

10011

Optimalisering av metode for biodiversitet analyse med ITS som målgen

Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Juni 2023

10011

Optimalisering av metode for biodiversitet analyse med ITS som målgen

Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Ann-Kristin Tveten
Juni 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Dette forsøket tar sikte på å optimalisere ITS (Internal Transcribed Spacer) gen-amplifisering for videre biodiversitetanalyse, med søkelys på å bidra til kartlegging av fremmede arter som kommer inn i Norge gjennom planteimport. Biodiversitet er en av flere avgjørende faktorer for økosystemets funksjonalitet, og overvåkning og identifisering av fremmede arter som kan true det biologiske mangfoldet er derfor viktig.

DNA metabarcoding er en effektiv metode for identifisering av organismer basert på de genetiske signaturene deres. I denne studien ble polymerase kjedereaksjon (PCR) benyttet til å amplifisere ITS genet fra planteprøver for videre artsidentifisering ved bruk av DNA metabarcoding. Målet med studien er å optimalisere denne reaksjonen ved å undersøke ulike variablers effekt på utbyttet av PCR. Variablene som ble undersøkt inkluderte tilsetning av dimetylsulfoksid (DMSO) og magnesiumklorid ($MgCl_2$), ulike konsentrasjoner av tilsatt templat-DNA og primerløsning og endringer i PCR-reaksjonens hybridiseringstemperatur. Disse variablene ble systemisk manipulert for å finne den optimale kombinasjonen som resulterte i best amplifikasjonsutbytte. Resultatene av eksperimentet bidro til å finne de mest gunstige betingelsene for amplifisering av ITS, og ved å optimalisere PCR-prosessen kan kartleggingen av fremmede arter som potensielt truer norsk biodiversitet forbedres. Forsøket bidrar med innsikt i metodene for å indentifisere og overvåke introduksjonen av fremmede arter ved hjelp av genomisk gjenkjenning, og resultatene kan være nyttige for videre forskning og utvikling av disse metodene.

Abstract

This experiment aims to optimize ITS (Internal Transcribed Spacer) gene amplification for further biodiversity analysis, with a focus on contributing to the mapping of foreign species that enter Norway through plant importation. Biodiversity is one of several decisive factors for the functionality of an ecosystem, and monitoring and identification of foreign species that may threaten biodiversity is therefore important.

DNA metabarcoding is an effective method for identifying organisms based on their genetic signatures. In this study polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the ITS gene from plant samples for further species identification by use of DNA metabarcoding. The aim of the study was to optimize this reaction by investigating the effects of various variables to the PCR-yield. The variables investigated included the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) and magnesium chloride ($MgCl_2$), different concentrations of added template-DNA and primer solution, and changes in the PCR annealing temperature. These variables were systematically manipulated to find the optimal combination that resulted in the best amplification yield. The results of the experiment helped to find the most favourable conditions for amplification of ITS, and by optimizing the PCR-process, the mapping of foreign species and invasive species that can potentially threaten Norwegian biodiversity can be improved. The experiment contributes insight into the methods for identifying and monitoring the introduction of foreign species using genomic recognition, and the results may be useful for further research and development of these methods.

Innhold

Sammendrag	1
Abstract	2
Innledning.....	4
Teori.....	5
Metoder for å identifisere fremmede arter	6
Problemstilling.....	7
Polymerase kjedereaksjon (PCR)	7
Målgen.....	8
Gelelektroforese	9
Optimalisering	10
Temperatur	10
Primere og primerkonsentrasjon.....	11
DNA-konsentrasjon.....	13
Magnesiumklorid (MgCl ₂).....	13
DMSO (Dimetylsulfoxid)	14
Metoder og materialer	15
Forsøksdesign	15
Gelelektroforese	21
Resultater.....	23
Diskusjon.....	26
DNA-konsentrasjon.....	26
Prøver behandlet med touchdown-metoden	26
Prøver behandlet med 55°C	28
Prøver behandlet med 56°C	28
Prøver behandlet med 57°C	29
Tilsetningsreagenser.....	29
Forsøk utført med mest gunstige metode	31
Konklusjon	33
Referanser.....	34
Vedlegg: Volum- og konsentrasjonsutregninger.....	40

Innledning

Biodiversitet, eller biologisk mangfold, viser til den komplekse variasjonen av alle former for liv i et økosystem, og hvordan disse artene påvirker hverandre gjennom økologiske effekter som opprettholder balanse og liv i systemet. [1] Et stort antall arter og organismer påvirker hverandre i store økosystemer gjennom komplekse næringsnett og -kjeder, som er avgjørende for opprettholdelsen av planetens mange ulike miljøer. Begrepet består av flere nivåer; fra genetikk til individuelle arter, fellesskap mellom individer og fullstendige økosystemer hvor mangfoldig liv direkte påvirker det fysiske miljøet. Mangfoldet av arter, økosystemer, økologiske prosesser, og biodiversiteten er en essensiell kilde til klimaregulering. [2] Disse innviklede og mangfoldige interaksjonene har gjort jorden beboelig i milliarder av år, men menneskehetens utbredelse siden industrialiseringen og det økende trykket lagt på økosystemene som gjør vår overlevelse mulig gjør at biodiversiteten i våre økosystemer aldri har vært mer truet. Habitatødeleggelse, klimaendringer handel og utveksling av dyr og planter truer biodiversiteten mange steder på jorden, og beskyttelse av dette mangfoldet bør være av stor interesse for fremtidige generasjoner. [3][4]

Fremmede, eller invaderende, arter er en av flere trusler mot biodiversitet i økosystemer flere steder i verden, og dette gjelder også det biologiske mangfoldet i Norge. Den stigende globaliseringen de siste årene har ført til økende mengder materielle forflytninger over landegrensene, inkludert import og eksport av planter. [5] Dette har blitt praktisert i lang tid, og har blant annet spilt en stor rolle i utvikling av landbruk. Dette har ofte hatt få negative konsekvenser på lokal flora og fauna, da fremmede arter har blitt kultivert inngjerdet eller med små negative effekter dersom de har blitt introdusert til naturen.

