene kunne spre seg utover i kroppen.[12] Dette er sykdommens andre stadium.[8] Bakterien vil i infisere organer og vev, ved at de etablerer seg der. Om bakteriene infiserer nervesystemet kan det forekomme nevroborreliose som kan medføre bell´s palsy, en midlertidig lammelse av den ene siden av ansiktet.[20, 12] Nevroborreliose vil kunne oppstå hvis nerven som styrer musklene i ansiktet hovner opp eller blir betent.[20] Denne tilstanden kalles nevropati. Andre nevrologiske symptomer som syklige tilstander i lever og hjerte i tillegg til leddbetennelse, utmattelse og nedsatt almenntilstand kan også oppstå i dette stadiet.[21], [14], [12]

Om infeksjonen har forblitt ubehandlet over en periode på måneder eller år kan den komme inn i tredje stadium.[8] Dette stadiet kjennetegnes som en kronisk sykdom, og oppstår vanligvis seks-tolv måneder etter infeksjon.[8],[10] Symptomer på dette stadiet er leddgikt, numne ekstremiteter og rygg, trøtthet, hemifaciale spasmer, perikarditt, nevrologiske problemer som søvnløshet, humørsvingninger, hukommelsestap og tale.[21] Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) er en hudsykdom som misfarger huden blåaktig i de ytre ekstremitetene.[8] Den vil ofte oppstå i det tredje stadiet av en *Borrelia burgdorferi sensu lato* infeksjon.[8] Leddgikten viser seg ofte å angripe kneet.[10]
Om infeksjonen ikke behandles kan den spre seg fra bittstedet til andre steder på kroppen som for eksempel ledd, hjertet og nervesystemet. Det viktigste preventive virkemiddelet er rask fjerning av flåtten, når den først oppdages.[51] Faren for *Borrelia burgdorferi sensu lato* smitte øker over tid, og smittefaren viser seg å være mer begrenset innenfor de første 24 timene etter bitt.[51] Dette skyldes at smitterisikoen øker jo lengre flåtten får sitte fast på kroppen. Flåtten burde fjernes så nærme huden som mulig.[51] Antibiotika profylakse eller peroral administrasjon brukes for å behandle en pågående *Borrelia burgdorferi sensu lato* infeksjon.[8]

2.3 PCR

Polymerase chain reaction (PCR) amplifiserer DNA in vitro og er en metode som gir raske, selektive resultater.[22] I løpet av kort tid kan teknikken lage milliarder av DNA-kopier.[23] Prosessen bruker en tre-stegs syklus for å kopiere en eksponentsial økende populasjon av DNA-molekyler som er identiske.[23] Syklusen begynner med at DNA-trådene denatureres.[22] Prøven kjøles ned sånn at korte templat (enkelt-tråd DNA) som er komplementære til sekvensen på forward- og reverse primer har et optimalisert miljø for annealing (hydrogen-binding).[23] [22]

Tilfeldig, ukontrollert reproduksjon av uønskede deler av DNA i prøven kan forhindres ved å tilsette primere til reaksjonen. Forward- og revers primer binder seg til komplementære seter på hver sin templattråd på enkelttrådet DNA. 5’ enden til primeren setter seg på 3’ enden til DNA-templat.[23], [27] Taq Polymerase vil da kopiere DNA fra 5’ til 3’ retning.[27] Dette amplifiserer DNA in vitro.[23]

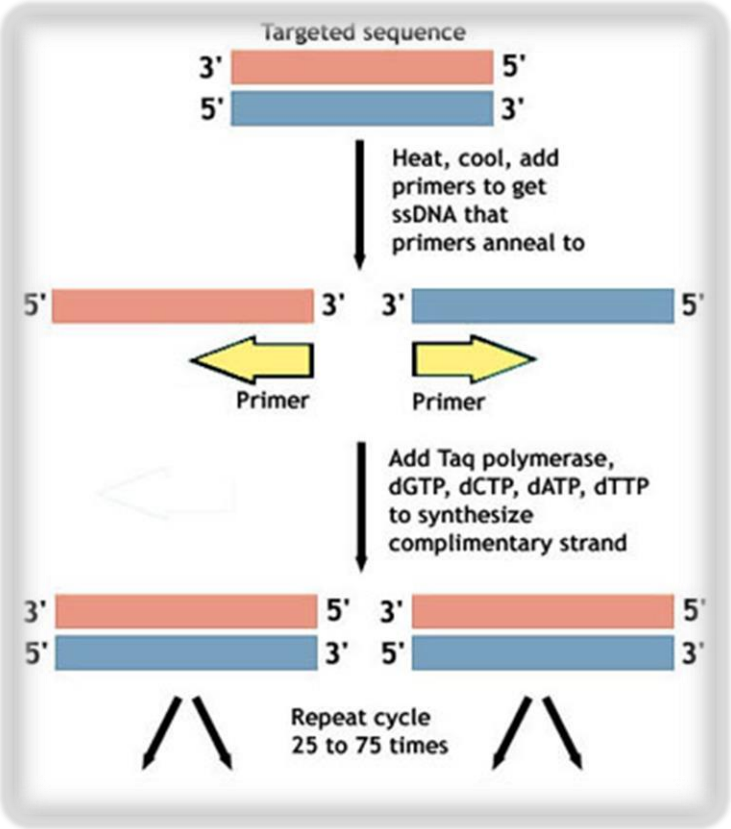
Primerne forteller DNA polymerasen nøyaktig hvilken sekvens av DNA som skal amplifiseres.[25] Ved konvensjonell PCR er disse sekvensene vanligvis noen hundre basepar

lange, og i qPCR er de bare noen titalls.[28] Til slutt vil Taq polymerase forlenge primerne i 5´ til 3´ retning.[23] DNA polymerase fortsetter å kopiere amplicon, helt frem til mastermix går tom for DNA templat.[28] Taq polymerase har en optimumtemperatur på 75 °C og tåler temperaturer opp mot 95 °C.[24] Det termofile enzymet, til sammenlikning med andre polymerase enzym, krever kationer til å stimulere deres katalytiske aktivitet.[24]

Amplifiseringen av DNA kontrolleres ved at temperaturen heves og synkes i et bestemt mønster.[25] Dette er grunnen til at PCR apparater kalles thermal cyclers eller PCR cyclers.[26]

Taq polymerase muliggjør automatiseringen av PCR, på grunn av enzymet sin motstandsdyktighet mot de høye temperaturene som er nødvendig for å denaturere DNA-et.[27] [22] Dersom et vanlig polymerase med optimum temperatur ved human fysiologisk kroppstemperatur ble brukt, så vil proteinet denatureres samtidig med DNA under det første oppvarmingssteget.[27] [22] Taq polymerase har navnet sitt fra organismen som det først ble isolert fra; bakterien *Thermus aquaticus*.[28] Denne bakterien lever i varme kilder, og har gjennom millioner av år med evolusjon medført et varmestabilt DNA polymerase.[23] [22]

Siden primere er spesifikke for målsekvenser på DNA så trenger det bare å være små mengder av komplementære DNA-molekyler i prøven, for å utføre hybridiseringen til målsekvensen.[29] Når primerene har 15 eller flere nukleotider så regnes spesifisiteten som høy. En syklus i PCR-maskinen dobler antall målsekvens som betyr at antall molekyler dannet er lik 2^n, der n er antall sykluser.[25], [29], [28] Etter 33 sykluser i PCR-maskinen, vil over en milliard molekyler (10^9) som er identisk med målsekvensen ha blitt kopiert.[25]



Bilde 4. Illustrasjon av PCR prosessen [30]

2.4 Touchdown PCR

Touchdown PCR bruker et syklusprogram som varierer hybridiseringstemperaturen.[34], [33]

Denne metoden brukes for å øke spesifisiteten til PCR.[33], [31] TM er temperaturen der dobbelttrådet DNA denatureres og deler seg i to tråder.[31] Vanligvis bestemmes optimal hybridiseringstemperaturen ut ifra TM til primer-templat paret.TM til primer påvirkes av forskjellige buffer komponenter i tillegg til primer- og templat konsentrasjon.[34] På grunn av dette er beregnet TM bare en tilnærming, noe som gjør det vanskelig å finne riktig hybridiseringstemperatur for en gitt primer-templat kombinasjon. [34]

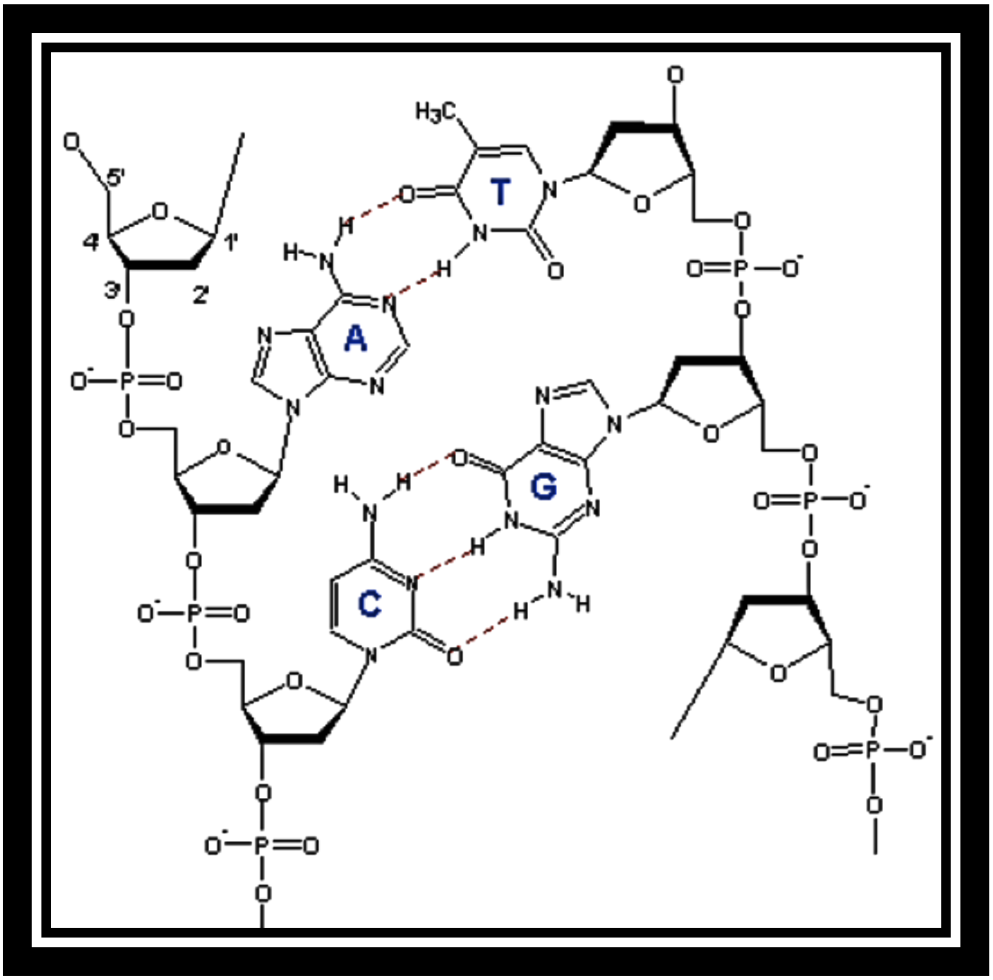
Det kan dannes primer-dimer, samt uspesifikke produkter om hybridiseringstemperaturen er for lav.[31] [34] Hvis temperaturene er for høye kan det gi dårlig primer hybridisering som i sin tur kan føre til lav avkastning.[34]

Ved høyere temperaturer enn det som er beregnet for TM i de tidlige syklusene, favoriserer Touchdown PCR opphoping av ampliconer, der komplementariteten for primer-templat er

høyest.[34] Produktet av amplifikasjon kalles et amplicon.[32] Vi sikrer oss mot lav avkastning ved hjelp av den trinnvise overgangen til lavere temperaturer.[34] Ampliconet som utkonkurrerer tilstedeværende, uspesifikke produkter og primer-dimerer, tas i bruk.[34] Hybridiseringstemperaturen skal helst være fem-ti °C høyere enn TM for primerene.[33 35] Temperaturen går ned en til to °C hver syklus til den kommer til eller litt under TM til primerene.[33 34] Dette kalles touchdown temperatur. Etter dette følger vanlig PCR amplifisering ved den endelige hybridiseringstemperaturen.[33 34]

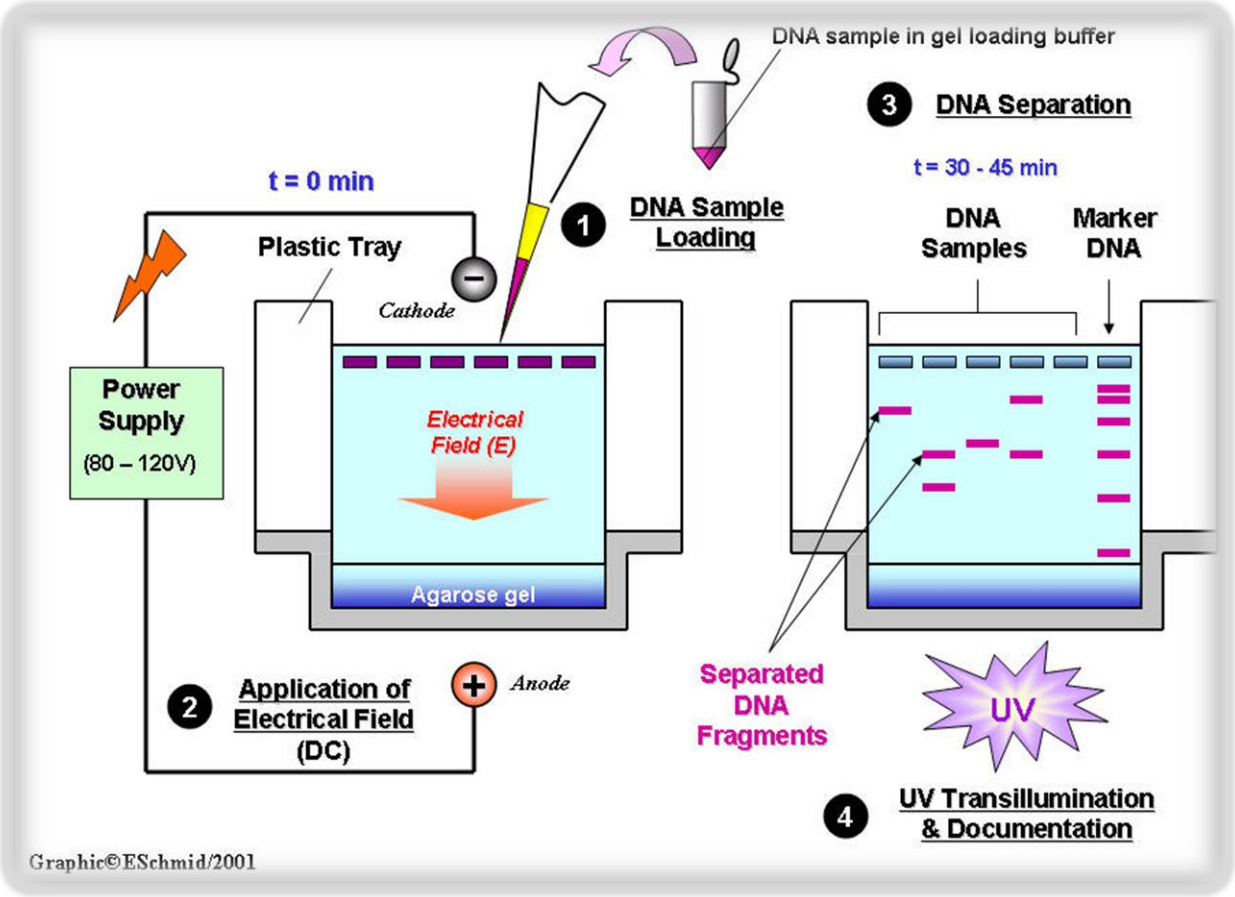
2.5 Gelelektroforese

DNA og RNA består av nukleinsyrer som holdes sammen av pentosesukker og fosfat.[35] Fosfatgruppene i hvert nukleotid gir DNA en negativ ladning, i en fysiologisk pH.[36] Coulombs lov sier at negativt ladede molekyler (kationer) tiltrekkes mot en positivt elektrisk ladning (anoden).[37] Gel elektroforese er en metode som bruker dette prinsippet til å separere DNA-molekyler av forskjellig lengde, i en prøve.[36 38] Metoden kan også brukes til å bestemme størrelsen på proteiner, ved å måle lengdene opp mot en standard.[38] Elektroforese går ut på å sende en elektrisk strøm gjennom DNA prøven, og la den vandre gjennom et porøst medium.[36] Vandrelengden til DNA-molekylene bestemmes ut i fra deres lengde og ladning.[36 40 38] De minste molekylene vil møte på minst motstand i det porøse mediet, og dermed vandre raskere enn de større molekylene.[36 38]



Bilde 5. DNA-molekyl vist med ladninger.[39]

Det første steget i en gel elektroforese er å støpe gelen. Dette gjøres ved å løse opp pulverisert agarose i 1x TAE buffer, ved å blande miksturen. Blandingen varmes opp i mikrobølgeovn til agarose er oppløst. Neste steg består av å tilsette mikroskopiske mengder 10000x GelRed. Gelen er kokvarm etter å ha blitt varmet opp i mikrobølgeovnen. For at blandingen ikke skal smelte gel-karene så venter man til den når en temperatur på 65 ºC. Optimum temperatur for gelen å helles over i gelkar. Det er viktig å følge godt med på temperaturen under dette stadiet, da blandingen fort begynner å stivne ved lavere temperaturer enn dette. En fare med gel med lavere temperatur enn 65 ºC er at den kan delvis stivne før helling. Skjer dette så vil den ikke fordele seg jevnt i gelkaret. Brønner settes til gel-karet som DNA ellueres i. Etter gelen har stivnet kan gelkaret settes i elektroforesekaret. Elektroforesekaret har en positiv og en negativ pol som kobles til en spenningskilde.[40] 1x ATL-buffer tilføres elektroforesekaret som strømmen føres gjennom. Strømmen er det som får DNA-molekylene til å begynne å vandre gjennom gelen når spenningskilden skrus på. [40]



Bilde 6. Illustrasjon av Gelelektroforese[41]

Fremføring: Ved hjelp av loading dye kan man se hvor langt DNA molekylene har vandret i gelen.[38] Når de har vandret så langt de skal fjernes de fra elektroforesekaret og overføres til ett kammer med UV-lys og kamera. Fargingen blir gjort ved at Gelred, som tilsettes gelen og binder seg mellom basene i DNA. Det kan også brukes et fargestoff som heter ethidium bromid. Denne fargingen gjør at DNA blir synlig under UV-lyset slik at vi kan ta bilde av den.[38] Det er viktig være klar over at DNA vil diffundere i gelen over tid, så man bør ikke vente lenge før en tar bilde. Når bildet er tatt kan resultatene sammenlignes med en ladder eller en kontroll.[38] Utifra det kommer det frem om prøvene er positive eller ikke.[42]

3 Material og metode

En metode for å samle inn flått består av å dra et hvitt flanellhåndkle gjennom vegetasjon. Tøystykket kan også fange opp flått ved at man drar det gjennom busker og høygress. Vibrasjonen som håndkle skaper når det dras gjennom vegetasjonen, tiltrekker flåtten som benytter sjansen den får til å gripe tak i det den tror er en potensiell vert. Tanken som ligger bak det å bruke et hvitt tøystykke til å fange flått, er at det blir enklere å oppdage flått som har festet seg. Ved å dra tøystykket gjennom et begrenset område, kan man lage et estimat på hvor mye flått som finnes i området der man leter, basert på resultatene. Flåtten blir lagret på eppendorf-rør ved enten fire°C i en til to dager eller 20°C i en til to uker. Flåtten blir så vasket i 96% etanol og nukleasefritt vann. Mikroorganismer som sitter på overflaten til flåtten vil reduseres betydelig etter rengjøringen.

3.1 Utstyr

3.1.1 Isolering av DNA fra Ixodes ricinus flått

Multipipette – En pipette som har flere kanaler, noe som gjør det mulig å pipettere flere prøver samtidig. Den trenger passende kar for å kunne fylle alle pipettespissene samtidig.

Tissuelyser - Maskin som rister brett. Medfølger sikringbeholdere av metall som brukes for å sikre at brettene holdes skikkelig fast, samt kan de skrues fast i tissuelyser slik at alt holder seg på plass.

Sentrifuge - spesialsentrifuge som sentrifugerer to brett i gangen. Det ble benyttet en hastighet på 3500 RPM ved hver sentrifugering.

Automatpipette - pipette som fyller spissen og gir ut en bestemt mengde ved hvert trykk. Kan bruke forskjellige spisser, noe som endrer på hvor mye som gis ut hver gang en trykker.

Plastkar - Bruktes til å samle diverse stoffer vi skulle pipettere med multipipette.

Kolonne - Brukes for å filtrere ut ting vi ikke vil ha med i PCR brett.

Samlebrett - Samler opp avfall fra kolonnene.

PCR brett - Samler opp isolert DNA fra kolonne under sentrifugering.

Varmeskap - Brukes for å inkubere prøvene. I dette forsøket brukte vi dem ved 56°C og 70°C.

Kulefordeler – Kan brukes for å tilsette kuler til alle 96 brønnene på en gang.

Stålkuler - Brukes for pulveriser flåttprøvene.

Gummitopper – Sørger for at prøvene holder seg i brønnene. Hindrer kontaminering til en viss grad.

ATL Buffer - En tissue lysis buffer til bruk ved rensing av nukleinsyrer.[43]

Proteinase K – Endopeptidase. Bryter ned proteiner ved å spalte peptidbindinger.[44 47]

AL buffer - lyserende buffer brukt ved DNA isolering. [45 47]

Etanol - Får DNA til å felle ut slik det ikke går gjennom kolonnen.[46 47]

Buffer AW1 og AW2- vaskeløsning som rengjør DNA som sitter på membran i kolonne.[47] Går så gjennom kolonnen og ut i samlebrett som avfall.

AE buffer - Eluerer DNA fra membranet i kolonnen. Gjør det mulig at DNA kan lagres stabilt i fryser eller kjøleskap.[47]

3.1.2 Isolering av DNA fra dyrket renkultur *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Eppendorf-rør
Bordsentrifuge
ATL buffer
Proteinase K
AL Buffer
Vortex
Varmeplate med justerbar temperatur
Etanol
Dneasy Spin column
2ml oppsamlingsrør.
Pipette
Pipettespisser

AE buffer

3.1.3 PCR

Ferdigisolert DNA på brett.

PCR plater.

Strips til PCR plater

Strips med rør til PCR.

Mastermix: Polymerase, fw primer, rw primer, mgcl2, nukleasefritt vann.

Eppendorf rør.

Vortex

Sentrifuge

PCR maskin

3.1.4 Gelelektroforese

Loading Dye

Gelkar

elektroforesekar

UV kamera

GelRed

Agarose

Erlenmeyer kolbe

1x TAE Buffer

3.2 Utføring

3.2.1 Isolering av DNA fra Ixodes ricinus flått

Analyseprinsippet for prosedyren tar for seg fire steg; Lysering, Binding, Vask og eluering av DNA. Hensikten med denne metoden er å isolere rent DNA fra flåtten. Vi har tatt utgangspunkt i metoden som er beskrevet i Vedlegg 2.

Det ble utdelt flåttprøver som ble samlet inn i Engesetdalen i Skodje kommune over en tidsperiode mellom 2011 og 2014.

De ble levert på åtte brett, hver med 96 brønner. Etter brettene hadde blitt telt over så ble det fastslått at ikke alle brønnene inneholdt flått. Gjennomgangen viste at samlebrettene inneholdt til sammen; 718 flått. Det var viktig å sørge for at hver brønn bare inneholdt en flått, da krysskontaminering lett kunne oppstå. Følgekort har blitt brukt til å notere de brønnene som manglet flått. Disse har blitt brukt til å fastslå at det ikke har oppstått kontaminering av brønnene, ved at ingen positive resultater har blitt registrert i de tomme brønnene.