Likevel utgjør fremmede arter i form av planter og andre organismer en trussel til det biologiske mangfoldet over hele verden. Dette er fordi nye arter kan spres på måter som er vanskelige å forutsi og/eller kontrollere, og de kan krysse seg med arter som finnes naturlig i økosystemet. De kan også bære med seg parasitter og sykdommer. [6] I tillegg kan klimaforandringer, som høyere gjennomsnittstemperaturer og endringer i regn- og snømønstre, muliggjøre flere plantearter til å begynne å gro i nye områder. I løpet av de siste 20 årene har innførsel av planter til Norge økt betydelig, hvilket medfører en økning i fremmede arter. Med den offisielle definisjonen; «Planter som sprer seg til områder de ikke selv ville kunne spre seg til, og som samtidig har en negativ effekt på det opprinnelige biologiske mangfoldet» [7] utgjør fremmede arter en trussel for Norges biodiversitet. Disse

artene har også stor samfunnsøkonomisk kostnad. En studie publisert av NINA (Norsk institutt for naturforskning) i 2015 estimerte årlig kostnad ved fremmede arter i Norge til å være mellom 1,4 og 3,9 milliarder kroner i 2013. [8]

Teori

En av de største spredningsveiene for fremmede arter er gjennom import av planter i jordklumper hvor invaderende arter kan passere over landegrenser som blindpassasjerer i jordklumpene og formere seg når de har blitt plantet i Norge. I 2014 ble det vist at trær og busker som importeres med jordklumper til Norge hadde økt fra 6 000 til 17 000 tonn siden 1997, hvilket betyr at mulig introduksjon av fremmede arter også økte betydelig i denne perioden. [9] I 2020 var det ingen tegn på at denne introduksjonen av nye fremmede arter kom til å gå ned, da det var registrert over 2700 fremmede arter i norsk natur. Artsdatabanken vurderte også at 1074 av disse utgjorde en økologisk risiko, og 236 utgjorde en høy eller svært høy økologisk risiko. [10] NINA begynte i 2014 å utvikle overvåkingen av fremmede arter som følger med importerte planter, på oppdrag fra Miljødirektoratet. Formålet med en slik overvåking er å kostnadseffektivt beregne hvor mange, samt hvilke fremmede arter som ankommer Norge gjennom denne spredningsveien, og hvilken risiko de utgjør for biodiversiteten i landet. [11]

Et eksempel på en slik art er *Lupinus polyphyllus*, også kjent som hagelupin. Denne flerårige urten formerer seg hovedsakelig med frø, og kan produsere hundrevis av disse som kan bevare evnen til å spire i tiår fremover. Områder hvor planten formerer seg blir preget av et økt næringsinnhold i jorden som på sikt fører til fortregning av konkurransesvake arter, og med nitrogenfikserende rotknoller har hagelupin små krav som må dekkes før den kan etablere seg. [12] Ifølge Artsdatabanken utgjør denne planten en svært høy økologisk risiko med et stort invasjonspotensial, og den ble lagt til i Fremmedartslista i 2018. [13][14]

Den 12. juni 2019 fikk Klima- og miljødepartementet overlevert en tiltaksplan fra Miljødirektoratet som omhandlet bekjempelse av skadelige fremmede organismer. Denne planen legger føringer for hvordan ulike sektormyndigheter skal samarbeide om sentrale problemer hvor målet er å begrense innførsel, spredning og effektene av skadelige fremmede organismer.

Flere overordnede føringer ligger til grunn for utviklingen av tiltak mot fremmede arter. Viktige føringer blant disse er prioritering av tidlig innsats, hvor innsatsen skal sette inn samt at tiltakene baseres på helhetlige analyser. [15] For å senke den negative påvirkningen fremmede arter har på økosystemenes tilstand og evnene deres til å utføre økosystemtjenester, som produksjon av mat, vannrensing, nedbryting av avfall, pollinering, etc. er det essensielt å utvikle effektive og rimelige metoder for overvåking av fremmede arters importveier. [16]

Metoder for å identifisere fremmede arter

Miljødirektoratets tiltak for å overvåke importen av fremmede arter til Norge krever en sikker metode for å korrekt identifisere de ulike artene som finnes i jordklumpene som hageplanter o.l. fraktes i. En god måte for å ekstrahere frø, spirer og insekter herfra er ved innsamling av levende virvelløse dyr og spirte karplanter fra jordprøver av importerte hageplanter, bankeprøver og lysfeller fra ulike innkjøpssteder. Insekter og andre virvelløse dyr kan direkte samles fra jordprøvene og videreføres til morfologisk eller genetisk identifisering, men det er ikke nok å bare få tak i frø og spirte karplanter fra importerte jordklumper. Disse organismene kan ikke identifiseres på artsnivå på dette stadiet, og det å identifisere en tidlig spire fra en av disse frøene kan være vanskelig og usikkert å bestemme før planten nærmer seg full vekst. Dersom visse planter skal identifiseres tidlig i stadiet vil dette kreve et høyt nivå av taksonomisk kunnskap som mange innenfor bioteknologiske felt ikke har tilgang til. Planters genetiske kode inneholder den samme informasjonen fra tidlig i spiringsstadiet som når de er fullvokst, og en kjent metode for å identifisere ukjent genetisk materiale er ved bruk av metabarcoding. [17]

Metabarcoding er en teknikk for plante- og dyreidentifikasjon som baserer seg på DNA-basert identifisering og DNA-sekvensering, og er mer omfattende, raskere og langt mindre avhengig av taksonomisk ekspertise enn tradisjonelle metoder. [18] Prinsippet bak denne metoden er at bestemte sekvenser fra arvestoffet til en ukjent organisme blir sammenlignet med kjente DNA-sekvenser fra bestemte arter i en etablert DNA-database. [19] Prosessen av DNA metabarcoding begynner med vevsprøvetaking av organismen som skal taksonomisk bestemmes etterfulgt av lysring av dette vevet for å bryte ned cellenes membraner. Herfra kan DNAet fra vevsprøve ekstraheres ved å tilsette reagenser som isolerer arvestoffet fra proteiner, salt og andre komponenter fra cellene i prøven slik at det kan videreføres til en polymerase kjedereaksjon. Her produseres det millioner av identiske kopier av et utvalgt målgen av DNA-tråden som skal sekvenseres, og de oppkopierte DNA-prøvene kan deretter

behandles med gelelektroforese for å forsikre at et brukbart utbytte er oppnådd. Hvis elektroforesen viser positive resultater kan disse PCR-produktene bli sendt til en sekvenseringsleverandør som vil sende tilbake kromatogrammer eller springfiler i et spesifikt format som kan bli redigert med en tilhørende programvare. Når sekvensen er fullført, kan den sammenlignes med en database med millioner av sekvenser for å sammenligne hvilken prøve det var. [20]