Det er også viktig at flåttene holder seg i bunnen av brønnene, for at pulveriseringen og lyseringen av flåtten skulle foregå optimalt. Dette blir ikke gjort ordentlig hvis flåtter setter seg på siden av gummitoppen som lukker brønnen.

Lyseringen tar for seg Tissuelyser. Instrumentet vil ryste prøvene kraftig i fem minutter og pulverisere prøvematerialet ved hjelp av en stålkule som plasseres i hver brønn. Stålkulen for en stor slagkraft når den akselereres. Det er viktig at brønnene lukkes med gummitopper for å hindre at prøvematerialet forsvinner under rystingen. Et problem som kan oppstå er at prøvebrettene ikke passer skikkelig i sikringsbeholderen. Lokkene som sitter på oppbevaringsboksene for 10 xl (10µL) pipettespisser, kan brukes for å justere passformen, slik at prøvebrettene sitter bedre sikret.

I følge prosedyren skulle 100 µL ATL buffer tilsettes flåtten før oppbevaringsbrettene ble satt i Tissuelyser. Det viste seg at resultatet ble bedre når ATL buffer ble tilsatt brønnene, etter at flåtten hadde blitt satt i Tissuelyser. Den mekaniske nedbrytningen viste seg å pulverisere flåtten. Vår hypotese for å forklare at resultatet fra Tissuelyser ikke blir like tilfredsstillende når ATL buffer tilsettes først, er fordi bufferen skummer mye, under rysting. Kulene får altså mer motstand og hindres dermed i å komme opp i den hastigheten de får ved fravær av væske. Resultatet er at pulveriseringen blir mindre effektiv. Siden flåtten ble så godt pulverisert, var det bare nødvendig å knuse dem i tissuelyser én gang. Disse endringene ble gjort etter konsultasjon med veileder.

Etter flåtten hadde blitt pulverisert ble det tilsatt 180 µL ATL-buffer til brønnene, med multipipette. ATL buffer feller ut om den står i romtemperatur, så den måtte settes i varmeskap i noen minutter for at den skal løse seg opp. Tilfredsstillende blanding ble sikret med Vortex, før brettene ble sentrifugert i 10 min. På grunn av at toppene måtte

fjernes før tilsetning, så ble en rad pipettert av gangen. For å hindre krysskontaminering fra å skje mellom toppene og brønnene ble den ene siden av toppene merket med en strek. Streken markerte hvilken vei toppene skulle settes på igjen. Pipetteringen blir gjort betraktelig enklere ved at en person tar av toppene og en annen person pipetterer. Denne metoden minsker også sjansen for pipetteringsfeil og kontaminering.

20µL Proteinase K ble tilsatt hver brønn med en automatpipette, til dette ble det brukt 1,25 ml spiss. Automatpipetten ble programmert til å slippe ut et volum på 20 µL væske, for hvert trykk. Etter tilsetning ble brettene satt til inkubasjon ved 56°C i 30-50 minutter, slik at flåttbitene skulle løses opp ytterligere. I prosedyren sto det at brettene skulle inkuberes i 180 minutter. Etter diskusjon med veileder ble det fastslått at det ikke var nødvendig for brettene å stå så lenge, på grunn av den effektive knusingen. Brettene kunne for øvrig stå over natten om det skulle være nødvendig. Gummitoppene har en tendens til å sprette ut når brettene varmes opp, noe som kan forårsake kontaminasjon. Noe tungt ble plasser oppå brettene for å forhindre dette fra å skje.

Etter at prøvene hadde blitt hentet fra varmeskapet, ble 100µL AL-buffer tilsatt hver brønn. Den nye Blandingen ble vortexet og satt tilbake i varmeskap ved 70°C i ti minutter.

Etter inkubering ble 230 µL etanol tilsatt hver brønn, løsningen ble så blandet. Etanolen tilsettes prøvene slik at DNA feller ut. De går da ikke gjennom kolonnen. Her kan blandingen skje enten ved å utsette en og en rad for vortex, eller ved å sette hele brettet på vortex samtidig. Hvis hele brettet tas samtidig så er man nødt til å finne noe som holder på plass gummitoppene. Brukte lokk fra en pipette boks kan blant annet brukes hvis de er egnet for å holde på plass alle gummitoppene. Etter blanding kan gummitoppene kastes, da det ikke lenger er behov for dem.

Løsningen overføres fra oppbevaringsbrett til kolonnene som står på samlebrett. Samlebrettet brukes til å samle opp avfallsvæske som ikke skal med i PCR brettene. Det er veldig viktig å merke kolonner og PCR brett slik at de kan spores tilbake til oppbevaringsbrettet. Det kan være lurt å merke på de sidene som ikke teipes, da teipen kan fjerne merkingen.

Etter prøvene har blitt overført fra oppbevaringsbrett til kolonner, kan stålkulene fjernes fra brønnene. Stålkulene kan brukes igjen, etter vask med vann og sprit. Før hver sentrifugering blir brønnene, i kolonnen, dekket med papirfilm. Papirfilmen forhindrer

innholdet fra å forsvinne fra brønnene under sentrifugering. Sikringen forhindrer at innholdet i brønnene skal krysskontaminere de andre brønnene. Det ville også blitt et problem om innholdet ble spredt utover hele sentrifugen, da det kan kontaminere prøvene til alle som skal bruke den sentrifugen. For å holde kolonnen og samlebrettet skikkelig sammen, ble det brukt teip, slik at de ikke skulle løsne under sentrifugering. Teipen ble surret helt rundt kolonnen og samlebrettet, ved hver ende. Kolonnene og samlebrettene ble sentrifugert i åtte minutter ved en hastighet på 3500 RPM.

Sentrifugeringen førte til at avfall ble presset gjennom filteret i kolonnen og ned til samlebrettet. Avfallet fra samlebrettet ble tømt i søppeldunker for risikoavfall. Kolonnen ble tilsatt 500µL AW1-buffer før den ble teipet fast til samlebrettet, og satt tilbake i sentrifugen. Der ble den sentrifugert i fire minutter, ved en hastighet på 3500 rpm. Automatpipetten egner seg utmerket til å pipettere AW1-buffer, da det er mulig å stille inn en nøyaktig mengde som forlater pipettespissen for hvert trykk. I tillegg tar det mye mindre tid å bruke automatpipetten, enn det går med til å pipettere en og en brønn med vanlig pipette. Det brukes også færre pipettespisser ved denne metoden. Etter sentrifugering tømmes avfallet fra samlebrettene i risikoavfallet. 500µL AW2-buffer tilsettes kolonnene, med en automatpipette. Kolonnene settes tilbake i sentrifugen, der de blir sentrifugert i 20 minutter, ved en hastighet på 3500 rpm.

Etter sentrifugering overføres kolonnene fra samlebrett til PCR brett. På dette tidspunktet er det ikke et behov for samlebrettet lenger. Avfallet fra samlebrettet tømmes, og brettene vaskes, slik at det står klart til senere bruk. PCR brettene blir brukt til oppbevaring av DNA, og det er også denne type brett som skal i PCR-maskinen på et senere tidspunkt. Det er spesielt viktig at kolonnen sitter skikkelig på PCR brettet, på grunn av at kolonnen ikke setter seg så godt fast til PCR-brettene, slik de gjorde med samlebrettet.

125µL AE buffer tilsettes kolonnen som sentrifugeres i 4 minutter, ved 3500 rpm. AE buffer får utfelt DNA til å løse seg opp, slik at det kan gå gjennom filteret til kolonnen, og ned i PCR brettet. Produktet som samles opp i PCR brett skal ikke kastes, i motsetning til avfallet som ble samlet opp i samlebrettene. Det er i PCR brettene vi finner DNA produktet. Etter første sentrifugering blir 50 µL AE buffer tilsatt kolonnen, som sentrifugeres i 4 minutter, ved en hastighet på 3500 rpm.

Etter denne sentrifugeringen er det ikke lenger et behov for kolonnen, og den må kastes da den ikke kan bli brukt om igjen. PCR-brettet, som nå inneholder ferdig isolert DNA, dekkes med plastfilm før det settes i fryseren til oppbevaring.

3.2.2 Isolering av DNA fra dyrket renkultur Borrelia burgdorferi sensu lato

Hensikten med å isolere DNA fra renkultur er å få rent DNA som kan brukes som kontroll. Vi har tatt utgangspunkt i metoden som er beskrevet i Vedlegg 3.

Først ble renkultur *Borrelia burgdorferi sensu lato* overført til hvert sitt eppendorf rør, det var litt for mye i rørene som ble utlevert så det var viktig å passe på at det ikke var så mye i eppendorf-rørene at det ble søl når de skulle lukkes. Etter pipetteringen er utført settes eppendorf-rørene i sentrifugen og sentrifugeres i 10 minutter ved en hastighet på 7500 rpm.

Når sentrifugeringen er ferdig tas rørene ut, det skal da være noe i bunnen av røret. Pipetter av supernatanten fra eppendorf-røret og tilsett 180 µl ATL-buffer, som skal hjelpe til å bryte ned bakteriecellene for å frigjøre DNA. Etter tilsatt ATL-buffer blandes rørene på vortex slik at bunnfallet løser seg opp og blandes skikkelig med ATL-bufferen. Når innholdet i røret er tilstrekkelig blandet settes røret til inkubasjon på varmeplate i 30 minutter ved en temperatur på 37°C. Etter inkubasjonen hentes eppendorf-rørene og temperaturen til varmeplaten endres fra 37 °C til 56 °C.
25 µl proteinase K tilsettes ependorfrør før 200 µl AL-buffer blir tilsatt. Igjen blandes prøven ved bruk av vortex. Det er viktig at en ikke tilsetter proteinase K direkte til AL-buffer. AL-bufferen må ikke inneholde etanol.
Eppendorf-rørene skal nå settes tilbake på varmeplaten, der de skal stå i 30 minutter ved en temperatur på 56 °C. Grunnen til at temperaturen endres fra 37°C til 56°C er at det fører til en flerfoldig økning i aktiviteten til Proteinase K. Nukleaser er proteiner, og disse vil inaktiveres av Proteinase K. Når enzymene Dnase og Rnase inaktiveres hindres degradering av nukleinsyrene.[44] Dette gir DNA produktet bedre kvalitet og sikrer høyere avkastning.

Når prøvene er ferdig inkubert fjernes de fra varmeplaten, som skrus av da det ikke lenger er behov for den. 200 µl etanol blir så tilsatt prøven, dette får DNA til å felle ut. Løsningen blandes så godt med vortex. Ved dette punktet er det veldig viktig at prøven og etanol blandes skikkelig, slik at det dannes en homogen løsning. Pipetter blandingen over i Dneasy mini spin kolonnene som står i to ml samlerør. Det er viktig å passe på å få med alt som felles ut i løsningen, over i kolonnen. Nå skal kolonnene sentrifugeres i ett minutt ved en hastighet på 8000 rpm slik at væsken i kolonnen går ut i samlerøret. Etter

sentrifugeringen overføres kolonnen til et nytt samlerør, og det brukte røret forkastes, sammen med alt innholdet.
Når kolonnen har plasser over på et nytt rør, tilsettes 500 µl AW1-buffer, før prøven settes tilbake i sentrifugen. Igjen sentrifugeres prøven i ett minutt ved en hastighet på 8000 rpm. Når kolonnene har blitt ferdig sentrifugert, overføres de til nye samlerør. De brukte samlerørene kastes. 500 µl AW2-buffer blir tilsatt kolonnene og prøvene settes tilbake i sentrifugen. Etter 3 minutter med sentrifugering, ved en hastighet på 14000 rpm får Dneasy membranen tid til å tørke. Membranen må være skikkelig tørr, da rester av etanol kan interferere med de neste stegene. Når kolonnen fjernes fra røret, kan uforsiktighet knyttet til håndteringen av prøvematerialet medføre at kolonna kommer i kontakt med avfallsvæsken. Hvis dette skjer så må samlerøret tømmes, og prøven sentrifugeres igjen.

Etter sentrifugeringen forkastes samlerøret, og kolonnen overføres til et 1,5 eller 2 ml eppendorf-rør. 100 µl AE-buffer pipetteres direkte på Dneasy membranen, og prøven skal stå til inkubasjon på benk i ett minutt. Prøven sentrifugeres så i ett minutt ved en hastighet på 8000 rpm. Ta prøven ut av sentrifugen, tilsett 100 µl AE-buffer og la stå i ett minutt på benk. På dette punktet er det ikke nødvendig å bruke et nytt rør. men det kan gjøres dersom en ikke vil at det i det første røret skal bli fortynnet. Sentrifuger prøven i ett minutt ved en hastighet på 8000 rpm. Etter dette trinnet er renkultur DNA klart til brukes som positi kontroll. Dersom prøvematerialet ikke skal brukes til forsøk samme dagen, så kan DNA fryses ned til det skal tas i bruk.

3.2.3 PCR

Hensikten med PCR prosessen er å amplifisere DNAet vi ønsker å isolere til fremstilling ved gelelektroforese. Vi har tatt utgangspunkt i metoden som er beskrevet i Vedlegg 4 og 5.

Til å begynne med måtte mastermix lages til. Et eppendorf-rør med mastermix ble laget til for hver PCR-plate. Det ble satt som mål å få 100 doser mastermix i hvert eppendorf-rør, og med 13 µL til hver brønn ble det 1,3 ml per eppendorf-rør. For å nå denne mengden ble 750 µL DNA polymerase, 15 µL forward primer, 15 µL reverse primer, 60 µL $MgCl_2$ og 460 µL nukleasefritt vann blandet sammen. Outer forward primer (nifF1) og outer reverse

primer (nifSR1049) ble tilsatt mastermixen. Primerene; nifF1 og nifSR1049 binder seg til komplementære seter på hver sin templattråd, på enkelttrådet DNA, og kopierer den.
I dette forsøket ble det bare benyttet outer primere til gjennomføring av PCR prosessen. Etter konsultasjon med veileder ble det bestemt at det ikke var nødvendig å benytte inner primer i denne oppgaven.

Når mastermiks er ferdig blandet fordeles den til brønnene. Fordelingen ble gjort med en automatpipette der en kan stille inn nøyaktig hvor mye av løsningen som kommer ut for hvert trykk. Dessuten sparer automatpipetten mye tid. Mastermiksen holdes avkjølt ved at stativet ble plassert i et beger fylt med is. Etter mastermix har blitt fordelt på brønnene pipetteres 2 µL templat DNA til hver brønn. For å få plass til kontroller for de tre typene *Borrelia burgdorferi sensu lato* i tillegg til blind/negativ kontroll måtte fire av prøvene tas av brettet og i egne PCR rør. Kontrollene som ble benyttet er 4680: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, 10534: *Borrelia garinii* og 10508: *Borrelia afzelii*.
Analysen kvalitetssikres gjennom bruk av kontrollprøver laget av DNA isolert fra rendyrket *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Kontrollen skal amplifiseres dersom alle de pre analytiske stegene har blitt gjennomført på en korrekt måte. Amplifisert kontrollprøve forutsetter at reagenser og utstyr ikke er defekt. Blindprøve brukes som en kvalitetskontroll for å oppdage eventuell forurensing.

Når alt var i brønnene ble de blandet ved å vortexe lett og ved å sentrifugere platene i noen minutter. Etter alt dette har blitt gjort er platene klar for PCR cycler.
Programmet som ble brukt var et touchdown PCR program som var forhåndsinnstilt av veileder.
Resultatene ble visualisert ved bruk av gelelektroforese.

3.2.4 Gelelektroforese

Hensikten med å utføre gelelektroforese er å skille DNA av ulike lengder fra hverandre, med det formål å påvise genet nifS (BB0084). Påvisning blir gjort ved fremstilling av nukleinsyrer under UV-bestråling med kamera som har UV-linse. Vi har tatt utgangspunkt i metoden som er beskrevet i Vedlegg 6

For å lage agarosegelen tilsettes 1,8 gram agarose og 80 ml 1x TAE buffer i en erlenmeyerkolbe, og blandes. Til dette forsøket ble det benyttet tre gelkar per PCR-plate. Deretter settes kolbene i mikrobølgeovnen på full styrke i 3-4 minutter, eller til all agarose var oppløst. Hvor lenge kolbene må stå i mikrobølgeovnen varierer, så det er viktig å holde et øye med de slik de ikke koker for mye. Etter en stund i mikrobølgeovnen kan det være lurt å sjekke hvor mye agarosen som har løst seg, og når det undersøkes kan den blandes litt. Pass på at blandingen kan sprutkoke, vend åpningen fra deg når du blander. Når all agarose er oppløst tilsettes 1,0 µL GelRed og agarosen blandes. Blandingen skal så stå en stund for å kjøle seg ned. Temeraturen til agarose skal senkes ned til 65°C. Det er viktig å passe på temperaturen, ettersom gelen kan stivne i kolben. Når agarosen står til kjøling passer det bra å gjøre klar gelkarene. Karene klargjøres ved å teipe rundt bunnen, slik at gelen holder seg på plass i karet, og så plasseres kammene i karet. Til dette forsøket ble 2x20 kammer i elektroforesekar 1. 1x20 og 1x14 kammer i kar 2 og 2x14 kammer i kar 3 brukt.

Når agarosen har nådd en temperatur på 65°C er den klar til å bli overført til gelkarene, der den skal stå i ro til den stivner. Agarosegelen kan ta mellom 20-30 minutter på å stivne helt. PCR-brettene ble fjernett fra thermal cyclerene etter PCR-prosessen var ferdig. Loading dye ble tilsatt hver av brønnene, før de ble blandet, ved å bli sentrifugert i noen minutter. Etter sentrifugeringen ble de brettene som ikke skulle brukes der og da, oppbevart i kjøleskap til senere bruk.

Etter at gelen i gelkar har stivnet helt, fjernes teipen, før den overføres til elektroforesekarene. 1xTAE buffer helles over i elektroforesekarene, helt til gelen dekkes. Bufferen kan også tilsettes før gelkar plasseres over i elektroforesekaret, men da er det viktig å etterfylle slik at gelen blir dekket av buffer. Samme buffer kan benyttes flere ganger før den må byttes ut, men ikke mer en tre ganger. Store mengder TAE buffer ble brukt til denne delen av oppgaven. 1x TAE buffer ble tillaget ved å fortynne 20 ml 50x TAE-buffer med 980 ml destillert vann. Tillaging kan forenkles ved å tilsette 20 ml 50x TAE-buffer til en kolbe som rommer en liter, for så å etterfylle med destillert vann til det når 1L merket. For å blande kolben skikkelig kan det være lurt å stoppe fyllingen halveis, og begynne å blande, for så å fortsette fyllingen. Kammene kan nå fjernes fra gelen ved å dra dem rett oppover med jevn fart. Hvis dette blir gjort feil så kan brønnene bli misformet, noe som medfører vanskeligheter med å få prøvemateriale i dem.

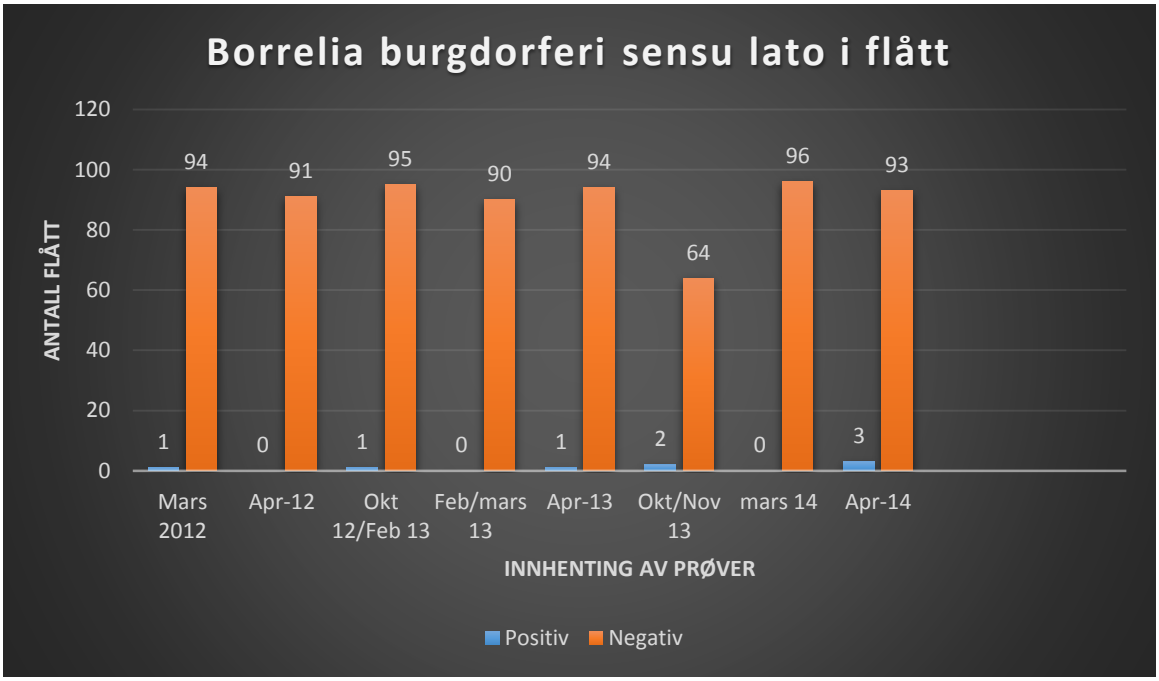
3 µL prøvemateriale fra PCR-brett tilsettes brønnene i gelkaret, når gelen er klar. Prøvematerialet ble tilsatt fra venstre til høyre i gelkaret. Gelkarene ble merket med V på venstre side og H på høyre side. Dette ble gjort for å enklere kunne idientifisere hvilke prøver som havnet i hvilken brønn, i gelen. Spenningskilden ble koblet til positiv- og negativ pol på elektroforesekaret. Et elektrisk felt gir prøvematerialet vandreegenskaper. Spenningskilden settes på 100 volt og den får stå å gå i 45 minutter. Etter det har gått 45 minutter, skrus spenningskilden av og ledningene frakobles elektroforesekaret. Lokket på elektroforesekaret kan ikke åpnes før de strømførende ledningene har blitt frakoblet. Når spenningen har blitt slått av og strømkilden har blitt koblet fra elektroforesekaret kan gelen overføres til UV-kammeret. Der vil kameraet med UV-filter fange opp bilde av DNA i gelen. Bestrålingen lyser opp GelRed bundet til DNA. Bildene merkes systematisk, slik en senere kan finne ut hvilke prøver resultatene er hentet fra. Resultatene ble så studert, og positive prøver ble notert. Prøver som har positivt funn av DNA fra *Borrelia Burgdorferi Sensu Lato* kvalitetssikres ved at vandrelengden til DNA sammenliknes med kontrollprøvene sin vandrelengde. Kontrollene består av DNA som har blitt isolert fra dyrket reinkultur av *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Blindprøven vil vise om prøvene har blitt forurenset.