Problemstilling

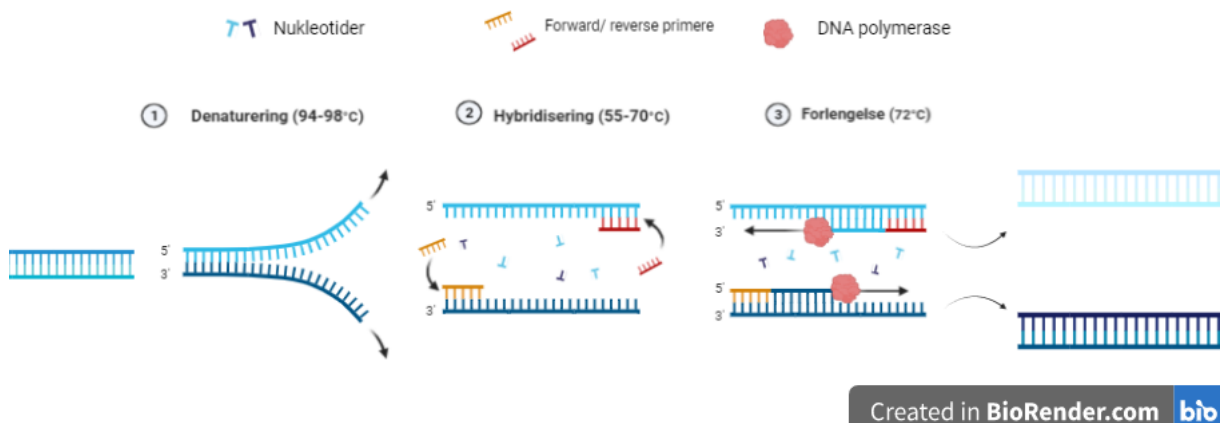
Utvikling av metoder for å kunne overvåke de fremmede artene som ankommer Norge langs importveier behøves for at tiltak kan innføres når nok data er samlet inn om hvor ulike fremmede arter kommer fra og i hvor store mengder. Dette forsøket har som formål å bidra til utviklingen av den genotypiske metoden for identifisering av ukjente fremmede arter hentet fra importerte planter for å observere norske importveier av ukjente og mulig invaderende arter. Forsøket vil begrenses til optimaliseringen av PCR-metoden og hvilke forhold som vil resultere i det mest stabile og pålitelige resultatet når innsamlet DNA amplifiseres for målgenet ITS. DNA-prøver samlet inn fra plantevev er sørget for av NINA, og PCR vil bli utført på disse under ulike forhold og med ulike tilsetningskomponenter for å analysere hvilken PCR-metode som gir det beste resultatet for videre DNA metabarcoding av genet ITS (Internal Transcribed Spacer).

Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en laboratorieteknikk som benytter DNA polymerases enzymatiske evne til å syntetisere nye DNA-tråder komplementære til en forsørget DNA-templattråd for å produsere millioner eller milliarder av kopier av en DNA-region. Denne metoden benytter det varmestabile enzymet *Taq* polymerase til å feste nukleotider til allerede eksisterende 3'-OH grupper, og trenger derfor en primer den kan feste det første nukleotidet til. [21] Primere er syntetiske nukleotider med bestemte rekkefølger designet for å kunne binde seg til start- og endepunktene for gen-regionen som skal amplifiseres. For en polymerase kjedereaksjon må det benyttes en forward og reverse primer som kan binde seg til hver ende av gen regionen og fungerer som startpunkt for polymerasen og den enzymatiske syntesen. *Taq* polymerase benyttes fordi kjedereaksjonen må gjennomgå temperaturendringer gjennom denaturering, hybridisering og forlengelse. *Taq* polymerase er et varmestabilt enzym som katalyserer dannelsen av et DNA-molekyl, og er isolert fra bakterien *Thermus Aquaticus* som

finnes naturlig i varme kilder. Enzymet tåler derfor gjentatt oppvarming og nedkjøling, hvilket gjør det viktig i PCR-reaksjoner. [22]

I denatureringen, det første trinnet i PCR-reaksjonen, blir løsningen bestående av alle komponentene varmet opp til 94 – 98 °C slik at den doble DNA-tråden separeres og sørger for to enkeltrådede DNA-tråder som benyttes i neste steg. Det neste trinnet, hybridisering, kjøler ned reaksjonen til 55-70 °C slik at primerne kan binde seg til sine komplementære gen-sekvenser på templat-DNAet. I forlengelsen, det siste trinnet i kjedereaksjonen, blir temperaturen satt til 72°C slik at polymerasen kan feste komplementære nukleotider til hver av de enkeltrådede DNA-molekylene. Denne prosessen gjentas 25-35 ganger, og fører til en eksponentiell produksjon av kopier av den målrettede gen regionen (figur 1). [23][24]



Figur 1: Polymerase kjedereaksjon. En startløsning inneholder templat-DNA, nukleotider, forward/reverse primere og DNA polymerase. Templattråden separeres ved denaturering, og ved hybridisering kan primerne binde seg til de separate enkeltrådene. Ved forlengelse sørger DNA polymerase for å feste komplementære nukleotider etter primerne og produserer to nye sekvenser av målgenet. Prosessen blir dermed gjentatt for å danne 4 nye DNA-tråder. Syklusen gjentas opptil 35 ganger for eksponentiell amplifisering av målgenet. Figuren er laget i BioRender.com. [25]

Målgen

PCR metoden har som formål å amplifisere, ikke hele DNA-sekvensen, men kun en spesifikk region av DNAet. Målgenet kan beskrives som en definert region eller sekvens i den opprinnelige DNA-prøven som blir amplifisert i en PCR-reaksjon. Målet med en PCR-reaksjon er å produsere nok av dette målgenet slik at dette kan analyseres videre, enten ved sekvensering, visualisering i gelelektroforese eller kloning inn i et plasmid for videre eksperimentering. [23]

Et eksempel på et av disse målgenene er matK (maturaseK) genet. Dette 1500 basepar lange genet er lokalisert i kloroplaster i planteceller, og koder for et protein ansvarlig for å spleise gruppe II-introner. Genet er høyt konserververt blant plantearter, og er vanlig å bruke i planteforskning blant annet som et målgen under metabarcoding. [26]

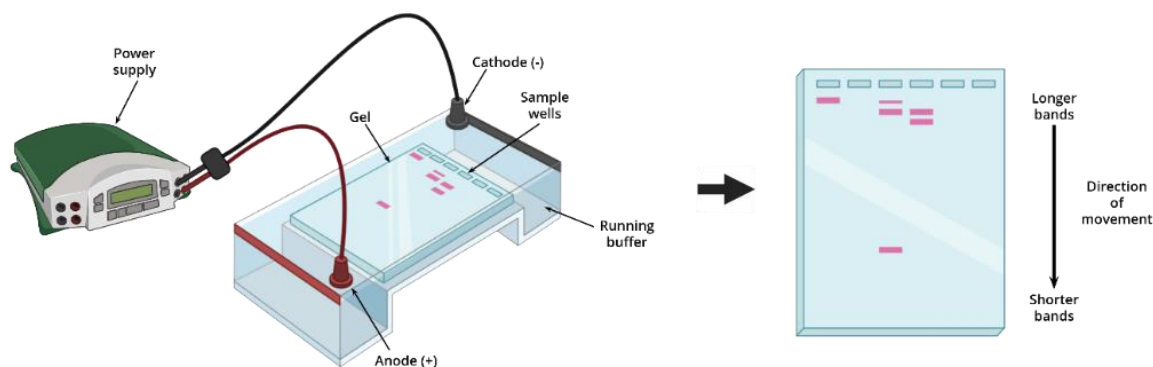
Genet som skal amplifiseres i denne PCR-analysen er derimot ITS (Internal Transcribed Spacer). Dette genet er et stykke ikke-funksjonelt RNA plassert mellom strukturelle rRNA av et forløper-transkript med en lengde på omtrent 550 basepar. [27] Genet inneholder den raskest utviklende regionen av rRNA i mange organismer og ITS har vist seg å være verdifull for å analysere intraspesifikk variasjon i noen taksoner. Disse sekvensene viser vanligvis mer variasjon enn den ribosomale sekvensen, som er hvorfor de er ofte brukt for fylogenetisk analyse eller identifikasjon av arter. [28] For PCR-reaksjoner er primerne ITS4 og ITS5 standard for amplifisering av ITS regionen, og sekvensen til disse primerne er;

ITS4(std): TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

ITS5(std): GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G [29]

Gelelektroforese

Gelelektroforese er en laboratoriemetode for separasjon av DNA, RNA eller proteiner basert på den molekylære størrelsen og ladningen deres. Prosessen involverer bruk av en gelmatrise, vanligvis laget av agarose, hvor molekylene føres gjennom små porer i gelen av en spenningskilde. Et gel-kar fylles opp med en TAE-buffer (Tris-base, eddiksyre og EDTA), som dekker en agarose-basert gel med brønner som kan fylles med DNA-prøver. Gel-karet har en katode og en anode og siden DNA-molekyler er negativt ladd vil de bli dratt i retning av anoden når en spenning blir tilført (figur 2). Separasjonen av disse molekylene er basert på størrelsen deres, da større molekyler vil bli dratt saktere gjennom gelen og dermed skilles fra de raskere, mindre molekylene. For å visualisere hvor langt DNA-prøvene har reist gjennom gelen, tilsettes prøvene en «loading dye» (f.eks. bromfenolblått) som vil synliggjøres når gelen fjernes fra karet etter ca. 45 minutter for å bli fotografert med UV-lys. Etter en PCR-analyse vil det amplifiserte målgenet finnes i millioner av kopier hvor alle har den samme molekylære størrelsen. Utbyttet av kjedereaksjonen kan måles ved å bruke en gelelektroforese, blant annet ved bruk av en DNA-ladder. Dette er et sett med standarder som kan brukes til å måle størrelsen på DNA fragmentene i elektroforesen. [30][31][32][44]



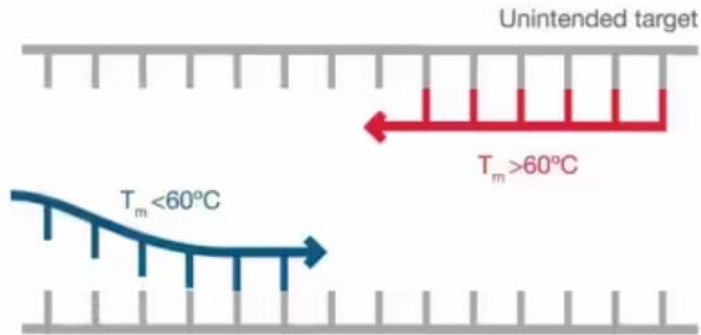
Figur 2: Illustrasjon av gelelektroforese. Gelen er dekket og omringet av en TAE buffer og inneholde prøve-brønner som kan tilsettes amplifiserte DNA-prøver. De negativt ladde molekylene trekkes mot den negativt ladde siden av gel-karet via en tilført spenning. Etter prosedyren er utført står en igjen med en gel hvor molekylene i prøvene er sortert etter molekyllær størrelse. Figuren er hentet fra BioRender.com [25]

Optimalisering

Optimalisering av reagenser og forhold som benyttes til å utføre en PCR er kritisk for å oppnå pålitelige og reproduerbare resultater, og tid brukt i begynnelsen av optimaliseringen vil være fordelaktig i det lange løp. Spesifisitet, sensitivitet, effektivitet og evne til reproduksjon er viktige kriterier å vurdere ved optimalisering av reaksjonen. Disse kan påvirkes av syklusforhold eller endringer i konsentrasjonen av primer, buffer, $MgCl_2$ eller templat-DNA. Analyseringen av disse optimaliseringsmetodene kan gjennomføres ved bruk av gelelektroforese, hvor ulike variasjoner av en PCR-reaksjon analyseres under ulike forhold for å determinere hvilken prøve som har den optimale amplifiseringen av målgenet. [33]

Temperatur

Bruk av gunstige syklusforhold er essensielt for PCR-reaksjoner, og kjedereaksjonsprosessen gjennomgår 3 ulike temperaturendringer per syklus. Denatureringen holdes normalt ved $94^{\circ}C$, hybridisering mellom $55^{\circ}C$ og $65^{\circ}C$ og forlengelse ved $72^{\circ}C$. Det er i hybridiserings stadiet av reaksjonen hvor det ofte er rom for optimalisering av benyttet temperatur. Primerne som benyttes i PCR-reaksjoner varierer ofte i sekvens, lengde og komposisjon, hvilket er grunner for ulike smeltetemperaturer (T_m) mellom ulike primere. Hybridiseringstemperaturen bør derfor bestemmes fra T_m til utvalgte primere for å optimalisere primerbindingen og amplifiseringen av målgenet. Primere med en høyere T_m kan lettere binde seg til utilsiktede området på templat-tråden, mens primere med lavere T_m kan ha vanskeligheter med å binde seg til templatet (figur 3). Dette kan påvirke utbyttet av reaksjonen, og for å produsere et PCR-resultat med maksimalt utbytte og spesifisitet bør derfor hybridiseringstemperaturen til primerne optimaliseres. [34]



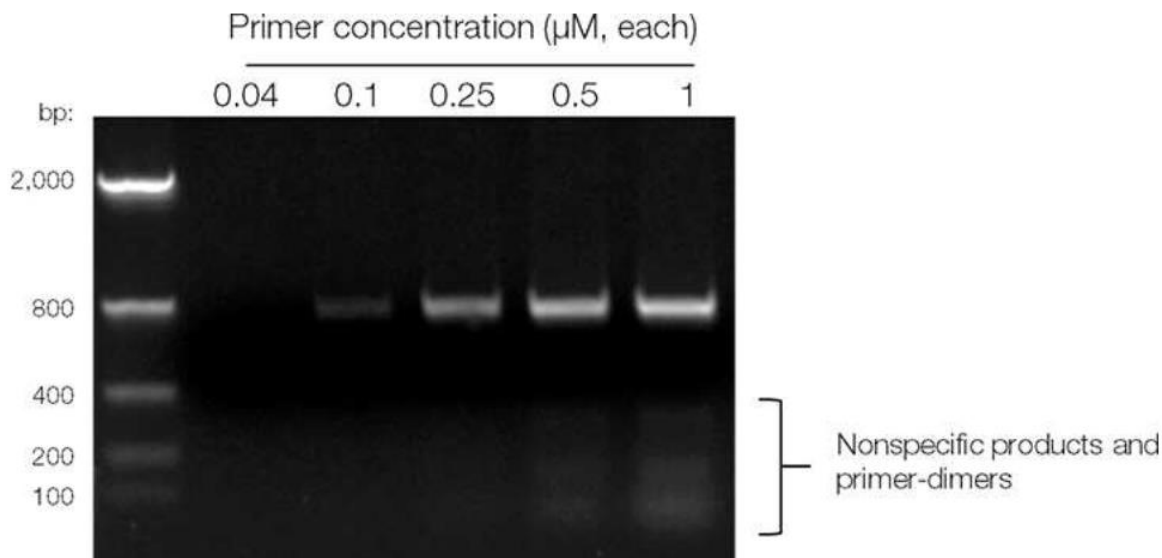
Figur 3: Sub-optimal binding av primere ved 60°C uten optimalisering. Primer med smeltetemperatur $T_m > 60^\circ\text{C}$ kan binde til utilsiktet område på templatet, mens primer med $T_m < 60^\circ\text{C}$ kan bare delvis binde seg til templatet eller forbli ubundet. [34]