4 Resultat

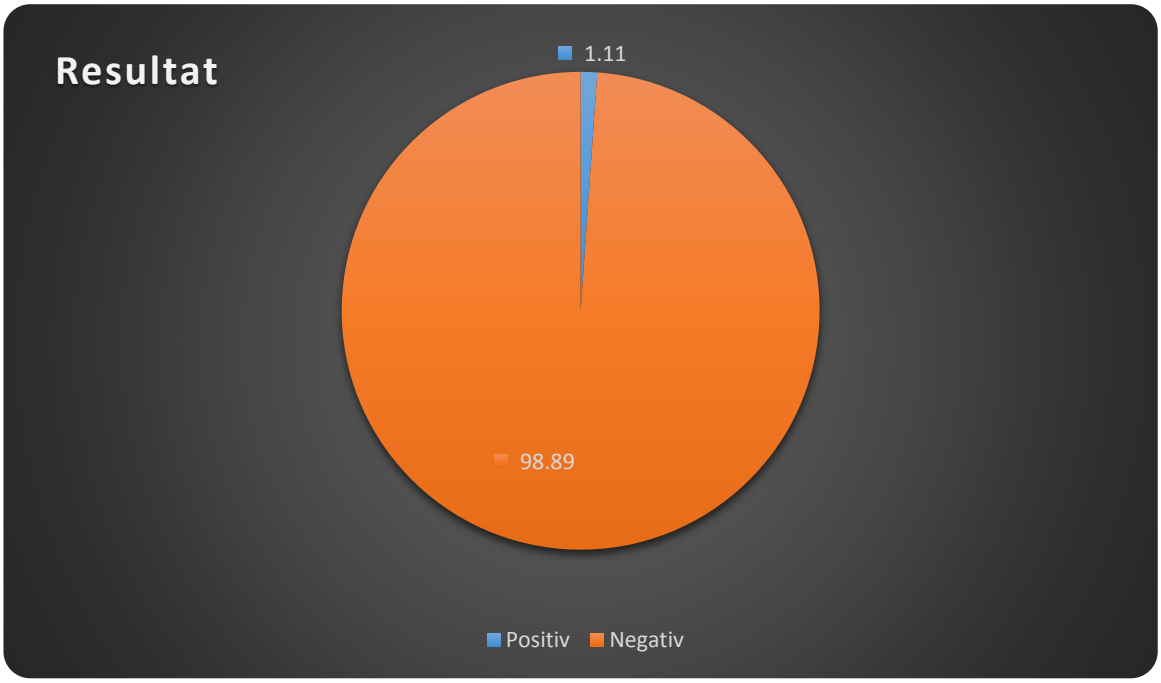
Vi fikk utdelt 8 oppbevaringsbrett med 96 brønner hver. Det manglet flått i noen av brønnene, og etter å ha gjennomgått dem fant vi ut at det manglet til sammen 50 flått. Totalt hadde vi altså 718 flått som skulle undersøkes. Flåttarten som har blitt samlet inn og oppbevart er av typen; *Ixodes Ricinus*. Flesteparten av flåtten som ble levert var nymfer, med noen voksne.

Prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* ble undersøkt ved bruk med PCR og visualisert ved hjelp av gelelektroforese. Av de totalt 718 prøvene som ble innhentet fikk bare åtte av prøven positivt resultat for *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Det er en prosentvis andel på 1.11% av totalt antall flått.

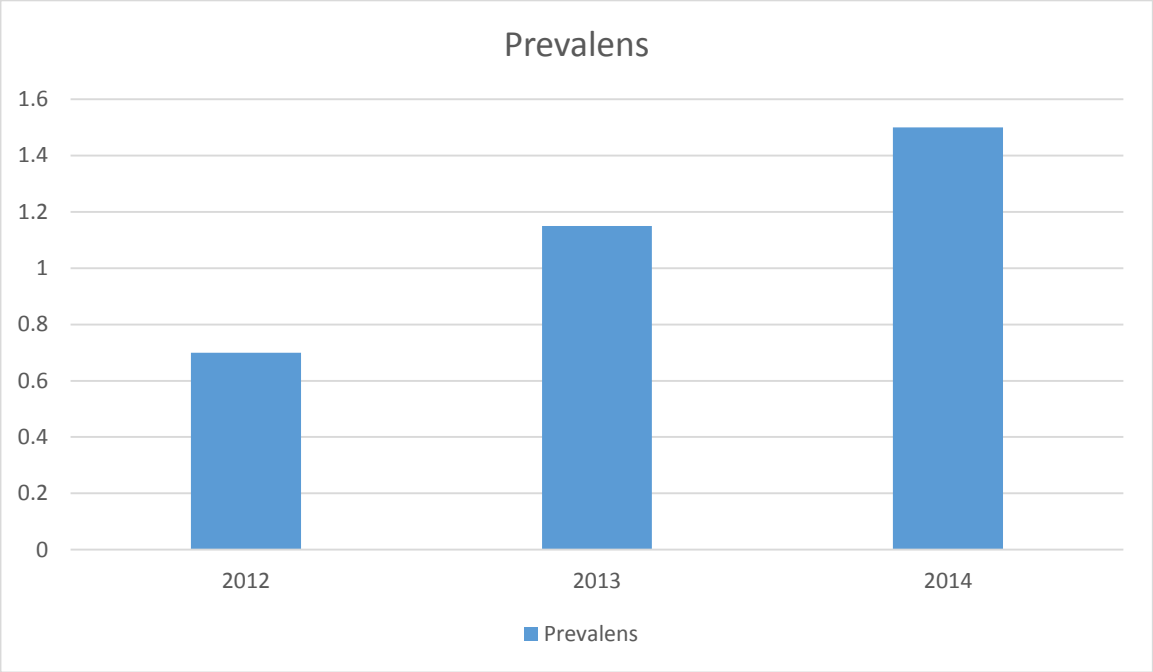
Nedenfor (Figur 1) er det en skjematisk framstilling av resultatene fra PCR/Gel-elektroforese.



Figur 1. Oversikt over positive og negative prøver.



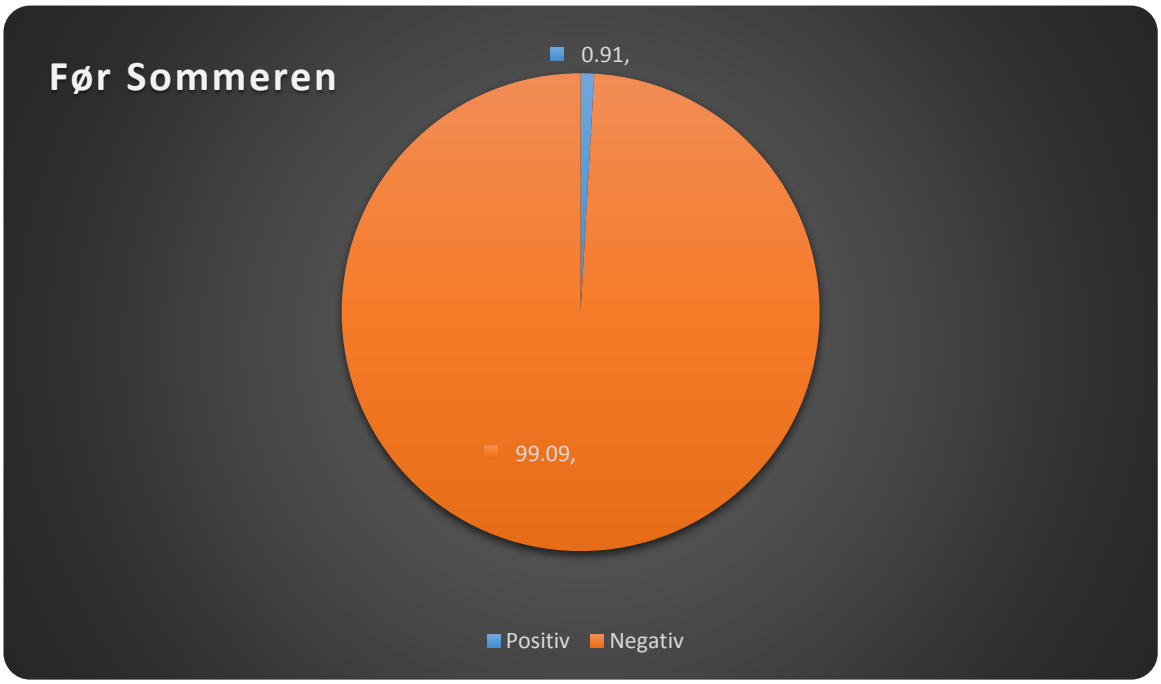
Figur 2. Oversikt over hvor stor andel av prøver som fikk positiv eller negativ. Diagrammet tar utgangspunkt i prosentvis andel av alle prøvene.



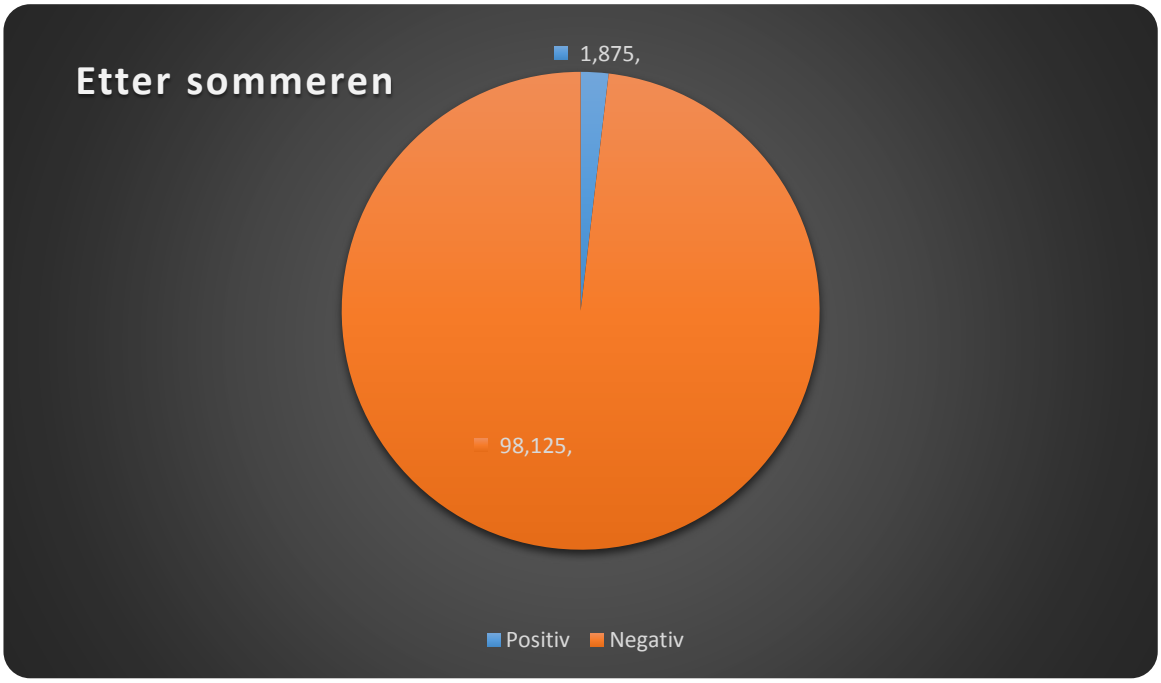
Figur 3. Prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått for hvert av innsamlingsårene. Vises i prosent.

Tabell 1. Oversikt over positive og negative prøver for hver innhøsting.

	Mars 2012	April 2012	Okt 12 Feb 13	Feb/Mars 2013	April 2013	Okt/Nov 2013	Mars 2014	April 2014
Antall Prøver	95	91	96	90	95	66	96	96
Positive	1	0	1	0	1	2	0	3
Negative	94	91	95	90	94	64	96	93
%-Positiv	1.05	0	1.04	0	1.05	3.03	0	3.125
%- Negativ	98.94	100	98.95	100	98.94	96.97	100	96.875



Figur 4. Prosentvis andel av positive prøver før flåttens høysesong.



Figur 5. Prosentvis andel av positive prøver etter sommeren.

Resultatene fra PCR ble fremstilt ved gelelektroforese. Til sammen ble det utført 25 gelelektroforeser. Bildene ble tatt i UV-kammer, slik at UV-lyset skulle få DNA til å lyse opp. Noen av bildene var litt uklare, så de måtte redigeres for å fastslå hvilke av prøvene som var positive. På noen av bildene nedenfor kan det se ut som at negative resultater er positive. Etter å ha rådført med veileder ble det avgjort hvilke av resultatene som var sanne positive. Med sanne positive menes det at det ikke ligger tvil om at resultatene ikke er negative.

Bildene av resultatene er tilgjengelige i vedlegg 1.

Bilde 25 (vedlegg 1) er restbrettet. Det består av prøvene som måtte tas for seg selv for å få plass til kontrollene på PCR-brettene. Brønn 1 til 4; Mars 2012. Brønn 5 til 8; April 2012. Brønn 9 til 12; Oktober 2012/ Februar 2013. Brønn 13 til 16; Februar/Mars 2013. Brønn 17 til 20; April 2013. Brønn 21 til 24; Oktober/November 2013. Brønn 25 til 28; Mars 2014. Brønn 29 til 32; April 2014.

5 Diskusjon

Det første som ble undersøkt da resultatene fra gelelektroforesen hadde blitt vurdert var om kontrollene ble godkjent. Kontrollene for *B. Burgdorferi sensu stricto, B.garinii* og *B.afzelii* ble godkjent. I tillegg så viste den negative kontrollen at det ikke var tegn til forurensing. Resultatene som ble identifisert som positive kan aksepteres som sanne positive, på grunn av at vandrelengden har den samme signaturen som kontrollene. De sanne positive har blitt presentert i Tabell 1. Figur 1 er en visuell fremstilling av resultatene.
Av de åtte brett vi fikk utlevert ser vi at bare to av dem inneholder flått som ble samlet inn på høsten. 6/8 av flåtten har dermed blitt samlet in på våren. Siden der er en mindre populasjon som har blitt samlet inn for å representere prevalensen for høstmånedene, så vil positive prøver i disse månedene utgjøre en større prosentandel av resultatene. På grunn av dette kan framstillingen av prevalensen i høstmånedene (Figur 5) antas å være falskt forhøyet. Antall positive prøver er dermed ikke representative for høstmånedene.
Fra (Figur 1) kan det noteres at forekomsten av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått er i stor grad ikke-eksisterende i månedene Februar/Mars.

Vi kan ikke vite om det positive resultatet fra brett; Februar 2012/Oktober 2013, stammer fra en flått som har blitt samlet på høsten eller våren. Ettersom det er så få totalt antall positive prøver, så betyr en feilplassert positiv prøve meget for den skjematiske fremstillingen av resultatene. Dette gir usikkerhet i den statistiske fremstillingen av resultatene for høsten og våren, se Figur 4 og 5. Derfor har vi valgt å inkludere dette positive resultatet til utformingen av både Figur 4 og 5.

En tidligere studie viser en gjennomsnittlig prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* hos vertssøkende *Ixodes ricinus* flått på 24,5% for nymfer og 26,9% for voksne. Innsamlingen for denne studien ble gjort i skogområder ved Farsund, Mandal, Søgne og Tromøy. Innsamlingsperioden strakk seg utover månedene april, juni, august og oktober i 2007. [48] [49] Resultatene fra denne studien viser at prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* er betraktelig høyere i sommermånedene, enn månedene før og etter de som har blitt nevnt ovenfor.

I en annen studie ble det funnet en prevalens på 14,8% i 2010, 18,7% i 2011 og 14,3% i 2012. Denne studien tok for seg vertssøkende *Ixodes ricinus* flått som ble samlet inn ved det samme innsamlingsstedet som der flåtten brukt i denne oppgaven ble samlet inn. Flåtten som ble undersøkt i denne studien ble samlet inn mellom april og september.[50] Resultatene fra denne studien viser at prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* kan variere fra år til år. Det kommer også frem fra den forrige studien som ble omtalt at der er høyere prevalens for *Borrelia burgdorferi sensu lato* på sørlandet enn på vestlandet. Begge studiene viser altså mye større prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i vertssøkende flått enn den vi har påvist i denne oppgaven (Figur 2 og 3). Bakgrunnen for dette funnet er at flåtten som ble brukt i disse studiene, ble innhentet nærmere flåttens høysesong.

Ut ifra Figur 2 ser man at prevalensen for *Borrelia burgdorferi sensu lato* er veldig lav over hele perioden der flåtten ble innsamlet. Ut ifra Figur 3 ser man at prevalensen er økende fra 2012 til 2014. Årsaken kan være at været har blitt mildere, som igjen kan føre til at flåtten er aktiv lenger og nymfene blir aktive tidligere. Tilgangen på vertsdyr kan også ha blitt høyere over denne perioden. Prevalensen som har blitt målt kan også skyldes en rekke tilfeldigheter og vil ikke nødvendigvis være representativt for fremtidige år. Høysesongen der flåtten trives er i sommermånedene, fra Mai til August. Alle prøvene som ble studert i denne oppgaven ble samlet inn utenfor høysesongen. En kan da regne med å finne lavere prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flåtten. Den lave prevalensen som er knyttet til månedene utenom høysesongen kan skyldes at nymfene er inaktive om vinteren og tidlig på våren. [51] Nymfene er hovedansvarlige for overføring av patogene mikroorganismer til mennesker.[52,53] Voksne flått, i motsetning til nymfene, kan fortsatt være aktive om vinteren, dersom temperaturen er over 7 °C. [53] På grunn av at vegetasjonen i stor grad ligger begravd under snøen, på denne tiden av året, vil muligheten til søkende flått minske radikalt for å finne en vert. Siden mennesker stort sett kler seg bedre om vinteren, og går mindre tur i skog og mark, minker sjansen for smitte betydelig.

B.garinii er en genospecies av *Borrelia burgdorferi sensu lato* som oftest har fugl og gnagere som sine verter.[54] Når fuglene flyr til varmere klima for vintermånedene, blir ikke *B.garinii* spredt til nye larver og nymfer, før fuglene kommer tilbake rundt vårtider. De kan derimot spre *B.garinii* til steder der der det normalt ikke finnes.[54] Gnagerne blir også mindre aktive i de kalde månedene, noen går også i dvale.[55] Under vintermånedene blir det altså færre potensielle verter som flåtten kan få sitt blodmåltid fra, slik at mange av de dør

av mangel på føde. En voksen flått legger egg på våren og de klekker senere på sommeren. Etter klekkingen finner larven sin første vert som den får sitt første blodmåltid fra.[56] Hvis verten er bærer av patogener så vil dette overføres til larven.

I områder med en større hjortebestand kan man regne med å finne et relativt høyt antall flåttbårne sykdommer. Dette kan begrunnes med at en hjorten har en stor overflate som flåtten kan sette seg på og høy kapasitet til blodoverføring. Dermed vil voksne flått legge mange egg som igjen fører til mye flått.[57] Et stort antall flått medfører en høyere smitterisiko. Tidligere forskning viser at hjorten er en inkompetent smittebærer for *Borrelia burgdorferi sensu lato*.[59],[60] En studie viser til at hjortedyrsera har en komplementmediert borreliacidal effekt.[58] *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått som sitter på hjortedyrene kan altså bli eliminert av hjortedyret sitt immunsystem.[59],[60] En kan dermed også forvente lavere prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i områder med en høy hjortebestand.[60] [49]

En tidligere studie tok for seg flått hentet inn fra ørene til hjortedyr, især rådyr og elg.[49] Flåtten benyttet i den studien ble samlet inn i oktober 2001-2003. Studien viser at prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått som har blitt samlet inn fra hjortedyrene er lavere enn hos vertssøkende flått. Prevalensen er 2,9% i nymfer og 0% i voksne som har blitt samlet inn fra rådyr. For elg er prevalensen 4,4% i nymfer og 6% i voksne. Hos vertssøkende flått var prevalensen i nymfer 24,5% og i voksne 26,9% som ble samlet inn i april, juni, august og oktober i 2007. [48] Dette underbygger påstanden om at hjortedyrene er inkompetente smittebærere for *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Resultatene fra denne studien setter også den komplementmedierte borreliacidale effekten til hjortedyrsera i perspektiv, ettersom prevalensen for *Borrelia burgdorferi sensu lato* er lavere i blodsugende flått enn hos vertssøkende flått.

Det var ikke mulig å undersøke genospecies til de positive prøvene, da det oppsto tekniske problemer med qPCR maskinen. Varmeplaten der prøven varmes opp smeltet den optiske plastfilmen som dekket PCR brettet. Teknisk personell ved høyskolen besluttet at det ikke var forsvarlig å bruke maskinen på grunn av resterende plastrester og lim som var smeltet fast på varmeplaten. Dessverre tar det lang tid før det blir utført service på maskinen av teknikere. Vi kom fram til at det ville ta for lang tid før vi fikk resultatene fra qPCR til at det ville gått utover tidsfristen for innlevering av oppgaven Opprinnelig skulle denne

oppgaven også ta for seg prevalensen av *Anaplasma phagocytophilum* i flått. På grunn av problemene som oppstod med qPCR ble det ikke mulig å få undersøkt noen prøver.

Det finnes få studier som tar for seg prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått utenfor flåttens høysesong i mai-august. Dette skyldes antageligvis at det er relativt vanskelig å finne flått utenfor høysesongen. Spesielt vanskelig er det å finne studier som har omtalt flått høstet inn fra samme området som flåtten brukt i denne oppgaven. Det kommer frem av en tidligere studie at der var høyere prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i mai enn i august.[60] Med utgangspunkt i denne studien kan man altså regne med å finne høyere prevalens tidlig på sommeren enn på sensommer. Siden nymfene står for mesteparten av patogen smitte, kan det faktum at det er høyere prevalens i mai være sammenhengende med at det er på denne tiden nymfene blir aktive igjen etter vinteren. Siden de fleste nymfene har funnet et blodmåltid, og er i ferd med å bli til voksne flått blir prevalensen lavere i august.

Den største feilkilden i denne oppgaven er muligheten for krysskontaminering mellom de forskjellige brønnene. Krysskontaminering kan oppstå ved flere av trinnene i den praktiske utførelsen. For eksempel kan det etter pulverisering komme biter av flåtten over i andre brønner når gummitoppene fjernes for å tilsette reagenser. Det kan også oppstå krysskontaminering under pipettering.
Krysskontaminering kan utelukkes på grunn av det lave antallet positive prøver. Langt flere prøver ville blitt registrert som positive dersom krysskontaminering hadde oppstått.

Nederst på gelen vil man se en strek som lyser opp. Denne skyldes antageligvis at det har blitt tilsatt mye primer. Siden primer inneholder nukleinsyrer vil disse bindes til Gelred som lyser opp i UV-kammeret. Dette kan mistolkes som forurensning, men siden vandrelengden ikke er tilsvarende signaturen til kontrollene kan denne antagelsen avfeies. Halene man ser på bildene skyldes annet DNA enn det som har blitt kopiert. Dette DNA stammer fra andre kilder enn *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Grunnen til at halene lyser opp er på grunn av at Gelred binder seg til dem.

Flåtten som ble benyttet i dette forsøket var rester fra et tidligere forskningsprosjekt, i regi av Ann-Kristin Tveten.

6 Konklusjon

Det ble påvist positivt resultat ved åtte av de 718 prøvene som ble analysert i denne oppgaven. Prevalensen av *Borrelia burgdorferi sensu lato* er på 1,11%, noe som er mye lavere enn resultater tidligere studier har kommet frem til. Årsaken til dette er at flåtten er mye mindre aktiv i de månedene hvor flåtten i denne oppgaven ble samlet inn.

6.1 Forslag til videre forskning

Vi vil foreslå å utføre flere studier på flått hentet inn i tider utenfor høysesongen mai til august.

Om det er lav prevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i vertssøkende flått i månedene før høysesongen, kunne det vært interessant å sammenligne med prevalens i høysesongen fra samme periode og sted.

---

[1] European Centre for Disease Prevention and Control. Guy Hendricks. [Bilde fra Internett] [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/ticks/PublishingImages/vectors-ticks-I-ricinus.jpg

[2] Centers for Disease Control and Prevention. Life Cycle and Hosts. [Internett] 2014 Feb 3 [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html

[3] Dyrlegene I Norderhov. Flått og Flåttbårne Sykdommer Hos Hund. [Internet] 2013 Mai 16 [Hentet 2015-05-07] Tilgjengelig fra: http://dyrlegene-norderhov.no/2013/05/flatt-og-flattbarne-sykdommer-hos-hund/

[4] Centers for Disease Control and Prevention [Bilde fra internett] [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://www.cdc.gov/ticks/images/lifecycle.jpg

[5] European Centre for Disease Prevention and Control. Ixodes ricinus. [Internet] [Hentet 2015-04-25] Tilgjengelig fra: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/ticks/pages/ixodes-ricinus.aspx

[6] Anne Baker. Ixodes ricinus, Feeding. Natural History Museum. [Internet] [Hentet 2015-05-14] Tilgjengelig fra: http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/disease/ixodes-ricinus/feeding/index.html

[7] Charles Patrick Davis. Ticks [Internett] 2014 Mai 27 [Hentet 2015-03-30] Tilgjengelig fra: http://www.medicinenet.com/ticks/article.htm

[8] Unn Ljøstad, Åse Mygland. Tidsskr Nor Legeforen. Lyme-borreliose hos voksne [Internett] 2008; 128:1175 – 8 2008 [Hentet 2015-05-18] Tilgjengelig fra: http://tidsskriftet.no/article/1690011

[9] European Centre for Disease Prevention and Control. Factsheet for health professionals. [Internett] 2010 Juni 16 [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/emerging_and_vector-borne_diseases/tick_borne_diseases/lyme_disease/factsheet-health-professionals/Pages/factsheet_health_professionals.aspx

[10] John O Meyerhoff, Herbert S Diamond. Lyme Disease Clinical Presentation [Internett] 2015 Jan 22 [Hentet 2015-05-13] Tilgjengelig fra: http://emedicine.medscape.com/article/330178-clinical

[11] Centers for Disease Control and Prevention. Lyme Disease. [Internett] Page last updated: 2015 Mars 4 [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://www.cdc.gov/lyme/index.html

[12] Centers for Disease Control and Prevention. Lyme Disease, Signs and Symptoms [Internett] 2015 Mars 4 [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://www.cdc.gov/lyme/signs_symptoms/index.html

[13] Folkehelseinstituttet. Overvåking av sykdommen borreliose [Internett] 2014 mai 28 [Hentet 2015-03-27] Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/artikler/?id=110444

[14] R. von Baehr, W.Berghoff, H. Bennefeld, H.-P. Gabel, F. Hartmann, W.Heesch, G.Herrman, P. Hopf-Seidel, B.-D. Huismans, W. Klemann, U. Neubert, A.Roczinski, A.Schwarzbach, B.Weitkus, C. Uebermuth, J. Viebahn, P. Voss. Diagnostikk og Behandling av Lyme-borreliose. Oversatt av Sigrid Disteler Moe, Anne Augensen. [Internett] 2008 Feb [Hentet 2015-04-24] Tilgjengelig fra: http://www.lyme.no/dokumenter/Diagnostikk_og_behandling.pdf

[15] Centers for Disease Control and Prevention. Erythema migrans (EM) or "bull's-eye" rash [Bilde hentet fra internett] [Hentet 2015-04-24] Hentet fra: http://www.cdc.gov/lyme/images/emforweb2.jpg

[16] Tveten, Ann-Kristin. "Exploring Diversity among Norwegian Borrelia Strains Originating from Ixodes ricinus Ticks." *International journal of microbiology* [Internett] 2014 Aug 27 [Hentet 2015-05-08] Tilgjengelig fra: http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2014/397143/abs/

[17] Diagen Borrelia burgdorferi & Co. - fästingburna bakterier och sjukdomar [Internet] [Hentet 2015-05-18] Tilgjengelig fra: http://diagen.no/norsk/nyheter/borrelia_burgdorferi_co_f_stingburna_bakterier_och_sjukdomar_/

[18] Vivian Kjelland. Flått og Borrelia i Norge. [Internett] 2011 Nov 09 [Hentet 2015-05-21] Tilgjengelig fra: http://lyme.no/index.php/component/content/article/37-artikler/gjesteskribent/349-flatt-og-borrelia-i-norge-vivian-kjelland

[19] Guiqing Wang, Alje P. van Dam, Ira Schwartz, and Jacob Dankert. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. [Internett] 1999 Okt [Sitert 2015 February 4] [Hentet 2015-04-16] Tilgjengelig fra: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88929/

[20] National Organization for Rare Disorders. Bell's Palsy Facy Sheet. [Internett] 2015 Apr 16 [Hentet 2015-05-15] Tilgjengelig Fra: http://www.ninds.nih.gov/disorders/bells/detail_bells.htm

[21] WEBMD. Stages of Lyme Disease – Topic Overview. [Internett] 2012 Aug 21 [Hentet 2015-05-13] Tilgjengelig fra: http://www.webmd.com/arthritis/tc/stages-of-lyme-disease-topic-overview

[22] Polymerase Chain Reaction. Encylopædia Britannica [Internett] 2015 [Hentet 2015-05-23] Tilgjengelig fra: http://global.britannica.com/EBchecked/topic/468736/polymerase-chain-reaction

[23] Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson. Campbell Biology Global Edition. S 449-450

[24] GE Healthcare. Taq DNA Polymerase[Internett] 2008 Juli [Hentet 2015-05-14] Tilgjengelig fra:

https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdoc11002605AB_20110831030225.pdf

[25] Primerdesign. Beginner's Guide to Real-Time PCR. [Internett] 2008 [Hentet 2015-05-09] Tilgjengelig fra: http://www.primerdesign.co.uk/assets/files/beginners_guide_to_real_time_pcr.pdf

[26] Life Technologies. PCR Thermal Cyclers from Applied Biosystems. [Internett] [Hentet 2015-04-21] Tilgjengelig fra: https://www.lifetechnologies.com/no/en/home/life-science/pcr/thermal-cyclers-realtime-instruments/thermal-cyclers.html

[27] Jennifer Redig. BitesizeBio. What is PCR? The beginner's guide. [Internett] 2014 Jan 27 [Hentet 2015-05-11] Tilgjengelig fra: http://bitesizebio.com/19132/pcr-basics-what-is-pcr/

[28] Biosistemika. Real-Time PCR Technology Basics. [Internet] [Hentet 2015-03-29] Tilgjengelig fra: http://biosistemika.com/workshops/qpcr-basics/

[29] National Genetics and Genomics Education Centre. Polymerase Chain Reaction (PCR) NHS. [Internett] [Hentet 2015-05-18] Tilgjengelig fra: http://www.geneticseducation.nhs.uk/laboratory-process-and-testing-techniques/pcr

[30] Mama Ji's Molecular Kitchen. Polymerase Chain Reaction. 2010. [Bilde hentet fra internett] [Hentet 2015-04-08] Tilgjengelig fra: http://askabiologist.asu.edu/sites/default/files/resources/activities/mamajis/pcr/PCRgraphic.jpg

[31] Korbie, Darren J., og John S. Mattick. "Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification." *Nature Protocols* 3.9 (2008): 1452-1456. [Internett] [Hentet 2015-05-20] Tilgjengelig fra: http://www.planta.cn/forum/files_planta/2008_touchdown_pcr_for_increased_specificity_and_sensitivity_in_pcr_amplification_656.pdf

[32] Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry Sixth Edition 2008 s. 274-282

[33] QIAGEN FAQ. How is "Touchdown PCR" used to increase PCR specificity? [Internett] [Hentet 2015-04-03] Tilgjengelig fra: https://www.qiagen.com/no/resources/faq?id=0ffb80ac-7470-4955-93c9-ce455869cb4b&lang=en

34 Shoba Anatha. Touchdown PCR: A Primer and Some Tips [Internett] 2009 Juli 20 [Hentet 2015-04-06] Tilgjengelig fra: http://bitesizebio.com/2203/touchdown-pcr-a-primer-and-some-tips/

[35] Encyclopædia Brittanica. DNA [Internett] 2015 [Hentet 2015-05-23] Tilgjengelig fra: http://global.britannica.com/EBchecked/topic/167063/DNA

[36] Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson. Campbell Biology Global Edition. S 451-453

[37] Encyclopædia Britannica. Coloumb Force. [Internett] 2014 Feb 24 [Hentet 2015-05-23] Tilgjengelig fra: http://global.britannica.com/EBchecked/topic/140084/Coulomb-force

[38]Kara Rogers. Encyclopædia Brittanica. Gel Electrophoresis. [Internett] 2013 Aug 28 [Hentet 2015-05-23] Tilgjengelig fra: http://global.britannica.com/EBchecked/topic/681927/gel-electrophoresis

[39] New Mexico State University. DNA. [Bilde hentet fra internett] 2010 [Hentet 2015-04-07] Tilgjengelig fra: http://web.nmsu.edu/~snsm/classes/chem435/Lab4/intro.html

[40] Christina Bligaard Pedersen Gelelektro forese: Adskillelse af DNA eller protein [Internett] 2014 sept 10 [Hentet 2015-04-03] Tilgjengelig fra: http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/gelelektroforese

[41] E.Schmid. Gelelectrophoresis. [Bilde fra internett] 2001 [Hentet 2015-04-08] Tilgjengelig fra: http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab12%201.jpg

[42] R.A. Bowen. Agarose Gel Electrophoresis of DNA. [Internett] 2000 Jan 15 [Hentet 2015-04-08] Tilgjengelig fra: http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html

[43] QIAGEN. Buffer ATL. [Internett] Tilgjengelig fra: https://www.qiagen.com/no/products/catalog/lab-essentials-and-accessories/buffer-atl

[44] Worthington Biochemical Corporation. Proteinase K. [Internett] 2015 Jan [Hentet 2015-05-08] Tilgjengelig fra: http://www.worthington-biochem.com/PROK/default.html

[45] QIAGEN. Buffer AL. [Internett] [Hentet 2015-05-24] Tilgjengelig fra: https://www.qiagen.com/no/products/catalog/lab-essentials-and-accessories/buffer-al/

[46] Nick Oswald "Ethanol precipitation of DNA and RNA: How it works" Bitesize Bio. [Internett] 2007 Des 4 [Hentet 2015-05-24] Tilgjengelig fra: http://bitesizebio.com/253/the-basics-how-ethanol-precipitation-of-dna-and-rna-works/

[47]Cornell University. "DNA Extraction Lab" [Internett] [Hentet 2015-05-24] Tilgjengelig fra: http://cibt.bio.cornell.edu/workshops_and_summer_programs/0708alum/2-DNA.pdf

[48] Vivian Kjelland, Snorre Stuen, Tone Skarpaas og Audun Slettan. Prevalence and genotypes of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in Ixodes ricinus ticks in southern Norway. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2010; Early Online, 1-7. doi:10.3109/00365541003716526

[49] Vivian Kjelland, Bjørnar Ytrehus, Snorre Stuen, Tone Skarpaas, Audun Slettan. Prevalence of Borrelia burgdorferi in Ixodes ricinus ticks collected from moose (Alces alces) and roe deer (Capreolus capreolus) in southern Norway. Ticks Tick-borne Dis. (2011) doi:10.1016/j.ttbdis.2010.12.002

[50] Ann-Kristin Tveten. Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borellia afzelii, Borellia garinii, and Borrelia valaisiana in Ixodes ricinus ticks from the northwest of Norway. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2013; Early online 1-7. Doi: 10.3109/00365548.2013.799288

[51] Arnulf Soleng, Preben S. Ottersen. Folkehelseinstituttet Skogflått (Ixodes ricinus) [Internett] 2007 nov [Hentet 2015-05-08] Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/dav/66bfc33925.pdf

[52] Pet Shed. The Deer Tick [Internett] [Hentet 2015-05-05] http://www.petshed.com/petcyclopedia/all-about-the-deer-tick.html

[53] American Lyme Disease Foundation, inc. Deer Tick Ecology [Internett] 2010 jan 5 [Hentet 2015-05-12] Tilgjengelig fra: http://www.aldf.com/deerTickEcology.shtml

[54] Pär Comstedt. Biology of Borrelia garinii Spirochetes [Internett] 2008 [Hentet 2015-05-08] Tilgjengelig fra: http://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:141429/FULLTEXT01.pdf

[55] Miljøministeriet Naturstyrelsen. Dyr i Dvale [Internett] [Hentet 2015-05-07] Tilgjengelig fra: http://naturstyrelsen.dk/naturoplevelser/naturen-netop-nu/vinter/dyr-i-dvale/

[56] Boston Street Animal Hospital. [Internett] 2014 Aug 22 [Hentet 2015-05-13] Tilgjengelig fra: http://bostonstreetvet.com/2014/08/22/constant-vigilance-fall-flea-and-tick-prevention/

[57] Kirby C. Stafford III. Tick Management Handbook [Internett] 2007 [Hentet 2015-05-08] Tilgjengelig fra: http://www.ct.gov/caes/lib/caes/documents/publications/bulletins/b1010.pdf

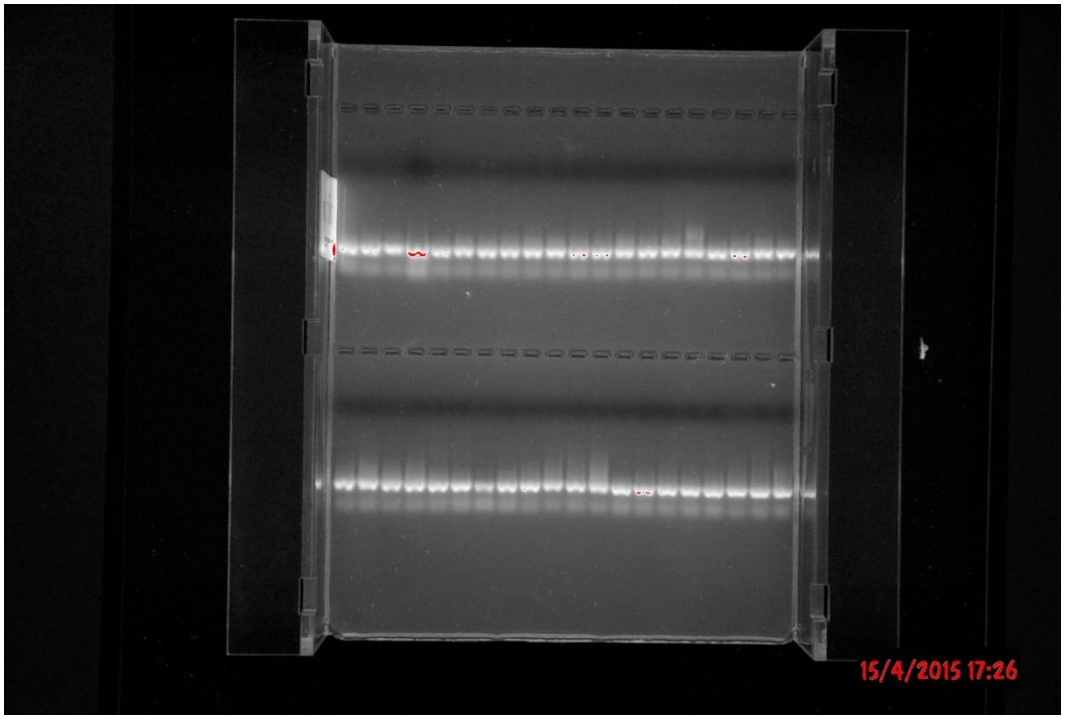
[58] Bhide MR, Travnicek M, Levkutova M et al. Sensitivity of Borrelia genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 43: 165 – 72.

[59] Olav Rosef, Algimantas Paulauskas, Jana Radzijevskaja. Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in questing Ixodes ricinus ticks in relation to the density of wild cervids [Internett] 2009 nov 27 [Hentet 2015-05-09] Tilgjengelig fra: http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-51-47.pdf

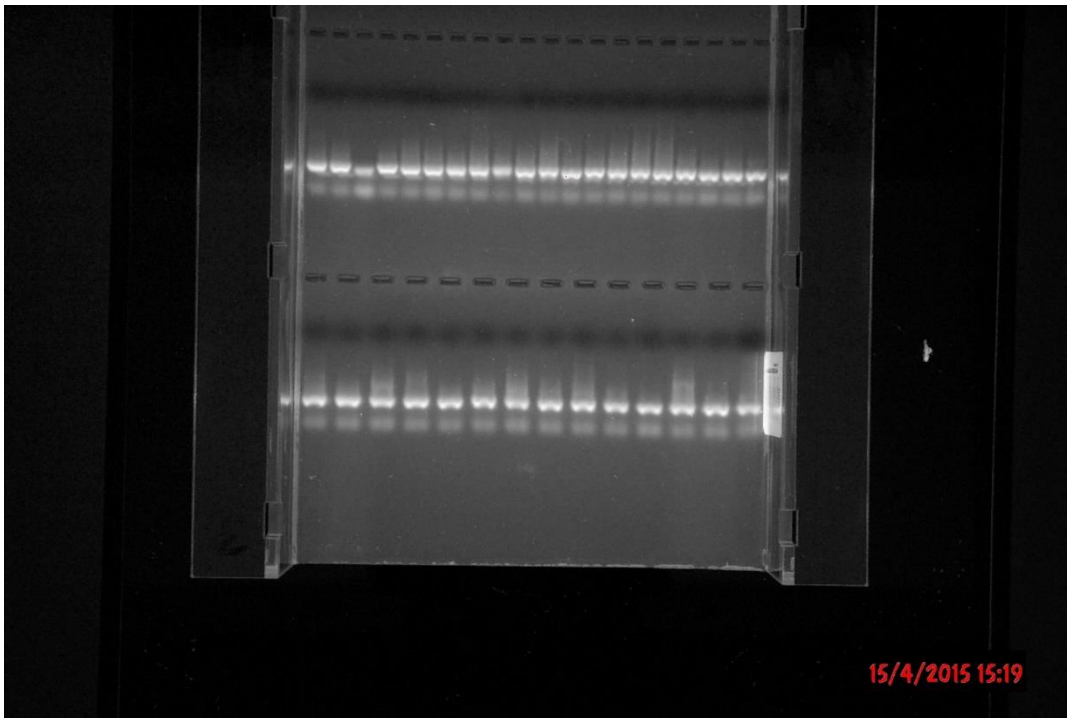
[60] Mysterud et al.: Spatial and seasonal variation in the prevalence of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato in questing Ixodes ricinus ticks in Norway. Parasites & Vectors 2013 6:187. doi:10.1186/1756-3305-6-187 [Internett] [Hentet 2015-05-04] Tilgjengelig fra: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3691722/pdf/1756-3305-6-187.pdf

Vedlegg 1: Resultater

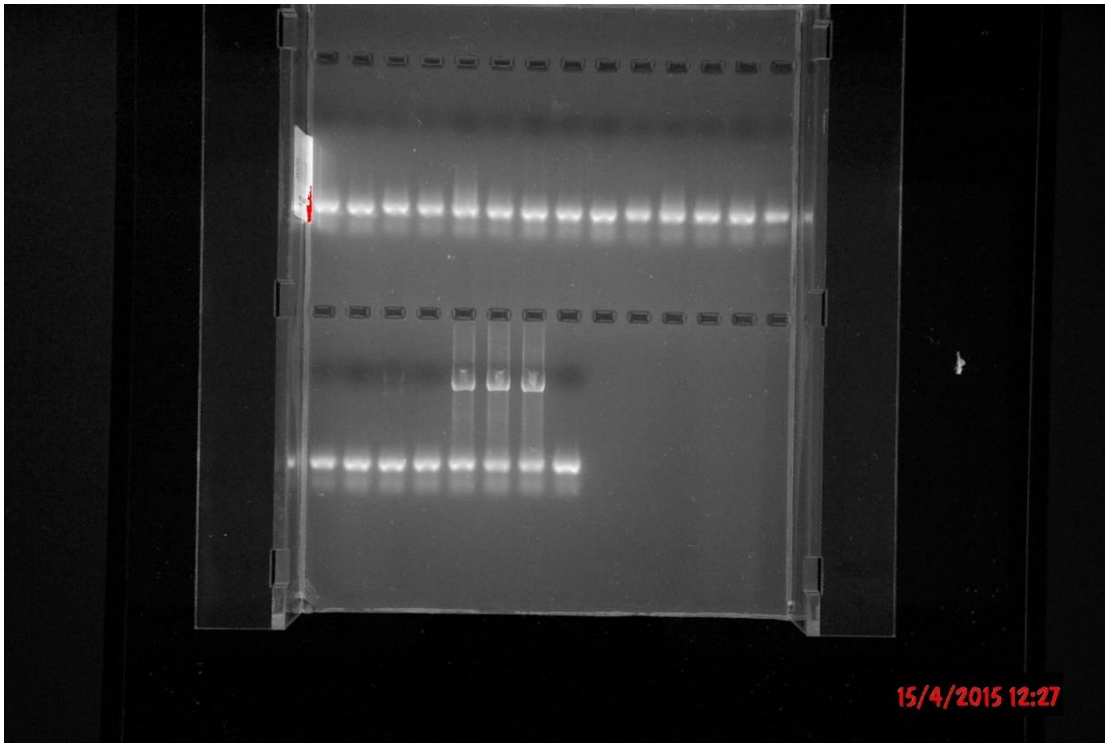
Bilde 1. Mars 2012 Kar 1. Ingen positive prøver.



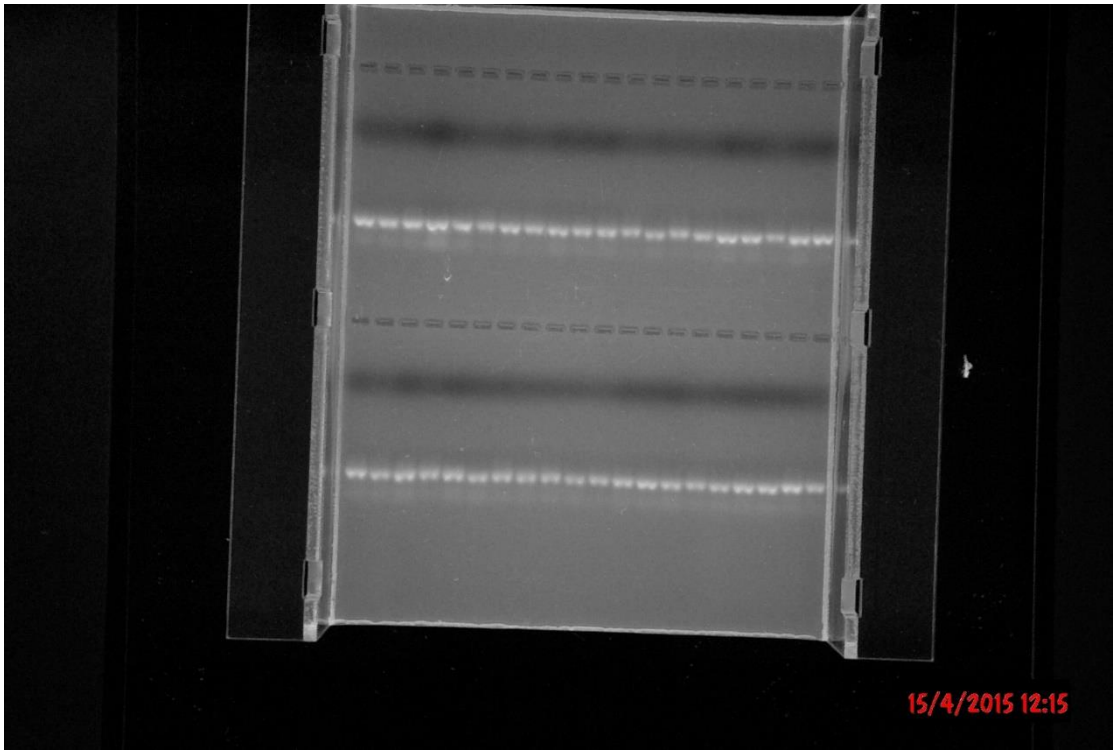
Bilde 2. Mars 2012 Kar 2. Ingen positive prøver.