En enkel og rask måte å optimalisere PCR på som kan øke spesifisitet, sensitivitet og utbytte kan være gjennom touchdown. Denne metoden kan fjerne behovet for kompliserte optimaliseringer eller redesign av primere, og justerer heller hybridiseringstemperaturen. En starttemperatur i hybridiseringsstadiet høyere enn anslått smeltetemperatur blir påført, og går deretter stegvis ned til en lavere hybridiseringstemperatur i de neste syklusene før den slår seg fast på en lavere temperatur som blir anvendt til de resterende syklusene. Touchdown-metoden i en PCR er spesielt nyttig ved templatet som er vanskelig å amplifisere, men som også kan brukes standard for å forbedre spesifisitet og produktdannelse. [35]

Primere og primerkonsentrasjon

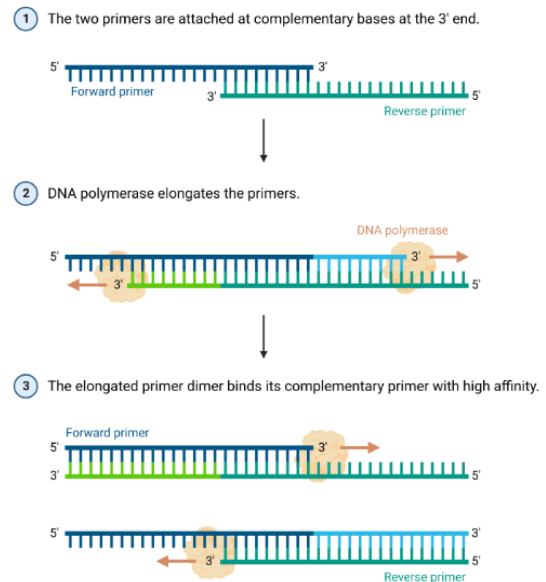
Primere er syntetiske oligonukleotider mellom 15 og 30 basepar i lengde. De er designet til å binde til sekvenser som flankerer det genetiske området som skal amplifiseres i templat-DNAet i en PCR-reaksjon. Polymerasen kan dermed forlenge gen-sekvens området fra primernes 3'-ender. Primerne må konstrueres nøye for å kunne binde seg til spesifikke steder på DNA-templatet og ha en smeltetemperatur (T_m) innen 5°C av hverandre. Innholdet av guanin/cytosin bør også ideelt være mellom 40% og 60% med G- og C-baser jevnt fordelt for å unngå feilpriming. Tilsvarende bør ikke mer enn 3 G- eller C-baser være til stede ved 3'-enden av primerne for å unngå uspesifikk priming av templat-tråden. Samtidig kan én G- eller C-base i 3'-enden være fordelaktig da dette kan fremme en bedre forankring av primeren og føre til en mer effektiv forlengelse av polymerase. ITS primerne ITS4 og ITS5 har henholdsvis 45% og 41% innhold av G- og C-baser og ikke mer enn 3 av disse basene i 3'-enden. [29]

I forhold til konsentrasjonen av tilsatt primerløsning kreves det også en optimaliseringsprosess. 0,1-1 μM er området primerløsning normalt tilsettes ved oppsett av en PCR-reaksjon, men det kan være behov for justering av dette. Dersom konsentrasjonen av primere er for høy kan dette bidra til at primer fester seg på feil sted, som igjen fører til uspesifikk amplifisering av DNAet. Likedan kan en for lav konsentrasjon føre til lav eller null amplifikasjon av templat-tråden. [36] Større mengder tilsatte primere kan også føre til dannelsen an primer dimere (figur 4), som er PCR-biprodukter forårsaket av primere som binder seg til hverandre. Disse sammenbundne primerne vil dermed forlenges av DNA polymerasen og danner et mindre genetisk biprodukt som vil reise raskere gjennom en gelelektroforese og uttrykke seg lengere ned på gelen (figur 5). [37]



Figur 5: PCR forsøk hvor ulike konsentrasjoner av primere ble benyttet. Med for lav konsentrasjon (0,04 μM) er det ikke blitt amplifisert noe av den ønskede gen sekvensen. Samtidig har for høye konsentrasjoner resultert i dannelsen av uspesifikke produkter og primer-dimere. [36]

Primer Dimer Formation



Figur 4: Dannelse av primer dimere. En forward og reverse primer bindes til hverandre i stedet for templat-tråden i hybridiseringsstadiet, og DNA polymerase vil forlenge denne bindingen. Sluttproduktet er et genetisk biprodukt som er mindre enn målgenet og har en annen sekvens. Figuren er hentet fra BioRender.com [25]

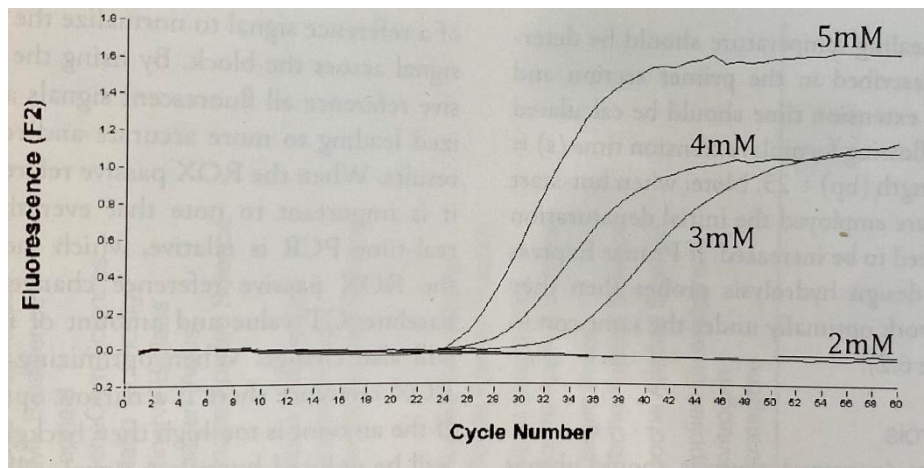
DNA-konsentrasjon

DNA-templatet er utgangspunktet i en PCR-reaksjonen og kan enten være genomisk (gDNA), komplementært (cDNA) eller et plasmid. Konsentrasjonen av dette utgangspunktet kan likevel ha påvirkninger for utbyttet av amplifiseringen, da PCR utføres i ulike volum og ved større volum på den totale reaksjonen kan det være nødvendig med en større mengde templat-DNA. I teorien, burde en eneste kopi av det originale DNAet være tilstrekkelig for PCR-amplifisering under ideelle forhold, men i praksis er effektiviteten til en spesifikk mengde templat avhengig av reaksjonskomponenter, parametere og sensitiviteten til DNA polymerasen. Optimale mengder av templatet kan variere med hvilken polymerase som brukes, spesielt da et enzym konstruert for høyere sensitivitet ovenfor DNA-tråden vil kreve mindre DNA til å begynne med. Dersom konsentrasjonen av templat-DNA er for høy risikeres det å dannes uspesifikke bindinger, men for lave konsentrasjoner kan redusere utbyttet. [36]

Magnesiumklorid ($MgCl_2$)

En nøkkelvariabel i PCR-optimalisering er konsentrasjonen av magnesiumklorid ($MgCl_2$) siden Mg^{2+} ioner påvirker både spesifisiteten og utbyttet av PCR. Disse ionene fungerer som co-faktor for *Taq* polymerase i en katalytisk reaksjon som hjelper enzymet med å effektivt syntetisere templat-DNAet. $MgCl_2$ har også som funksjon å øke reaksjonens smeltetemperatur (T_m), hvilket fører til en mer presis primerbinding. I tillegg, legger kjemikalet til rette for en mer nøyaktig templat-primer binding. Mg^+ ioner bindes til alfa-fosfatet til en dNTP og fjerner resten av de to fosfatene som dermed reduserer den elektrostatiske frastøtningen mellom de to DNA-trådene. Deretter stabiliseres det enkelttrådede templat-DNAet og forhindrer renaturering av DNAet.

For høye eller lave konsentrasjoner kan ha negative effekter på resultatet av reaksjonen. Dersom konsentrasjonen er for høy kan dette føre til ufullstendig denaturering og lavt utbytte eller økte mengder av ikke-spesifikke produkter, mens for lave konsentrasjoner reduserer polymerasens evne til å forlenge primere. I en real-time RCR er vanligvis den gunstigste $MgCl_2$ konsentrasjonen den laveste mengden som gir den minste CT (cycle threshold) verdien, den høyeste fluorescens intensiteten og den bratteste kurven av et fluorescens / syklus plott (figur 6). [33][38][39]



Figur 6: MgCl₂ optimaliserings eksperiment. Den samme qPCR prøven ble analysert med 5 ulike MgCl₂ konsentrasjoner på en LightCycler (5mM, 4mM, 3mM, 2mM). Bruk av 5mM MgCl₂ ga den laveste CT verdien og det høyeste fluorescens signalet og var derfor den mest gunstige av konsentrasjonene. [33]

Den optimale MgCl₂ konsentrasjonen for DNA-analyser er normalt mellom 2 og 5 mM, og for RNA er det vanligvis mellom 4 og 8 mM. Det er likevel kommersielt tilgjengelige PCR-buffere som kan gjøre MgCl₂ optimalisering unødvendig. [33]

DMSO (Dimetylsulfoxid)

DMSO er en viktig komponent som benyttes i PCR-optimalisering, som øker utbyttet og spesifisiteten til reaksjonen. Dette kjemikalet er ofte benyttet i atypiske PCR-reaksjoner med lengre templatere med flere cytosin-guanin bindinger, fordi disse inneholder triple hydrogenbindinger. Dette stabiliserer templat-DNAet og krever en høyere temperatur for å brytes, i tillegg til å forårsake flere sekundærstrukturer i DNA-molekylet. Ved å tilsette DMSO til reaksjonen senkes smeltetemperaturen under reaksjonen som gjør hybridiseringsstadiet i syklusen mindre komplisert. DMSO binder seg til cytosin basen på templatstråden og gjør endringer i konformasjonen. Dette fører til at cytosinet blir mer varmelabilt og reduserer smeltetemperaturen for primerne. Samtidig reduserer DMSO styrken til hydrogenbindinger i DNAet og endrer strukturen.

Sekundærstrukturene, forårsaket av et høyt innhold av G-C bindinger, gjør DNA-tråden stabil og er vanskeligere å åpne. Dette resulterer i en templatstråd uten et komplementært bindingssted for primere. DMSO binder seg til DNA og forhindrer re-hybridisering av denaturert DNA, og dermed får bare primere rom for å binde seg til sine komplementære bindingssteder.

Det kan imidlertid også følge med negative effekter ved bruk av DMSO i en PCR dersom det tilsettes i ugunstige mengder. Dersom for mye DMSO tilsettes før reaksjonen induserer dette ikke-spesifikke bindinger, da dette vil unødige stabilisere den enkle DNA-tråden og reduserer smeltetemperaturen. Dette fører til flere primere binder seg til tilfeldige steder på målgenet, og reaksjonen ender opp med å kopiere flere uspesifikke DNA-tråder. Samtidig, dersom en utilstrekkelig mengde tilsettes kan en risikere å ikke få noen resultater. Det fullførte produktet kan ha færre, low-resolution bånd eller ingen kopier av templatet I det hele tatt. [40][41]

DMSO kan også ha helseskadelige effekter, og kan utsette laboranter for negative helseeffekter dersom kjemikalet arbeides med over lengre tid. Det kan forårsake alvorlig øyeirritasjon, og kan føre til skade på organer via langvarig eller repetert eksponering. Ved lengre arbeid med DMSO er det derfor anbefalt å; ikke puste det inn, vaske huden nøye etter håndtering, bruk av øyebeskyttelse og kontakte medisinsk hjelp ved symptomer som øyeirritasjon eller hvis en føler seg uvel. [42]

Metoder og materialer

Ulike PCR-metoder ble analysert ved bruk av ulike mengder av templat DNA og ITS primerløsning, tilsetningsreagenser i form av MgCl₂ og DMSO og forskjellige varmebehandlinger under kjedereaksjonen. Disse ulike metodene ble dermed analysert ved bruk av gelelektroforese, før en ideell metode ble utvalgt til å gjennomføres med et større utvalg av DNA-prøver.

Forsøksdesign

For å analysere ulike konsentrasjoner av DNA ble en PCR-analyse utført ved bruk av en kommersiell polymerasemix kalt «VWR Taq Plus DNA Polymerase Master Mix» [43], ITS primerløsning og av-ionisert vann (ddH₂O). 3 ulike konsentrasjoner av templat-DNA ble testet, og disse ble utført med både 0,5 μM og 1,0 μM ITS primerløsning. Det ble også tilsatt nok ddH₂O til at det totale volumet av alle PCR-rørene ble 15 μL. Tabell 1 viser forsøksdesignet med alle tilsatte komponenter. Begge konsentrasjonene av primerløsningen ble testet med 2, 3 og 4 μL av templat-DNAet. Dataene fra NINA, som leverte DNA-prøvene, inkluderte ikke konsentrasjonen av disse prøvene, og derfor er konsentrasjonene av disse ikke oppgitt i tabell 1.