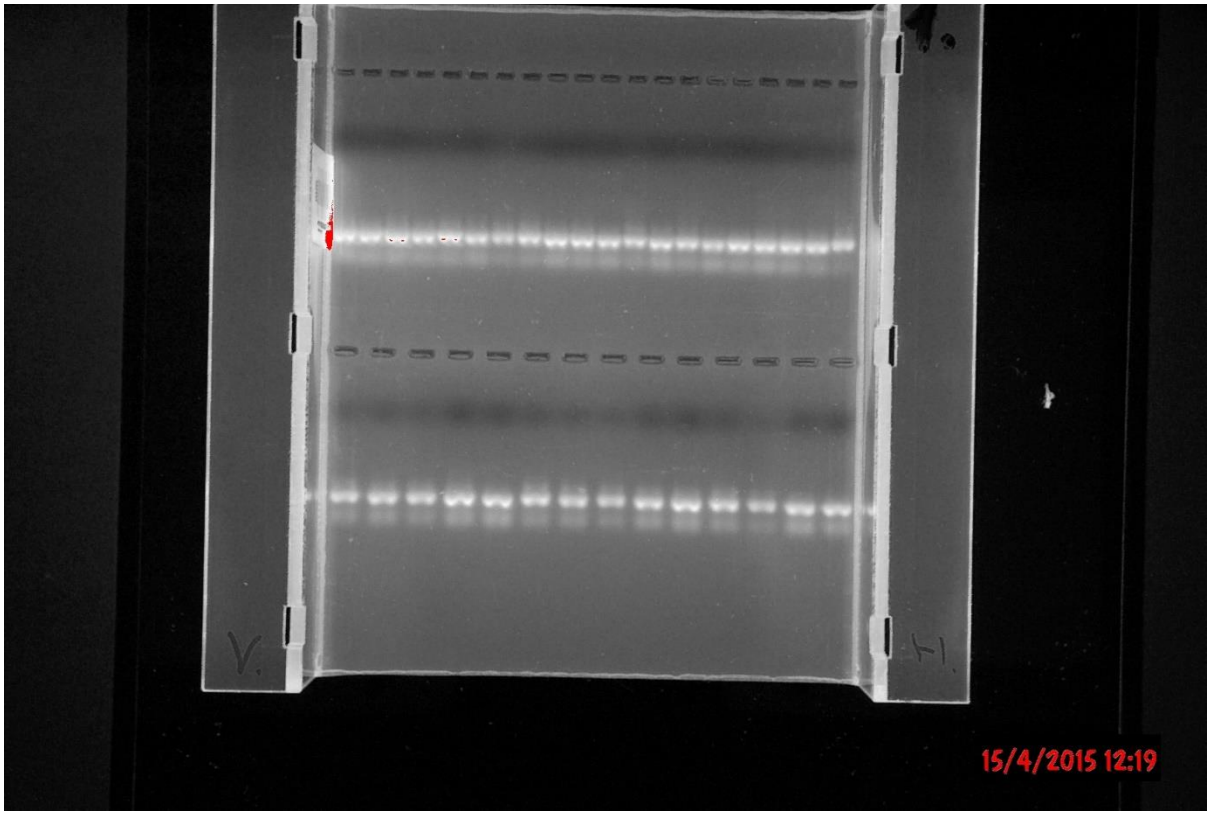
Bilde 3. Mars 2012 Kar 3. Positiv prøve; brønn 3 rad 2



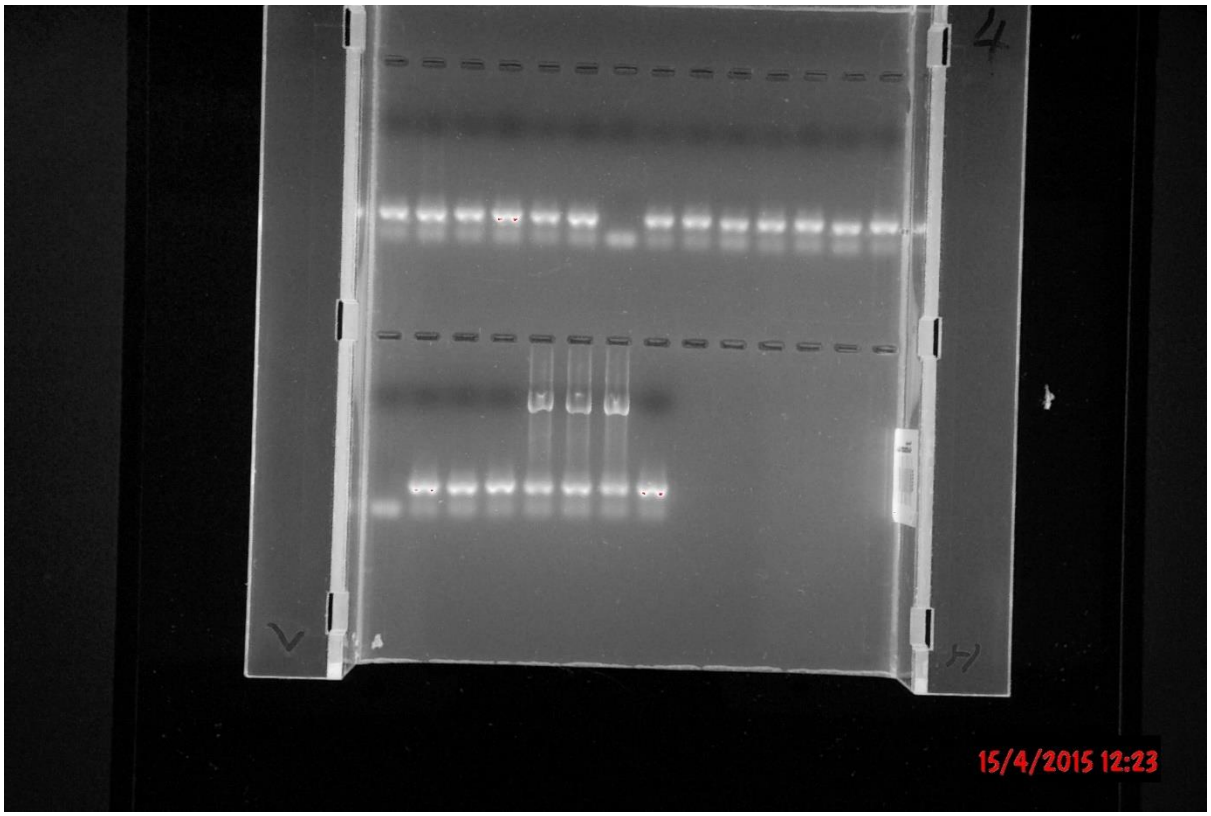
Bilde 4 April 2012 Kar 1. Ingen positive prøver.



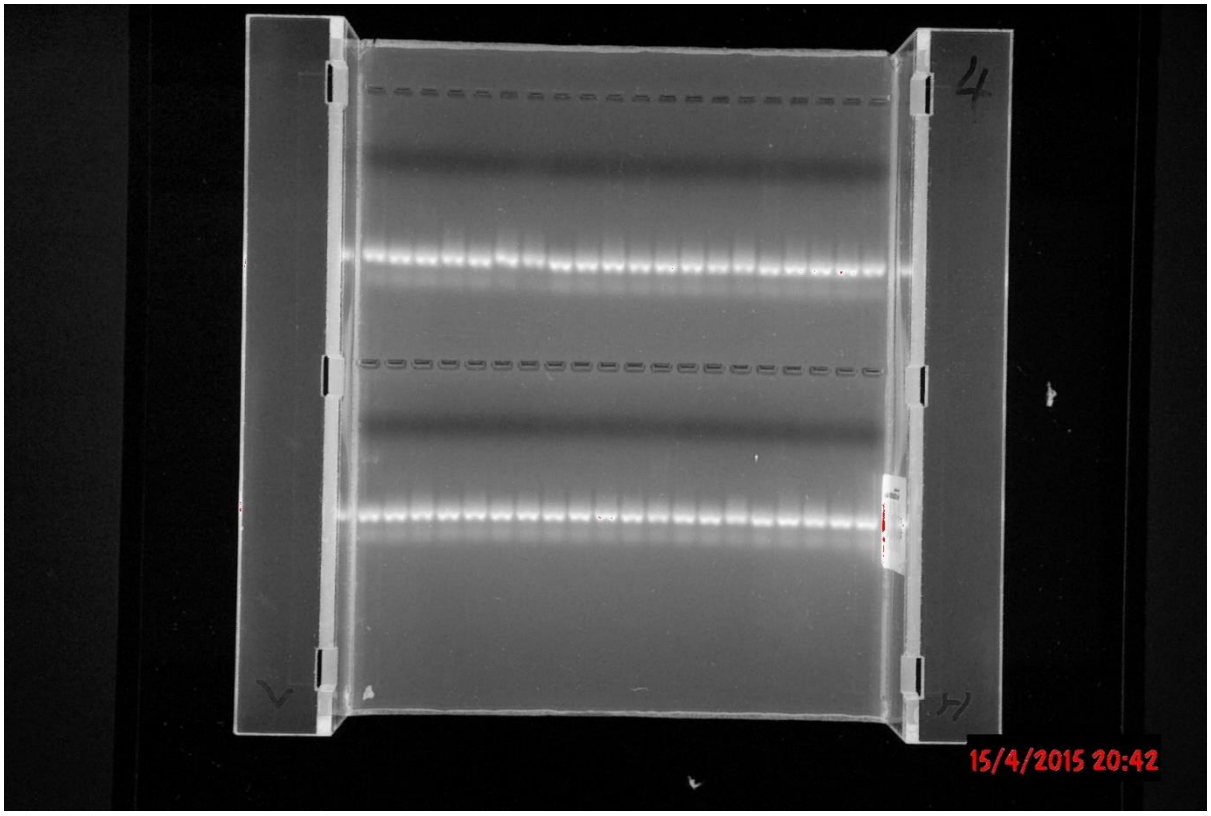
Bilde 5. April 2012 Kar 2. Ingen positive prøver.



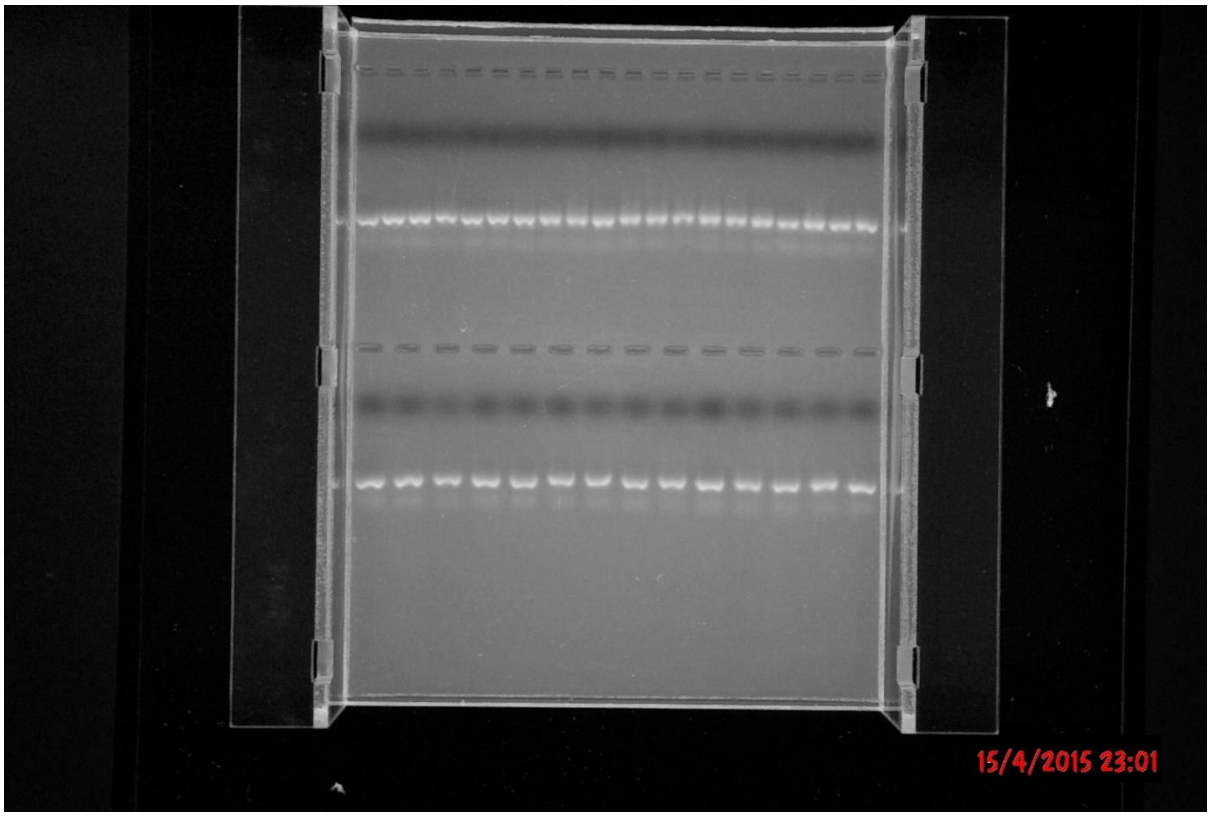
Bilde 6. April 2012. Kar 3. Ingen positive prøver.



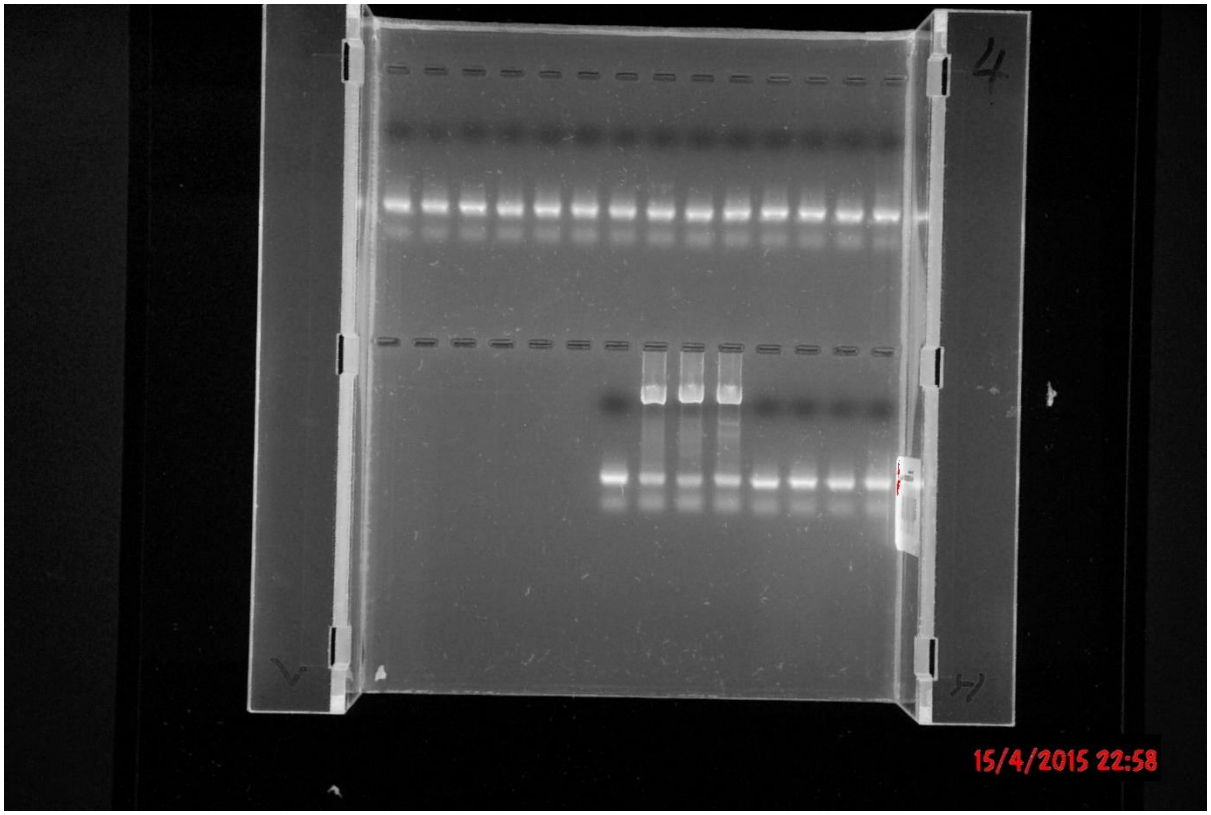
Bilde 7. Oktober 2012/Februar 2013. Kar 1. Positiv prøve; Brønn 1 Rad 2.



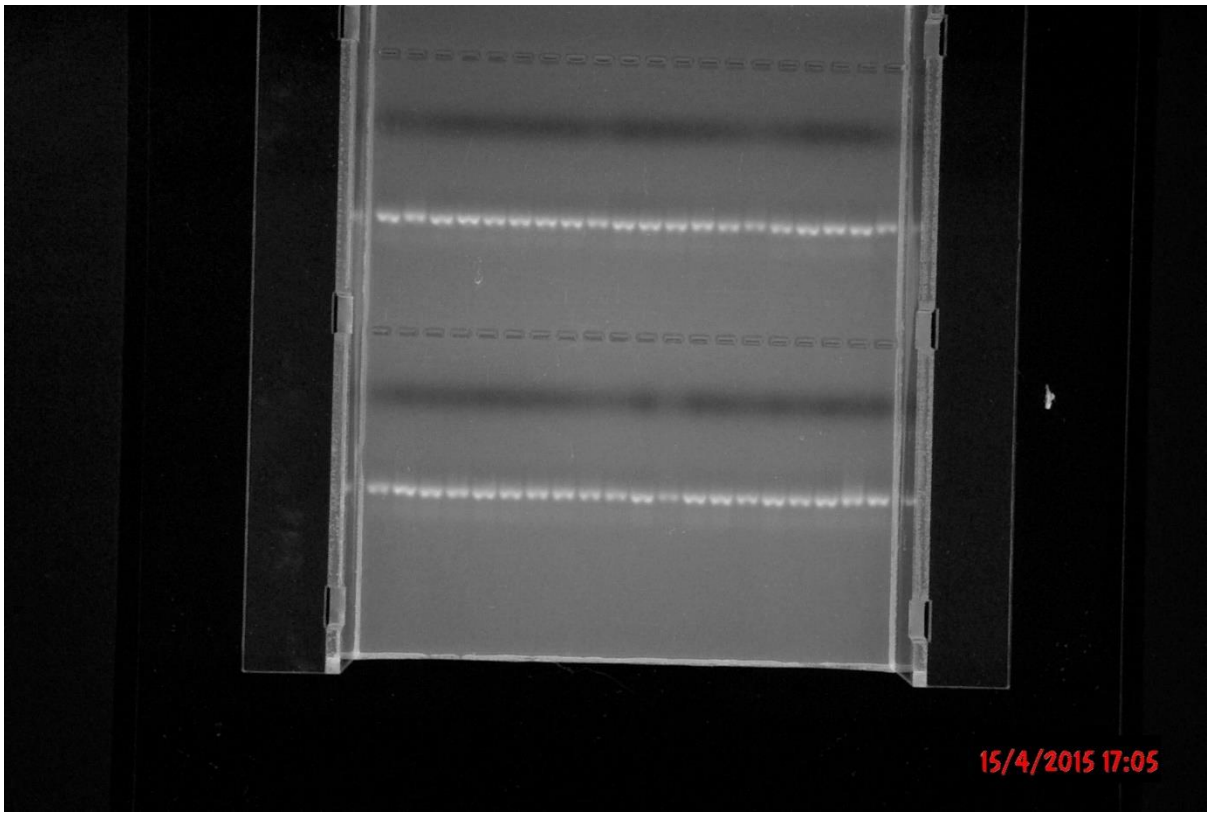
Bilde 8. Oktober 2012/Februar 2013. Kar 2. Ingen positive prøver.



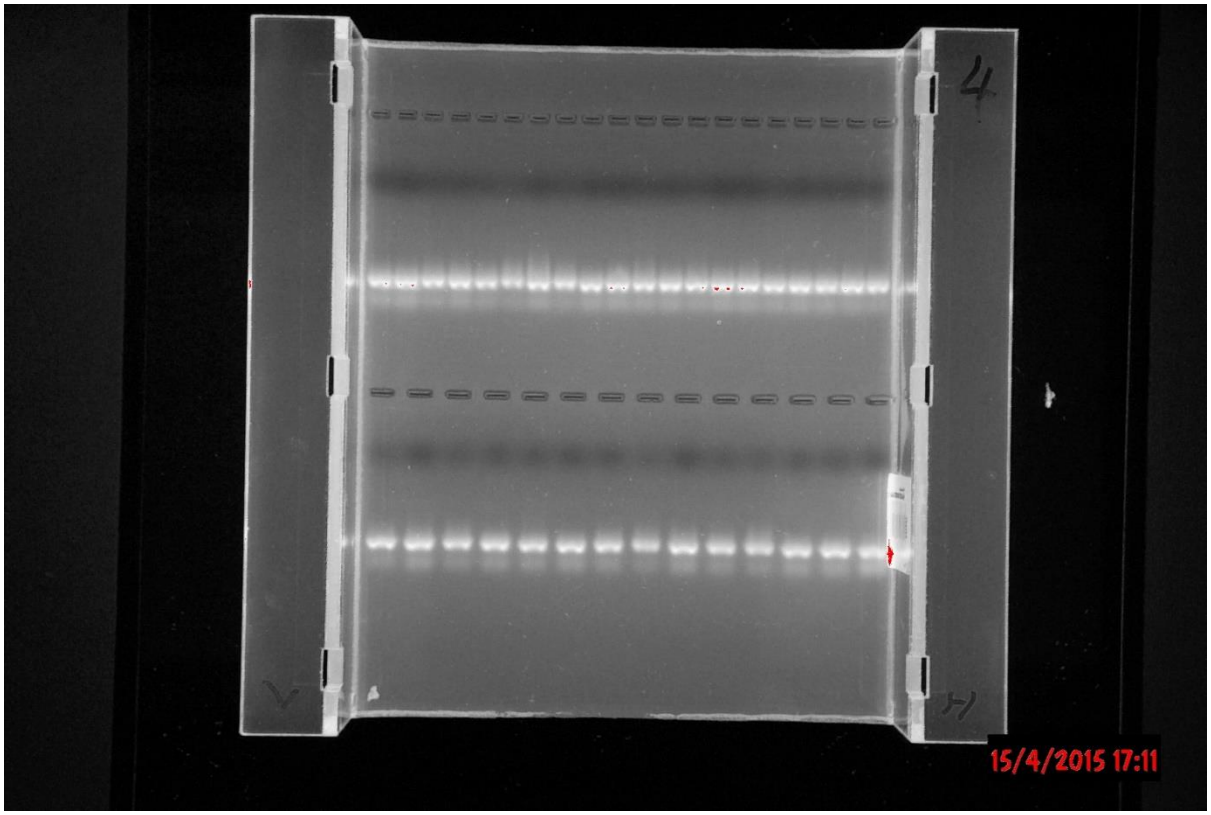
Bilde 9. Oktober 2012/Februar 2013. Kar 3. Ingen positive prøver.