Tabell forsøksdesign 1:

Metode	Tilsatte komponenter			
	Taq polymerase mastermix	ITS primer	Templat DNA	ddH ₂ O
1-1	7,5 µL	0,75 µL (0,5µM)	2 µL	4,75 µL
1-2	7,5 µL	1,5 µL (1,0µM)	2 µL	4 µL
2-1	7,5 µL	0,75 µL (0,5µM)	3 µL	3,75 µL
2-2	7,5 µL	1,5 µL (1,0µM)	3 µL	3 µL
3-1	7,5 µL	0,75 µL (0,5µM)	4 µL	2,75 µL
3-2	7,5 µL	1,5 µL (1,0µM)	4 µL	2 µL

Tabell 1: Oversikt over forsøksdesign for analyse av DNA-konsentrasjonen i PCR. Hver prøve inneholder den samme mengden Taq polymerase mastermix, men har varierte mengder tilsatt templat-DNA og primerløsning. For hver ulik mengde templat-DNA (2, 3 og 4 µL) er det testet for to ulike konsentrasjoner av ITS primer (0,5 og 1,0 µM). Mengden ddH₂O er ulik for hver metode da denne skulle sørge for et totalvolum på 15 µL.

Alle komponentene henvist til i tabell 1 ble overført til 4 PCR-rør hvor templat-DNA ble tilsatt i 3 av dem, og et rør for hver metode fungerte som en negativ kontroll. Rørene ble deretter sentrifugert og plassert i en PCR-maskin hvor hybridiseringstemperaturen ble satt på 58°C, og prøvene gjennomgikk 35 sykluser.

Tilsetningsprosessen for disse prøvene begynte med å tine reagenser som var oppbevart i fryser før forsøket. 3 strips med 8 PCR-rør ble merket 1, 2 og 3 for å holde kontroll på hvilke rør som inneholdt de ulike reagenskombinasjonene.

2 blandingsrør på 1,5 mL ble merket 1 og 2. I disse rørene ble felles reagenser blandet sammen for en mer effektiv arbeidsmetode.

Rør 1 ble tilsatt;

- 90 µL (7,5 µL *12) Taq polymerase, og
- 9 µL (0,75 µL *12) primerløsning for en konsentrasjon på 0,5 µM

Rør 2 ble tilsatt;

- 90 μL (7,5 μL * 12) *Taq* polymerase, og
- 18 μL (1,5 μL * 12) primerløsning for en konsentrasjon på 1,0 μM

Begge rørene ble blandet på vortex og sentrifugert for å blande og samle sammen reagensene. Tilsetningsvolumet for ITS primerløsning ble regnet ut via formelen;

$c_1 * v_1 = c_2 * v_2$ (se vedlegg for utregning)

3 strips av 8 PCR-rør ble benyttet for testing av DNA-konsentrasjoner, og ble markert A, B og C. Dermed ble de ble fylt opp fra blandingsrør 1 og 2. De fire øverste PCR-rørene i hver strip ble tilsatt 8,25 μL hver fra blandingsrør 1 og de fire nederste ble tilsatt 9 μL fra blandingsrør 2. PCR-rørene i strip A ble tilsatt 2 μL av templat-DNA løsningen, og rørene i strip B og C ble tilsatt henholdsvis 3 μL og 4 μL templat-DNA. Et unntak ble gjort for hvert fjerde rør i hver strip som ikke ble tilsatt DNA, og ble benyttet som negative kontroller. Rørene ble til slutt tilsatt en tilpasset mengde ddH₂O for å bringe totalvolumet til 15 μL (se tabell 1).

Prøvene ble sentrifugert før PCR-reaksjonen for å samle alt av reagenser i bunnen av rørene. PCR-maskinen ble innstilt til å gjennomgå 35 sykluser med en fast hybridiseringstemperatur på 58°C, og etter reaksjonen ble prøvene samlet i en merket zip-lock pose og oppbevart i fryser for senere gelelektroforese.

For optimaliseringsforsøk via andre komponenter og hybridiseringstemperatur ble en PCR-analyse forberedt med komponentene; *Taq* polymerase mastermix, DMSO, ddH₂O, MgCl₂ og ITS primerløsning. Et oppsett med flere ulike kombinasjoner ble satt opp før forsøket, som la til rette for at flere kombinasjoner av optimaliseringsteknikker som ble testet under ulike forhold.

Dette henviser både til ulike typer PCR-programmer og tilsetning av ulike reagenser i forskjellige mengder.

Her ble 3 metoder for PCR-reaksjoner ble testet;

- Metode A: PCR-reaksjon hvor kommersiell *Taq* polymerase (VWR Taq Plus DNA Polymerase Master Mix), av-ionisert vann (ddH₂O) og ITS primerløsning ble benyttet.
- Metode B: PCR-reaksjon hvor kommersiell *Taq* polymerase mastermix med tilsatt DMSO, av-ionisert vann (ddH₂O) og ITS primerløsning ble benyttet.
- Metode C: PCR-reaksjon hvor kommersiell *Taq* polymerase (VWR Taq Plus DNA Polymerase Master Mix), av-ionisert vann (ddH₂O), ITS primerløsning og ytterligere MgCl₂ ble benyttet.

Hver reaksjon hadde et volum på 14 µL som fikk tilsatt 1 µL av templat-DNA for et totalvolum på 15 µL. I alle metodene ble de samme 4 DNA-prøvene fra NINA benyttet.

Hver av disse metodene ble testet med et innhold av både 1 og 2 µL ITS primerløsning, hvilket gir 6 ulike reaksjoner for PCR-analysen. Alle 6 metodene ble testet i 4 PCR-rør hvorav tre ble tilsatt 1 µL templat-DNA, og den siste prøven fungerte som en negativ kontroll og ble ikke tilsatt DNA.

Tabell forsøksdesign 2:

Metoder	Tilsatte komponenter				Syklus kondisjoner
	Polymerase	ITS Primer	MgCl ₂	ddH ₂ O	Hybridiserings-temperatur
Metode A – 1	7,5 µL <i>Taq</i> polymerase mastermix	1 µL (0,67 µM)	N/A (1,5 mM)	5,5 µL	- Touchdown - 55°C -56°C -57°C
Metode A – 2	7,5 µL <i>Taq</i> polymerase mastermix	2 µL (1,3 µM)	N/A (1,5 mM)	4,5 µL	- Touchdown - 55°C -56°C -57°C
Metode B – 1	7,5 µL <i>Taq</i> polymerase mastermix tilsatt 0,05mM DMSO	1 µL (0,67 µM)	N/A (1,5 mM)	5,5 µL	- Touchdown - 55°C -56°C -57°C
Metode B – 2	7,5 µL <i>Taq</i> polymerase mastermix tilsatt 0,05mM DMSO	2 µL (1,3 µM)	N/A (1,5 mM)	4,5 µL	- Touchdown - 55°C -56°C -57°C
Metode C – 1	7,5 µL <i>Taq</i> polymerase mastermix	1 µL (0,67 µM)	1 µL (3,2 mM)	4,5 µL	- Touchdown - 55°C -56°C -57°C
Metode C – 2	7,5 µL <i>Taq</i> polymerase mastermix	2 µL (1,3 µM)	1 µL (3,2 mM)	3,5 µL	- Touchdown - 55°C -56°C -57°C