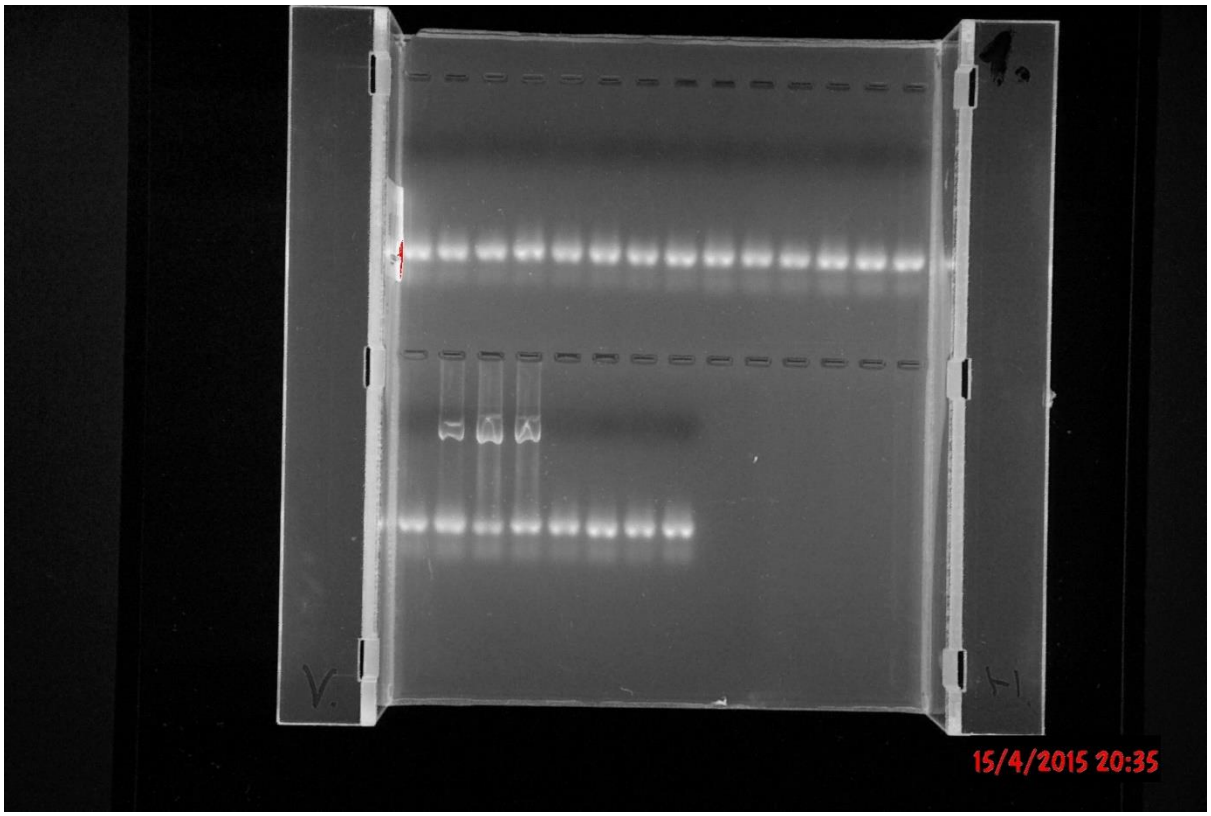
Bilde 10. Februar/Mars 2013. Kar 1. Ingen positive resultat.



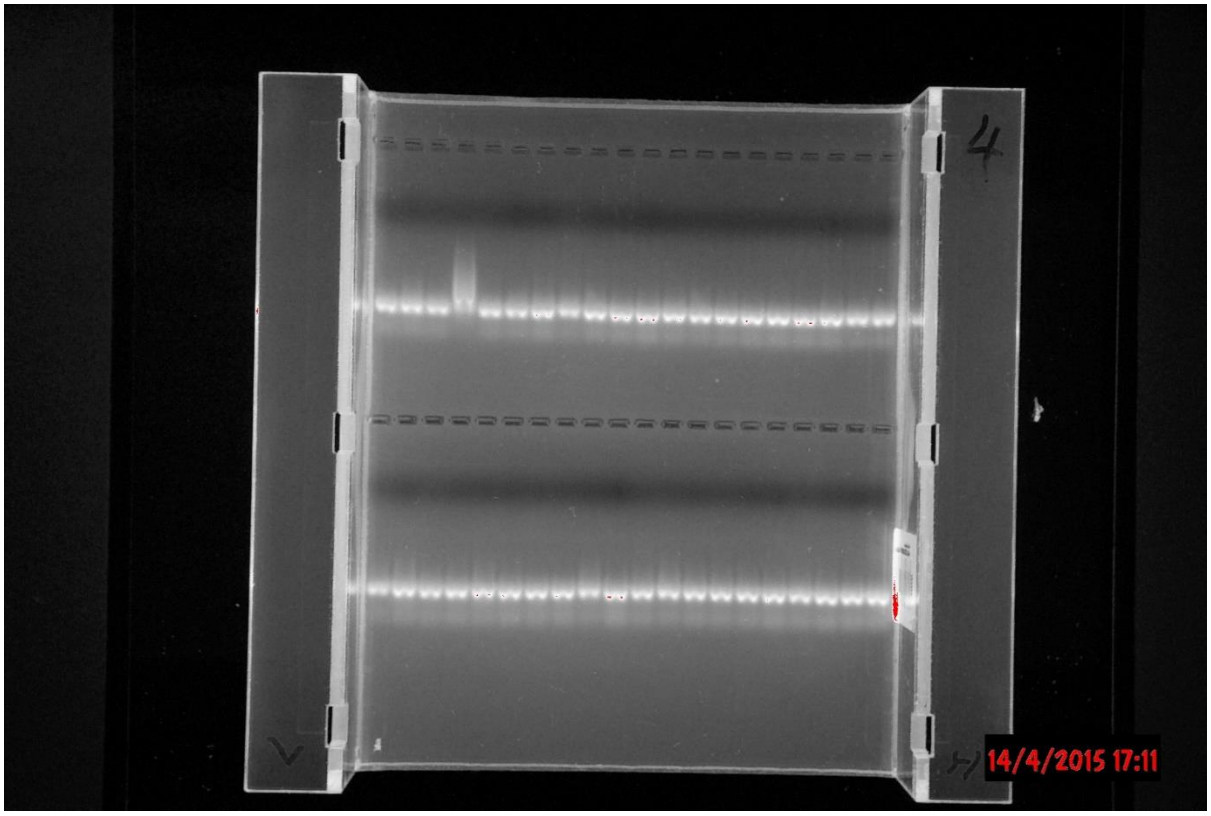
Bilde 11. Februar/Mars 2013. Kar 2. Ingen positive resultat.



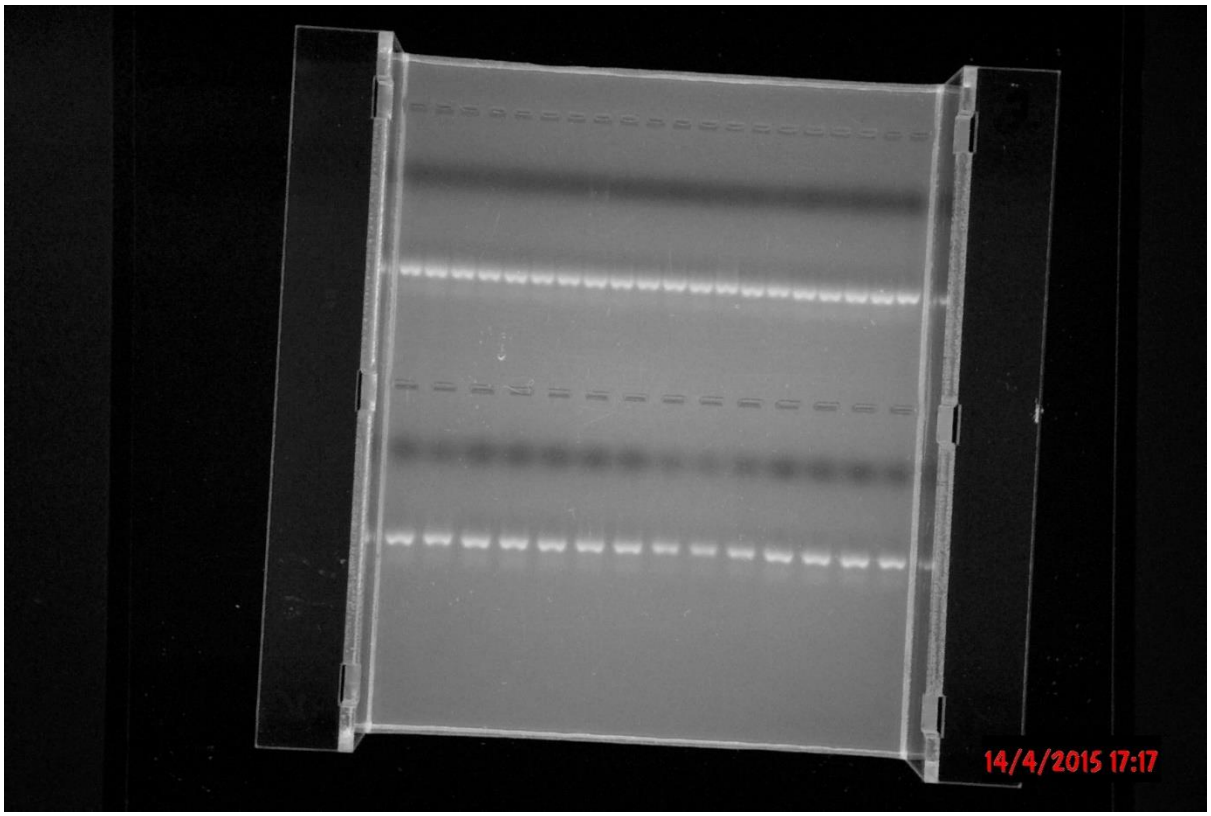
Bilde 12. Februar/Mars 2013. Kar 3. Ingen positive resultat.



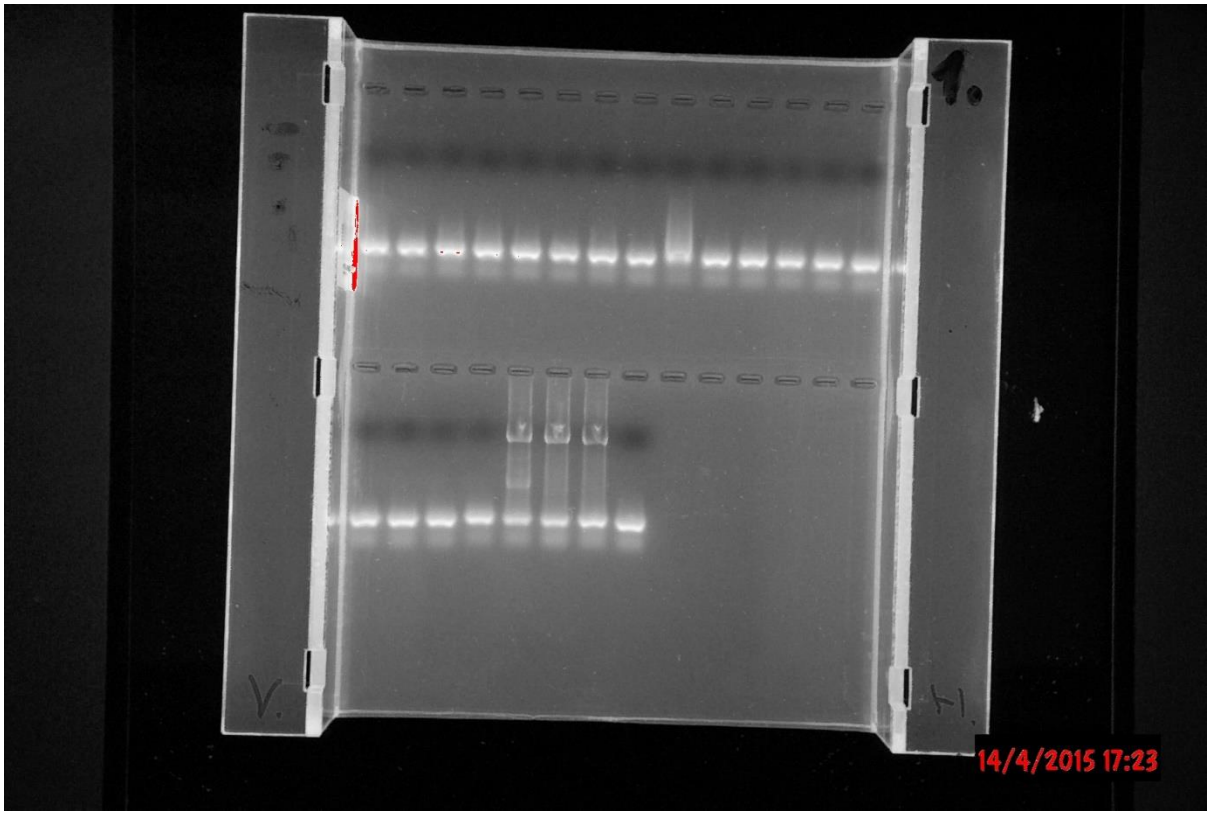
Bilde 13. April 2013. Kar 1. Ingen positive prøver.



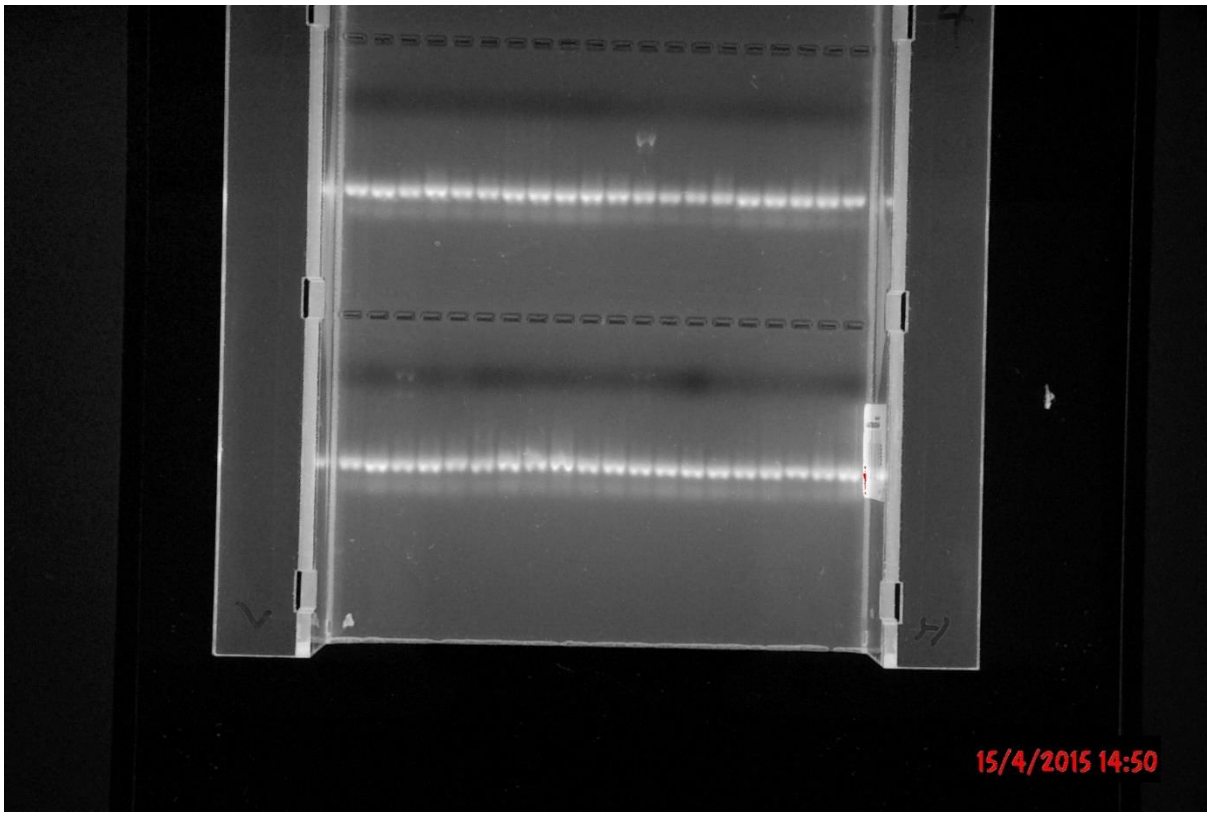
Bilde 14. April 2013. Kar 2. Positive prøver; Brønn 8 rad 1.



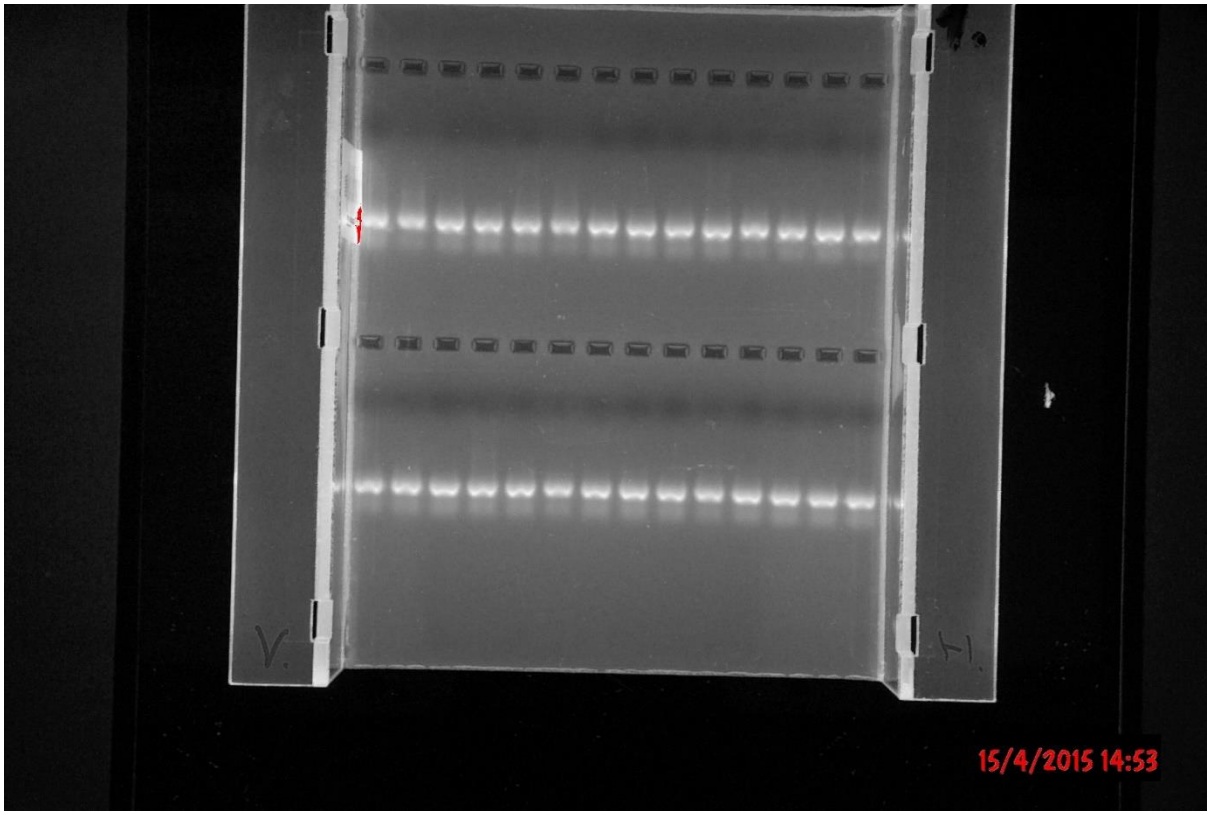
Bilde 15. April 2013. Kar 3. Ingen positive prøver.



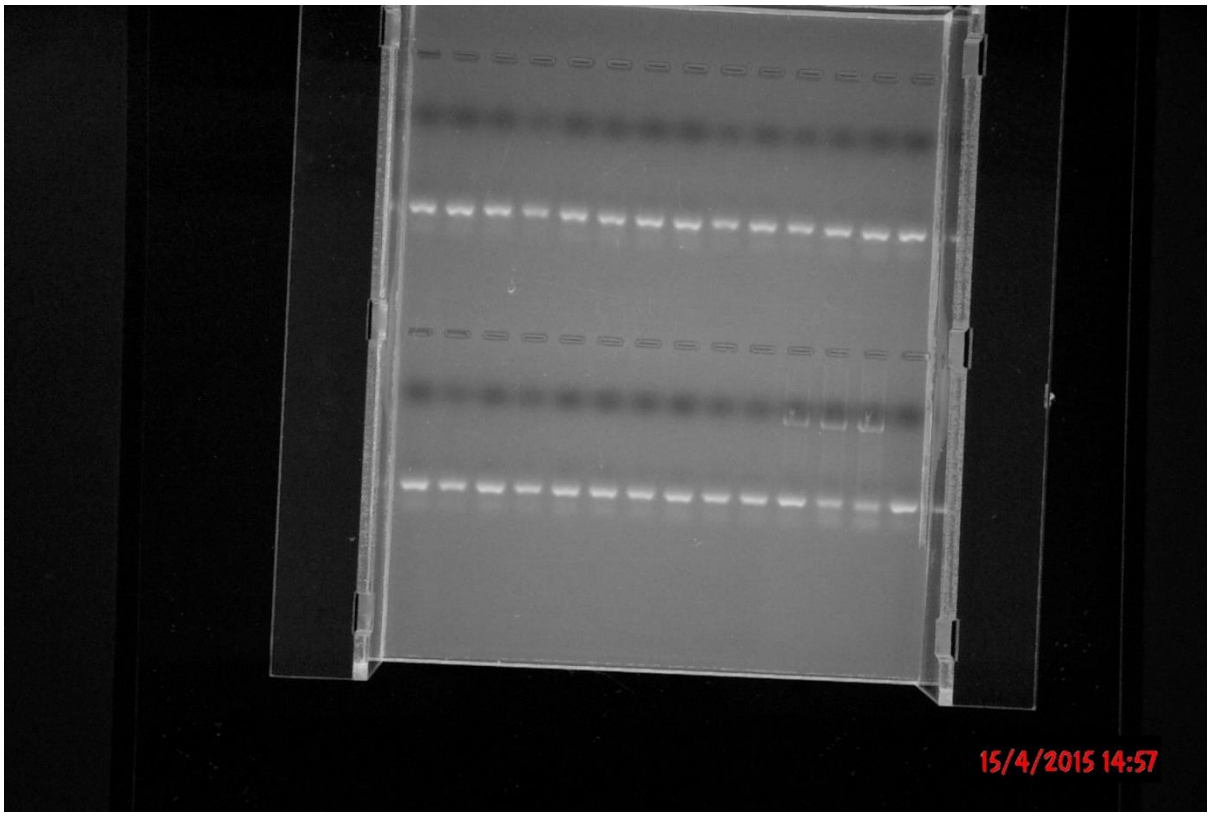
Bilde 16. Oktober/November 2013. Kar 1. Positive prøver; Brønn 12 Rad 1, Brønn 3 Rad 2.



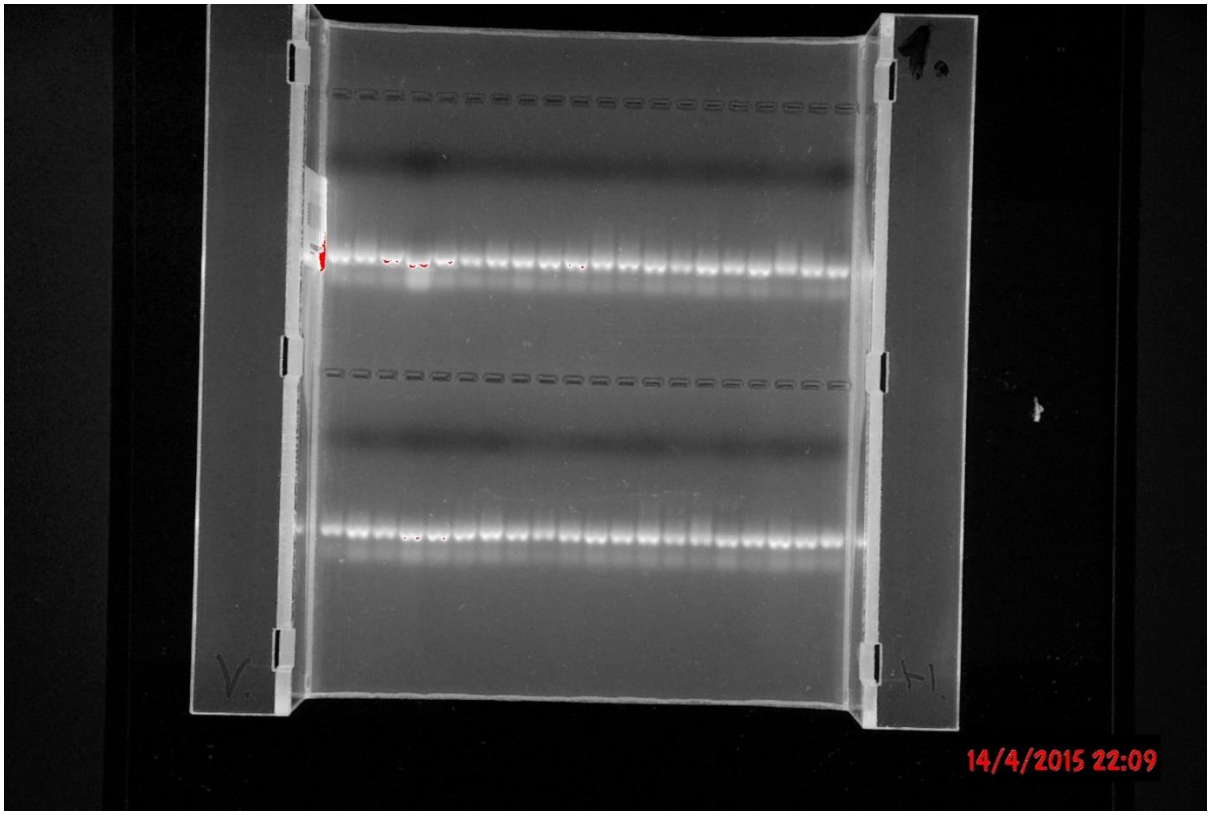
Bilde 17. Oktober/November 2013. Kar 2. Ingen positive prøver.



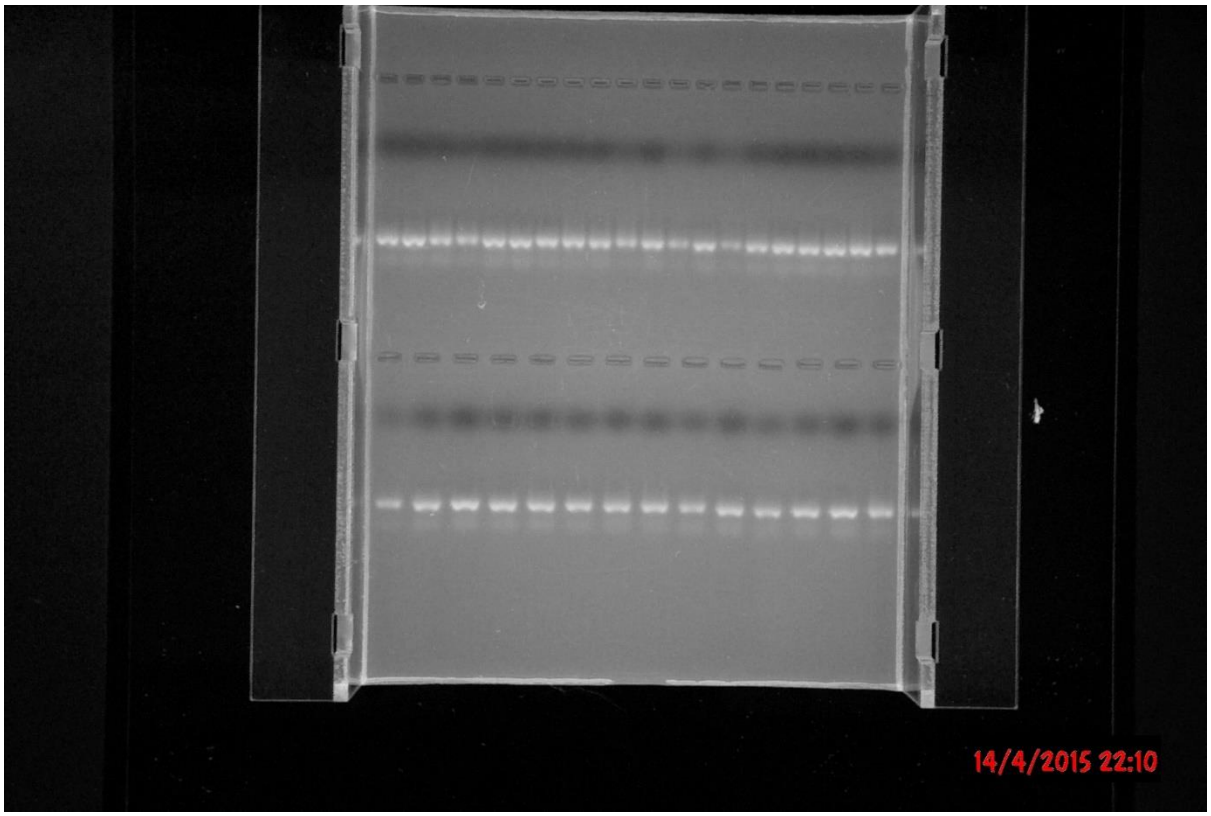
Bilde 18. Oktober/November 2013. Kar 3. Ingen positive prøver.



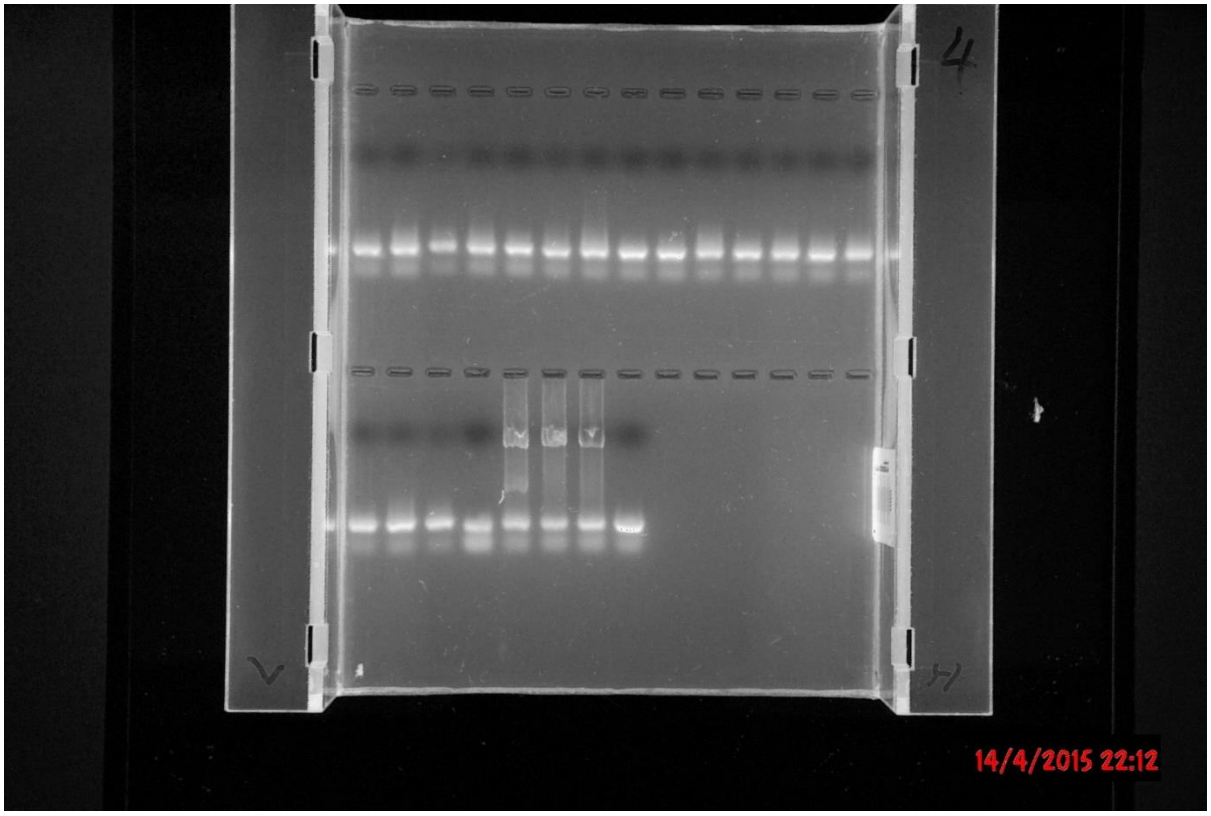
Bilde 19. Mars 2014. Kar 1. Ingen positive prøver.



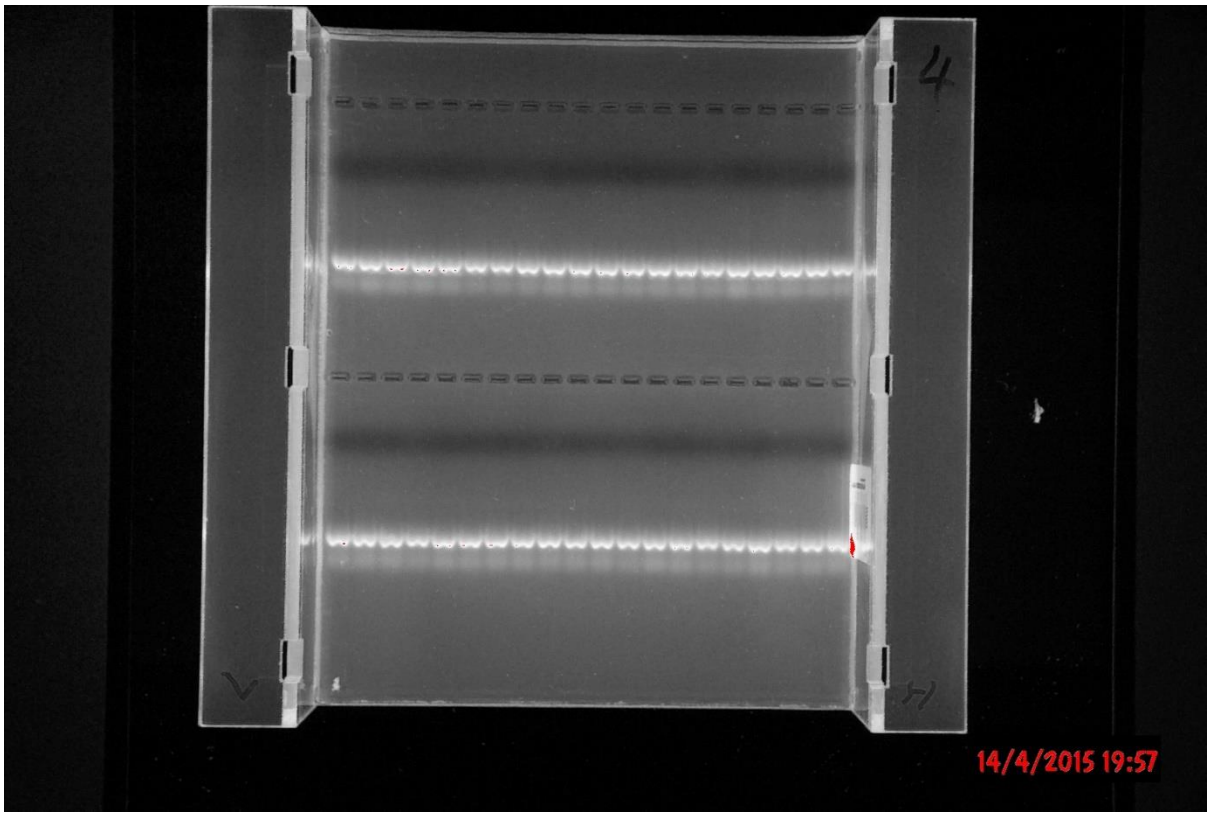
Bilde 20. Mars 2014. Kar 2. Ingen positive prøver.



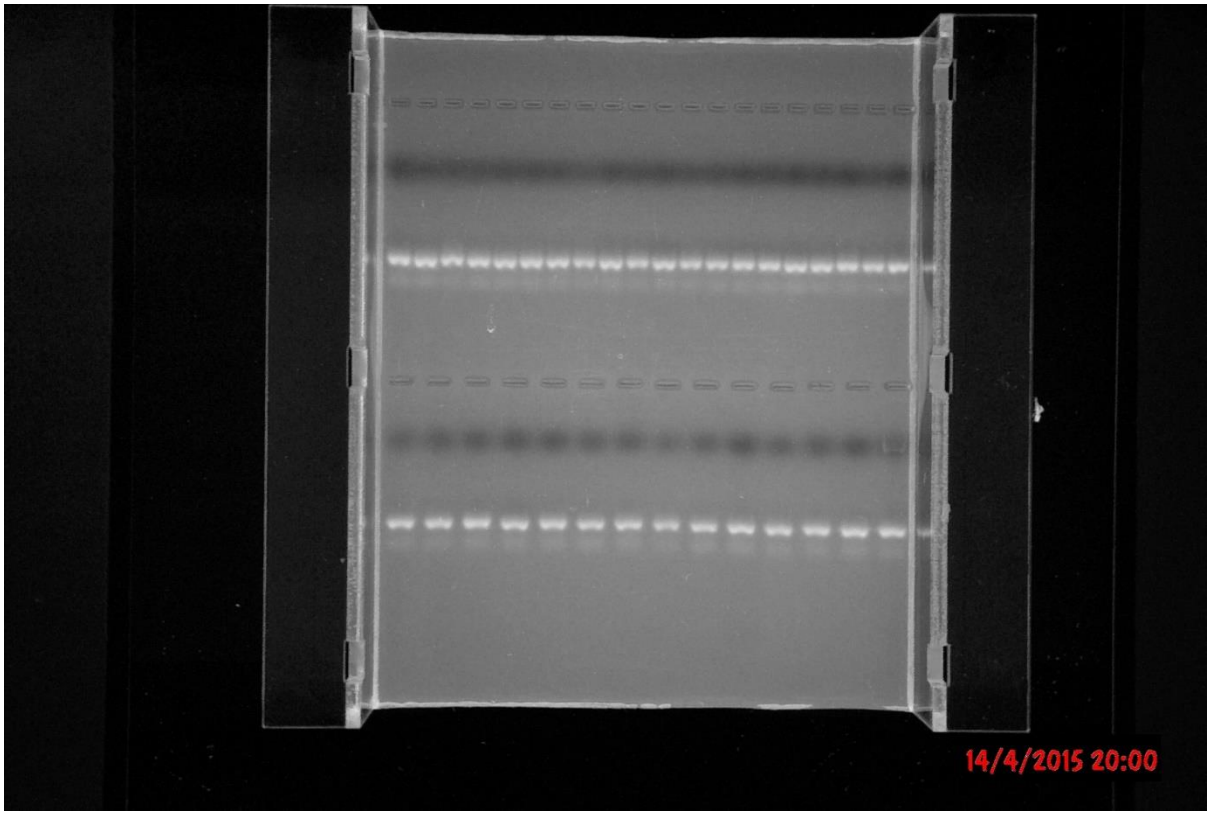
Bilde 21. Mars 2014. Kar 3. Ingen positive prøver.



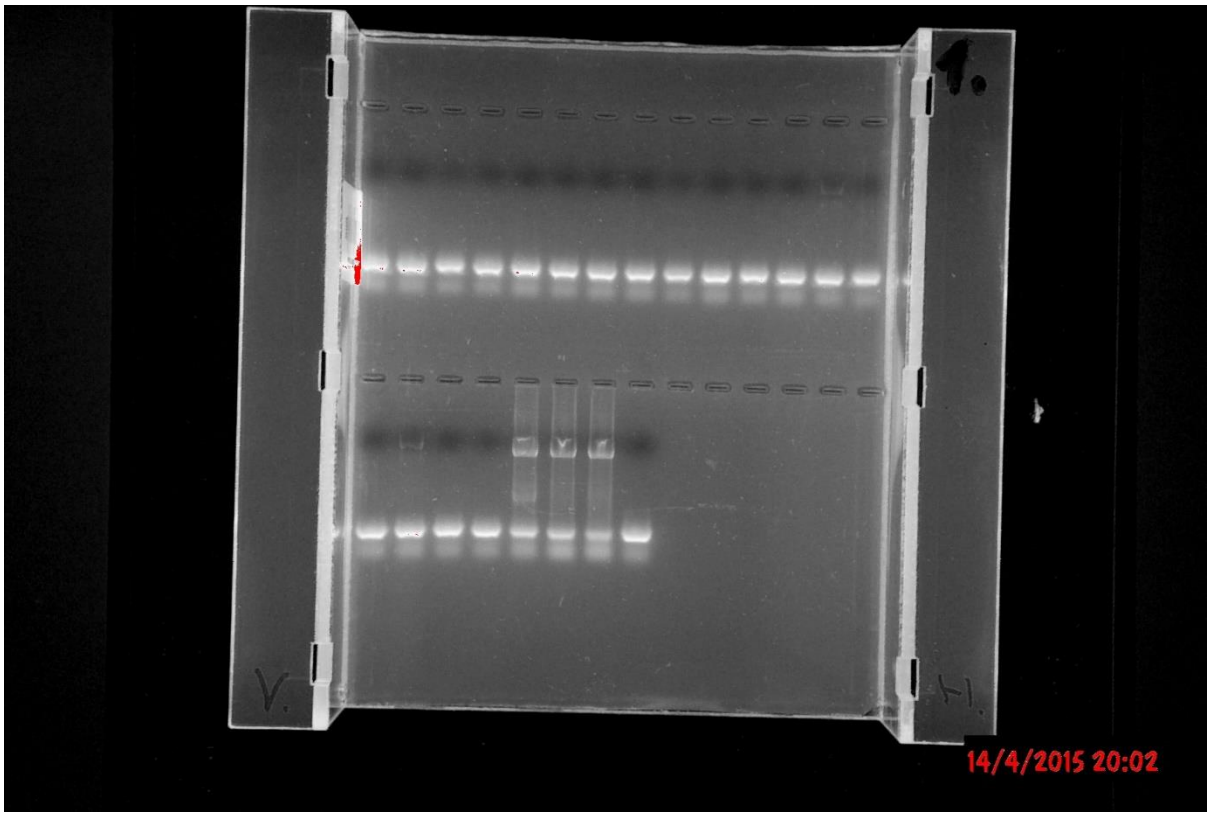
Bilde 22. April 2014. Kar 1. Ingen positive prøver.



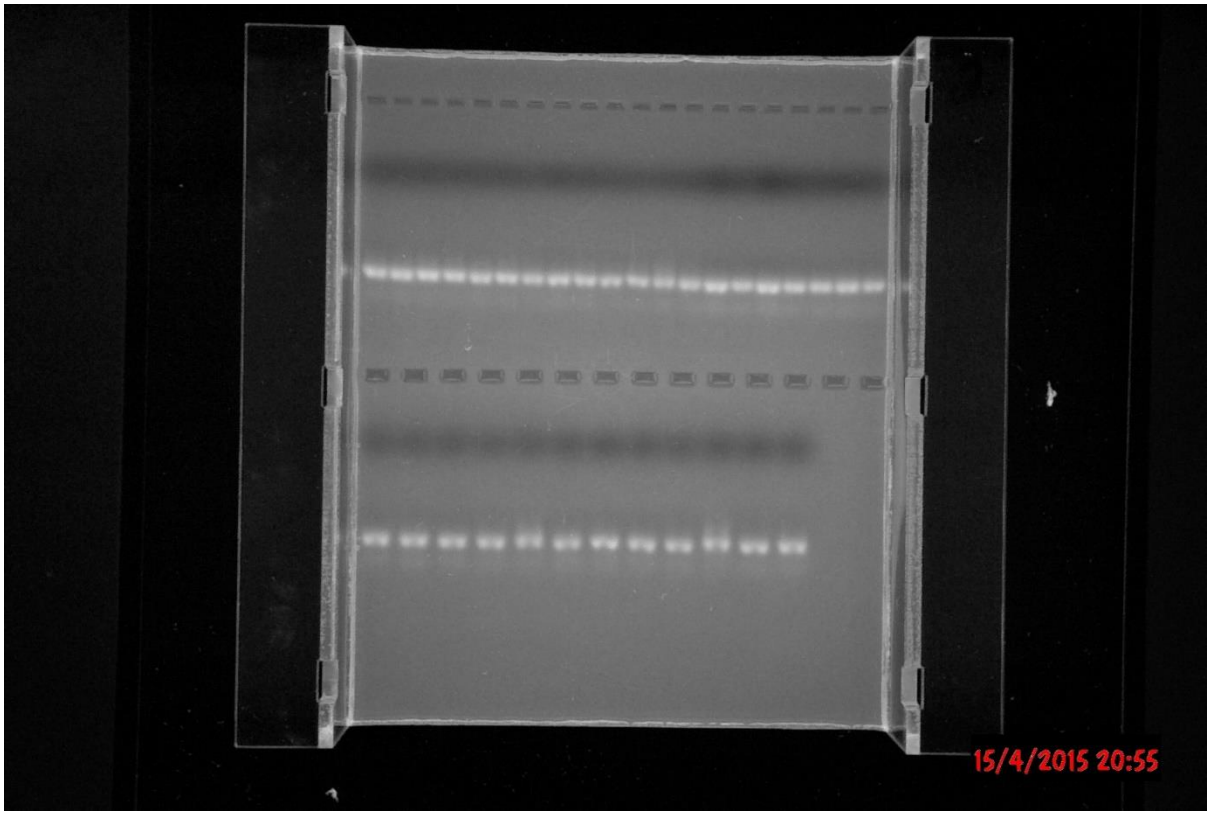
Bilde 23. April 2014. Positive prøver; Brønn 14 Rad 2.



Bilde 24. April 2014. Kar 3. Positive prøver; Brønn 13 Rad 1, Brønn 2 Rad 2.



Bilde 25. Restbrett. Ingen positive prøver.



PROSEDYRE:

AKT 0003 DNA isolering fra Ixodes ricinus flått

1 Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre prosedyren for DNA isolering fra Ixodes ricinus flått

2 Omfang

Omfatter DNA isolering fra Ixodes ricinus flått med DNeasy 96 well blood and tissue kit fra Qiagen

3 Bakgrunnsinformasjon

DNeasy (Qiagen):

Ferdig kit beregnet på å isolere DNA. Baserer seg på affiniteten nukleinsyrene får til en kolonne membran ved tilsetting av ulike buffere. Nukleinsyrene felles fra membran etter flere rensetrinn ved å tilsette 96% EtOH.

4 Utstyr og reagenser

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit	(4)	(12)
Catalog no.	69581	69582
Number of preps	4 x 96	12 x 96
DNeasy 96 Plates	4	12
S-Blocks*	2	2
Collection Microtubes, 1.2 ml (racked)	4 x 96	12 x 96
Collection Microtube Caps	2 x (120 x 8)	5 x (120 x 8)
Elution Microtubes RS (racked) and caps	4 x 96	12 x 96
AirPore Tape Sheets	25	3 x 25
Buffer AL[1]	86 ml	247 ml
Buffer ATL	80 ml	3 x 80 ml
Buffer AW1 (concentrate)[1,2]	98 ml	3 x 98 ml
Buffer AW2 (concentrate)[1,2]	68 ml	3 x 68 ml
Buffer AE	2 x 110 ml	500 ml
Proteinase K	2 x 7 ml	5 x 7 ml
96-Well-Plate Register	4	12
Handbook	1	1

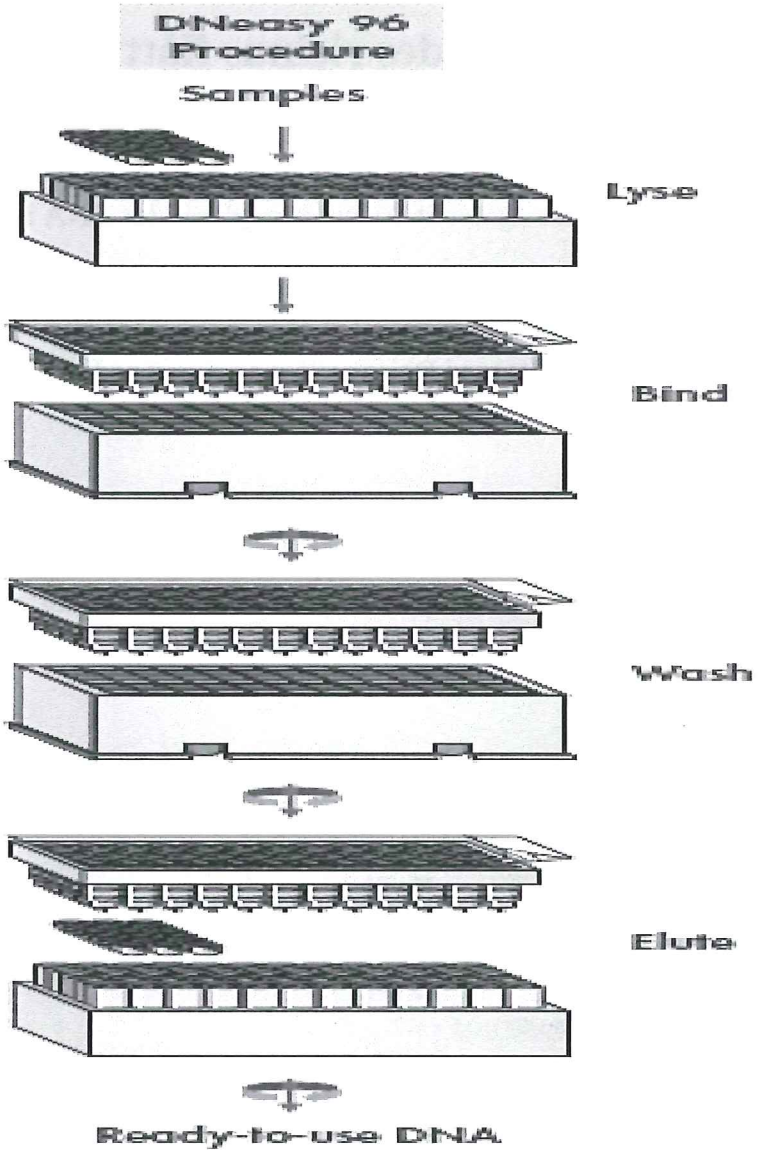
* Reusable; see Appendix B (page 54) for cleaning instructions.

[1] Contains a chaotropic salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. See page 8 for safety information.

[2] Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Add ethanol (96–100%) according to the bottle label before use to obtain a working solution.

[3] Contains sodium azide as a preservative.

5 Analyseprinsipp



6 Kvalitetskontroll

Basic Qubit® Fluorometric Quantitation Protocol

1. Prepare dye Working Solution in a plastic tube.

a. Use 200 µL of buffer for every sample.
b. Use 1 µL of dye for every sample.
c. Mix by vortexing.

2. Aliquot 190 µL of Working Solution into two assay tubes for standards (three for the protein assay).

3. Add 10 µL of each Standard to an assay tube and mix by vortexing.

4. Aliquot 180–199 µL of Working Solution into assay tubes for samples.

a. The assays tolerate 1–20 µL of sample per tube.
b. The final volume in each tube after adding sample should be 200 µL.

5. Add 1–20 µL of each sample to an assay tube and mix by vortexing.

6. Incubate 2 minutes (15 minutes for the protein assay).

7. Read the results in the Qubit® 2.0 Fluorometer.

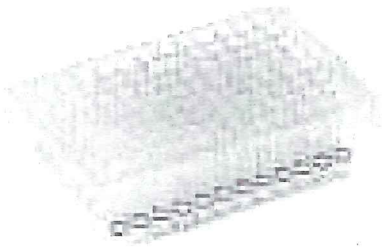
7 Prøvemateriale

Vasket Ixodes ricinus flått fordelt på 96 brønnsbrett

8 Arbeidsbeskrivelse

Prosedyre for isolering av DNA fra flått	
1 Merk 96 –well plate med nummer og angi på følgekort hvor flåtten stammer i fra og opphavet. 2 Fordel 5 mm steel beads, en kule i hvert rør. sett på korh ~~Pipetter 100 µL buffer ATL til hvert rør på 96 well brettet.~~ ~~180~~ 3 Tissuelyser i ~~2~~1x 5 min pr brett. 180 µl ATL 4 Sentrifuger 3500 RPM i 10 min 5 Pipetter ~~80 µL~~ buffer ATL og 20 µL proteinase K La stå i ~~180~~ min ved 56°C 30-50 min ~~Tissuelyser i 2x 5 min pr brett.~~	

3 - ! etter 180 µl ATL er tilsatt brønnene, vortex lett, sentrifuger (3-5 min)
- Tilsett deretter 20 µl proteinase K

Tilsett 100 µL buffer AL (uten etanol), vortex og inkuber ved 70 ° i 10 minutt. Så tilsett 230 µl etanol (96–100%), og miks ved vortex.	 * Kolonne
Overfør så denne løsningen til kolonnen som står på samlebrett for sentrifugering. Sentrifuger i 8 minutt ved 3500 rpm Tilsett så 500 µL AW1 Sentrifuger i 4 minutt ved 3500 rpm Tilsett så 500 µL AW2 Sentrifuger i 20 minutt ved 3500 rpm Overfør kolonner til brett for oppsamling av DNA, Elution Microtubes RS	Eluo + (1-13) hvit klump → PCR plate
Tilsett så 125 µL buffer AE, inkuber i romtemperatur i 1 minutt, Sentrifuger i 4 minutt ved 3500 rpm Tilsett så 50 µL buffer AE, inkuber i romtemperatur i 1 minutt, Sentrifuger i 4 minutt ved 3500 rpm	

9 Feilkilder

Pipettering feil

10 Resultatvurdering

Kvalitetsbekreftelse fra Qubit analyse eller qPCR resultat

Vedlegg 3

PROSEDYRE:

Vaskell

Anaplasma?

AKT 0002: DNA isolering fra dyrket reinkultur Borrelia

1 Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre DNA isolering fra dyrket reinkultur av Borrelia

2 Omfang

Prosedyrens gyldighetsområde.

3 Bakgrunnsinformasjon

DNeasy (Qiagen):

Ferdig kit beregnet på å isolere DNA. Baserer seg på affiniteten nukleinsyrene får til en kolonne membran ved tilsetting av ulike buffere. Nukleinsyrene felles fra membran etter flere rense trinn ved å tilsette 96% EtOH.

4 Utstyr og reagenser

DNeasy Blood & Tissue Kit	(50)	(250)
Catalog no.	69504	69506
Number of preps	50	250
DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes	50	250
Collection Tubes (2 ml)	100	500
Buffer ATL	10 ml	50 ml
Buffer AL*	12 ml	54 ml
Buffer AW1 (concentrate)*†	19 ml	95 ml
Buffer AW2 (concentrate)††	13 ml	66 ml
Buffer AE	22 ml	2 x 60 ml
Proteinase K	1.25 ml	6 ml
Handbook	1	1

* Contains a chaotropic salt. Not compatible with disinfecting agents containing bleach. See page 8 for safety information.

† Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Add ethanol (96–100%) according to the bottle label before use to obtain a working solution.

†† Contains sodium azide as a preservative.

5 Analyseprinsipp

6 Kvalitetskontroll

Basic Qubit® Fluorometric Quantitation Protocol

1. Prepare dye Working Solution in a plastic tube.

a. Use 200 µL of buffer for every sample.
b. Use 1 µL of dye for every sample.
c. Mix by vortexing.

2. Aliquot 190 µL of Working Solution into two assay tubes for standards (three for the protein assay).

3. Add 10 µL of each Standard to an assay tube and mix by vortexing.

4. Aliquot 180–199 µL of Working Solution into assay tubes for samples.

a. The assays tolerate 1–20 µL of sample per tube.
b. The final volume in each tube after adding sample should be 200 µL.

5. Add 1–20 µL of each sample to an assay tube and mix by vortexing.

6. Incubate 2 minutes (15 minutes for the protein assay).

7. Read the results in the Qubit® 2.0 Fluorometer.

7 Prøvemateriale

Ren kultur dyrket etter protokoll AKT 0001.

8 Arbeidsbeskrivelse

Procedure

1. Harvest cells (maximum 2 x 109 cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm). Discard supernatant.

2. Resuspend bacterial pellet in 180 µl enzymatic lysis buffer.

3. Incubate for at least 30 min at 37°C.

After incubation, heat the heating block or water bath to 56°C if it is to be used for the incubation in step 5.

4. Add 25 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL (without ethanol). Mix by vortexing.

Note: Do not add proteinase K directly to Buffer AL.

Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18).

Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).

5. Incubate at 56°C for 30 min.

Optional: If required, incubate at 95°C for 15 min to inactivate pathogens. Note that incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing.

It is important that the sample and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the DNeasy Mini spin column. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure.

7. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at _6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.*

8. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 µl Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at _6000 x g (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.*

9. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 µl Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at 20,000 x g (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

10. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 100 µl Buffer AE directly onto the DNeasy membrane.
Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at _6000 x g (8000 rpm) to elute.

Elution with 100 µl (instead of 200 µl) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield

11. Pipet 100 µl Buffer AE directly onto the DNeasy membrane.
Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at _6000 x g (8000 rpm) to elute.

This step leads to increased overall DNA yield.
A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 µl into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

9 Feilkilder

Pipettering feil

10 Resultatvurdering

Kvalitets måling

PROSEDYRE:

AKT 00xx PCR for påvisning av Borrelia burgdorferi s.l.

1 Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre PCR for påvisning av Borrelia burgdorferi s.l.

2 Omfang

Prosedyrens omfatter amplifisering av DNA isolat fra flått til PCR for påvisning av Borrelia burgdorferi s.l.

3 Bakgrunnsinformasjon

Amplifisering av DNA fragmenter fra Borrelia burgdorferi s. l.

Syklisk reaksjon som gjennomføres i tre trinn:

Denaturering (95°C) – skiller DNA helix

Hybridisering (55 - 65°C) – Primer fester seg til DNA

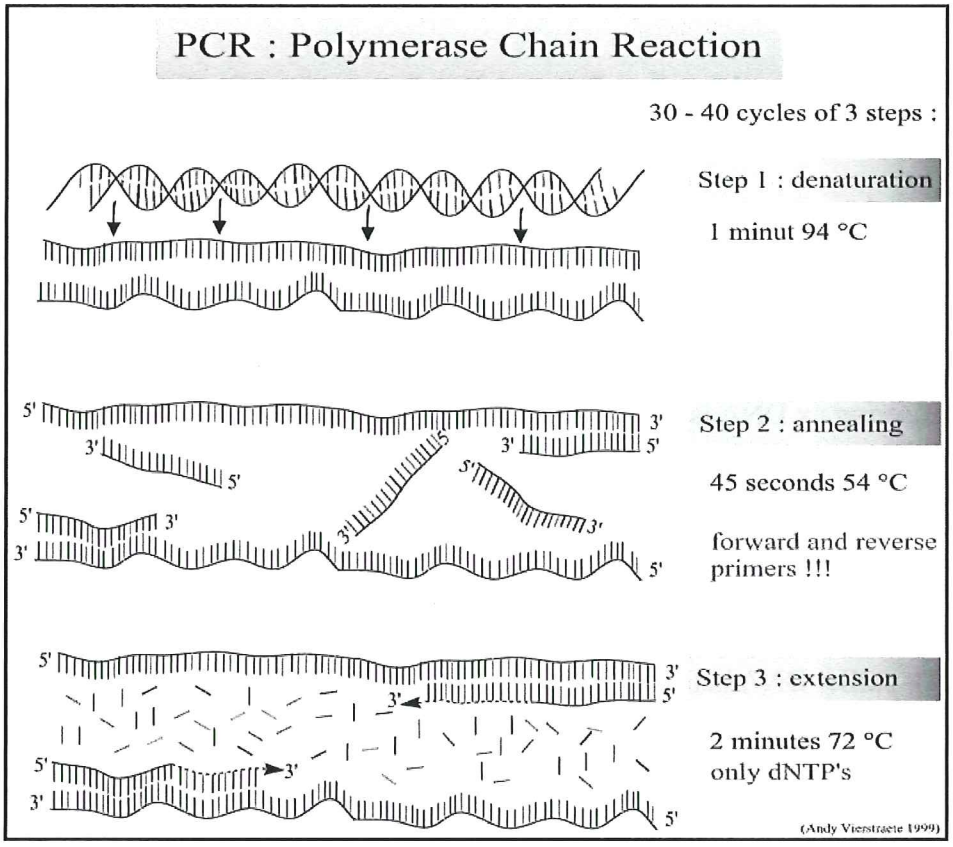
Polymerisering (72°C) – DNA tråd syntetiseres, optimal temperatur for Polymerase

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

4 Utstyr og reagenser

Utstyret som trengs for å utføre prosedyren, samt alle reagenser som trengs for å gjennomføre analysen.

5 Analyseprinsipp



6 Kvalitetskontroll

Analysen kvalitetssikres gjennom bruk av positiv kontroll laget av DNA isolert fra dyrket Borrelia stamme.

7 Primer

gene (number*)	Primer 5' to 3'	Primer name	Product Length
nifS **(BB0084)**	seminested		
Inner forward	same as outer forward		
Inner reverse	GTTGGAGCAAGCATTTTATG	nifR719	**719**
Outer forward	ATGGATTTCAAACAAATAAAAAG	nifF1	
Outer reverse	GATATTATTGAATTTCTTTTAAG	nifSR1049	

8 Arbeidsbeskrivelse

1. Regn ut og bland mastermiks til ___ antall prøver etter følgende tabell:

Tabell for tillaging av mastermiks:

Komponent	Start konsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase VWR	2x	10µL		1x
Primer fwd (5')	10µM	2µL		1µM
Primer rwd (3')	10µM	2µL		1µM
$MgCl_2$	25mM	0,8 µL		2,5mM
dH_2O	nukleasefritt	3,2µL		-

2. Fordel 18µL mastermiks til hvert PCR rør, mastermiksen holdes avkjølt ved å plassere stativet på en boks med is under pipettering.
3. Tilsett 2 µL templat DNA til hvert rør på en qPCR plate. Husk å merke godt hvilket templat DNA som tilsettes i hvert rør. IKKE TIL NEGATIV KONTROLL.
4. Negativ kontroll skal kun bestå av mastermiks som en intern kontroll på at ikke mastermiksen har blitt forurenset av DNA.
5. Vortex lett og spinn med på plate- sentrifuge.
6. Analyseres med følgende program:

Outer primers:

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Innledende denaturering	95°C	10 minutter	1 syklus
Denaturering Annealing - touchdown Elongation	95°C 55-48°C 72°C	20 sekunder 30 sekunder 60 sekunder	1 sykluser
Denaturering Annealing Elongation	95°C 48°C 72°C	20 sekunder 30 sekunder 60 sekunder	20 sykluser
Elongation	72°C	10 minutter	1 syklus

Smeltepunktsanalyse	95°C - 50°C- 95°C		

Inner primers:

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Innledende denaturering	95°C	10 minutter	1 syklus
Denaturering Annealing Elongation	95°C 56°C/54°C 72°C	30 sekunder 45 sekunder 60 sekunder	45 sykluser
Elongation	72°C	10 minutter	1 syklus

9 Feilkilder

Feil ved pipettering
Forurensing av mastermiks

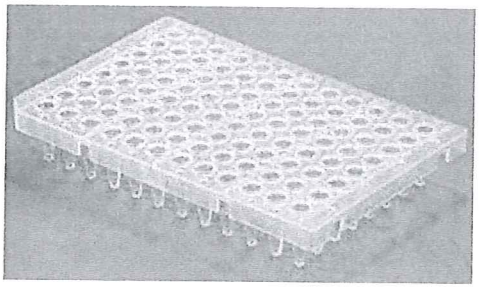
10 Resultatvurdering

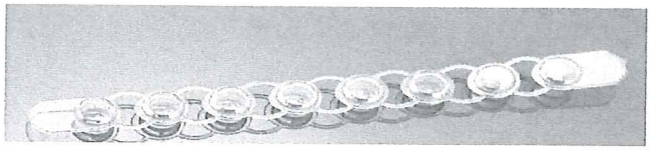
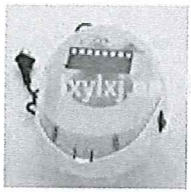
Resultatet vurderes ved å visualisere på agarose gel, vurderes mot positiv kontroll prøve

Prøve nummer	nifS

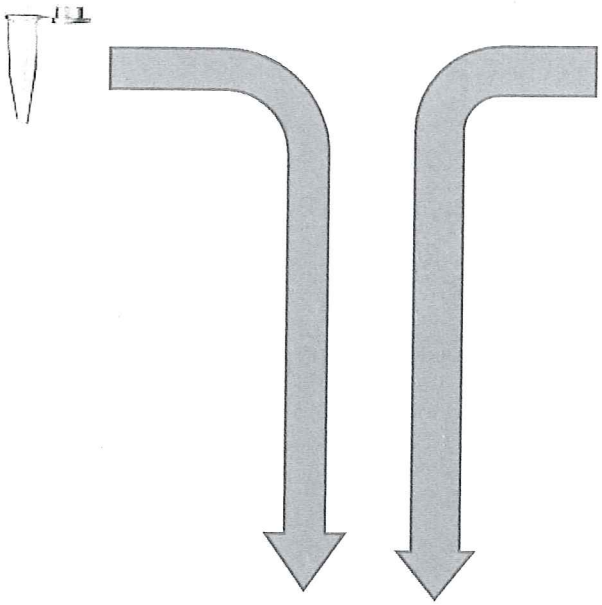
Vedlegg 5

PCR (vanlig)

Steg	Beskrivelse	Utstyr
1	Bland mastermiks etter prosedyre: • Polymerase • MgCl2 • Primer F • Primer R • ddH2O	Blandes i eppendorf- rør: Eller:
2	Fordele mastermiks i oppgitt mengde, (normalt 8,5uL eller 13 uL) se prosedyre for nøyaktig mengde	Fordeles på PCR rør (hivs man har få prøver) Eller på PCR plate uten kant (hvis man har 96 prøver). 
3	Tilsett templat DNA. HUSK: kun 1 DNA prøve pr. rør. DNA pipetteres ut fra eppendorf- rør eller plate avhengig av hvordan DNA er ekstrahert. 1 -2 uL DNA pipetteres ut fra oppbevaringskilde og over i PCR rør eller PCR plate som er tilsatt mastermiks. HUSK: Ingenting må forurense DNA, så det skal KUN pipetteres ut fra DNA prøven.	DNA fra enten: Eller plate:

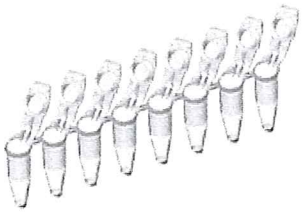
4	Lukk igjen lokk på rør eller bruk strips til å dekke over platen.	
5	Spinn ned og bland godt mastermiks og DNA	 For plater:
6	Sett prøvene i PCR maskin og programmer i henhold til prosedyre.	

Mastermiks

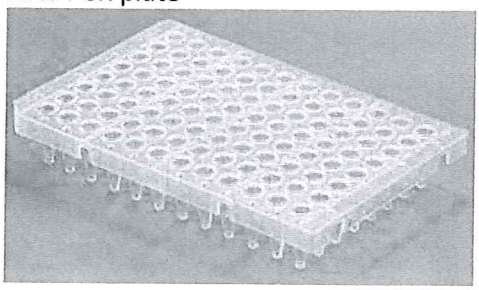


DNA

Pipetteres til enten:
PCR rør



Eller PCR plate



PROSEDYRE:

AKT 00015 Agarose gel farget med GelRedTM

1 Formål

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

2 Omfang

Prosedyren gjelder for PCR produkt amplifisert ved HiÅ PCR lab.

3 Bakgrunnsinformasjon

Biokjemisk teknikk som benytter elektriskfelt til å separere organiske molekylær, skille i hovedsak DNA fragmenter på størrelse
Det finnes to hovedtyper av gelmateriale som brukes ved separasjon av DNA: polyakrylamid og agarose. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. For å skille store DNA-fragmenter brukes lav konsentrasjon av agarose.

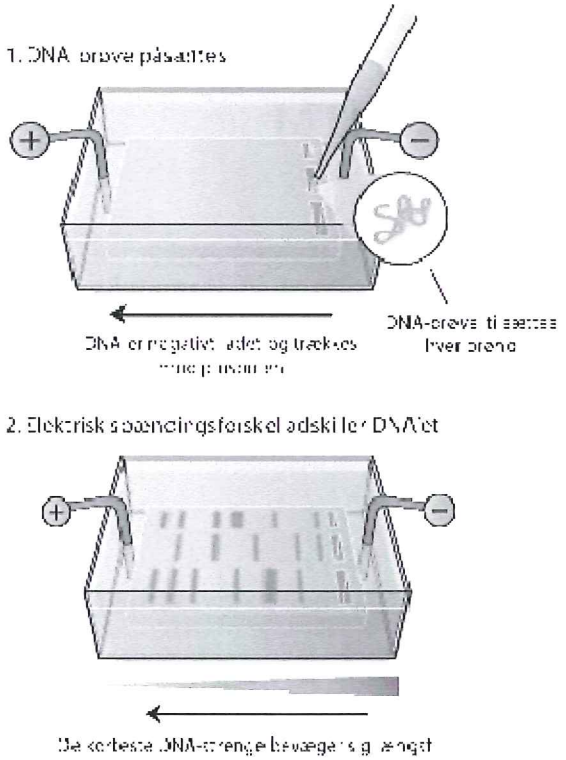
4 Utstyr og reagenser

Loading dye
Agarose pulver
1x TAE buffer
GelRed TM
Erlendmeyer kolbe
Termometer

DNA overføres direkte fra PCR plate

5 Analyseprinsipp

- tickless



6 Kvalitetskontroll

Positiv og negativ kontroll fra PCR analysen

7 Prøvemateriale

PCR produkt

8 Arbeidsbeskrivelse

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

3. Blandes i en 500mL erlenmeyerkolbe

4. Kokes ved fullstyrke i mikrobølgeovn i 2 minutter (Til den er klar)

5. Ta forsiktig ut → OBS!! Kan sprutkoke ved omrøring

6. Rør forsiktig om og sjekk at all agarose er oppløst

7. Tilsett 1,0 uL GelRed! Rør forsiktig om slik at fargestoffet fordeler seg likt i væsken

8. Kjøles ned til 65 °C (Gel må ikke dannes i EM-kolbene; flytende agar)

9. Overfør agarose til gelkar, sett i kammer og la stivne

10. Tilsett 1 ul loading dye (LD) til 3 ul PCR prøve. (Tilsettes dir. 2ul PCR-plate

11. 3 ul prøve tilsettes brønnene (Blandingsforhold 1/4)

12. La stå med spenning 45 min ved 100V

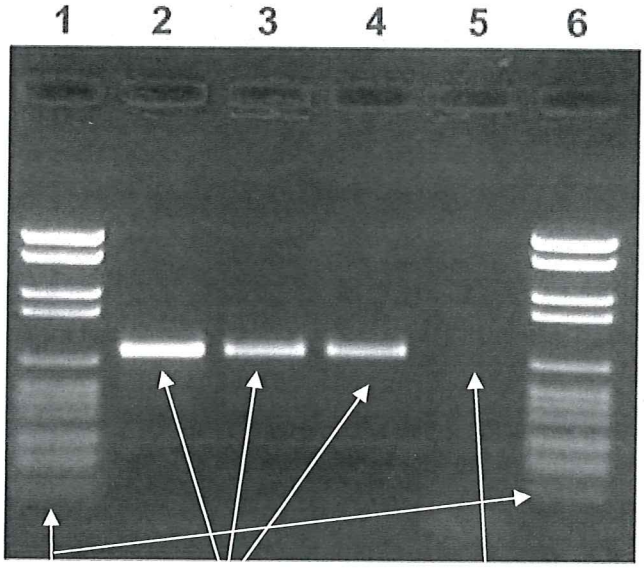
13. Overfør fra elektroforesekar til UV lampe og ta bilde

↳ kan bruke samme spyss om den skylles i TAE-buffer på siden av gelen. Bruk samme spyss max to ganger.

9 Feilkilder

Skjev gel
Feil buffer
Varierende spenning

10 Resultatvurdering



ladder positive negativ