Tabell 2: Oversikt over forsøksdesign for analyse av ulike tilsatte reagenser i PCR. Alle prøvene er tilsatt 7,5 µL *Taq* polymerase, hvor metode B er blitt tilsatt 0,05 mM DMSO i mastermixen. Alle metodene har en gitt mengde MgCl₂, men metode C har fått tilsatt 1 µL ekstra 25 mM MgCl₂ for en konsentrasjon på 3,2 mM i stedet for 1,5. For hver av metodene er også analysert for to ulike konsentrasjoner av ITS primerløsning (0,67 µM og 1,3 µM), og er tilsatt en gitt mengde ddH₂O for å gi et totalvolum på 14 µL. Kolonnen helt til venstre forklarer at alle metodene har gjennomgått PCR med touchdown-metoden og med konstante hybridiseringstemperaturer på 55°C, 56°C og 57°C.

Disse 24 prøvene ble dermed kjørt i en PCR-maskin hvor 4 ulike program ble testet. Ett parti med prøver ble testet ved bruk av touchdown-metoden hvor hybridiseringstemperaturen begynte på 60°C, dermed 59°C i neste syklus, helt ned til 55°C som ble hybridiseringstemperaturen for resten av syklusene. De neste tre prøvene ble testet med temperaturer på 57°C, 56°C og 55°C i hybridiseringsstadiet. Totalt ble 120 prøver kjørt gjennom PCR før gelelektroforese.

Prosessen av polymerase kjedereaksjonen begynte med å tine reagenser da disse ble oppbevart i fryser før forsøket. 3 strips med 8 PCR-rør ble dermed merket 1, 2 og 3 for å holde kontroll på hvilke rør som inneholdt de ulike reagenskombinasjonene.

4 blandingsrør på 1,5ml ble merket 1, 2, 3 og 4. I disse ble ulike felles reagenser blandet sammen for en mer effektiv arbeidsmetode.

Blandingsrør 1 ble tilsatt;

- 60 µL (7,5 * 8) *Taq* polymerase, og
- 8 µL ITS primer for en konsentrasjon på 0,67 µM

Blandingsrør 2 ble tilsatt;

- 60 µL (7,5 * 8) *Taq* polymerase, og
- 16 µL ITS primer for en konsentrasjon på 1,3 µM

Blandingsrør 3 ble tilsatt;

- 30 µL (7,5*4) *Taq* polymerase med tilsatt DMSO, og
- 4 µL ITS primer for en konsentrasjon på 0,67 µM

Blandingsrør 4 ble tilsatt;

- 30 µL (7,5*4) *Taq* polymerase med tilsatt DMSO, og
- 8 µL ITS primer for en konsentrasjon på 1,3 µM

Alle disse rørene ble dermed kjørt på vortex og sentrifugert. Konsentrasjoner for ITS primerløsning og DMSO ble regnet ut via formelen;

$c_1 * v_1 = c_2 * v_2$ (se vedlegg for utregning)

Blandingsrør 1 og 2 ble brukt for metode A (-1 og -2) og C(-1 og -2). De 4 første PCR-rørene tilsatt 8,5 μL fra blandingsrør 1, og de neste 4 ble tilsatt 9,5 μL fra blandingsrør 2. PCR-rørene brukt for metode C(-1 og -2) ble også tilsatt 1 μL MgCl_2 . For metode B(-1 og -2) ble de 4 første PCR-rørene tilsatt 8,5 μL fra blandingsrør 3 og, de 4 neste ble tilsatt 9,5 μL fra blandingsrør 4.

Dermed ble alle rørene tilsatt den rette mengden med ddH₂O som ga et totalvolum på 14 μL . Den rette mengden ddH₂O for hver reaksjon er vist i tabell 2. Til slutt ble 1 μL av templat-DNAet overført til 3 PCR-rør per reaksjon med hver fjerde prøve fungerende som en negativ kontroll. De samme 3 DNA-prøvene ble benyttet for hver metode i denne analysen, som også ble benyttet i PCR-analysen som testet for DNA-konsentrasjon. Etter alle prøvene var fylt med de rette reagensene, ble de sentrifugert for å få alle komponentene samlet i bunnen av PCR-rørene og til slutt plassert i PCR-maskinen for å gjennomgå reaksjonen.

Etter reaksjonene var fullført ble alle de merkede prøverørene overført til en merket zip-lock pose og plassert i fryseren for å gjennomgå gelelektroforese senere. Denne prosessen ble gjentatt 4 ganger hvor et parti med prøver gjennomgikk PCR med touchdown-metoden, og 3 partier gjennomgikk PCR med faste hybridiseringstemperaturer på 55°C, 56°C og 57°C.

Gelelektroforese

Under forberedelser til gelelektroforese ble de merkede PCR-prøvene tint, så de kunne distribueres til brønnene i gelen. 2g agarose ble veid opp i et veieskip og tilsatt en 500-mL erlenmeyerkolbe tilsatt 100 mL 1xTAE buffer. Kolben ble dermed blandet og plassert i en mikrobølgeovn. Her ble kolben kokt på fullstyrke i 2 minutter og rørt om etter koking for å sørge for at all agarose ble oppløst.

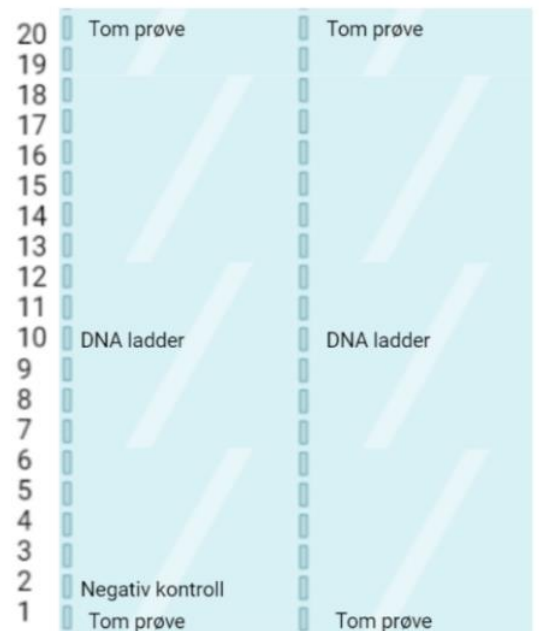
Denne løsningen ble dermed helt direkte over i et gel-kar hvor 0,5 μL GelRed ble tilsatt og rørt om ved hjelp av brønn-støpslene før disse ble plassert i sine respektive posisjoner. Gelen ble stående i 20 minutter før brønn-støpslene ble forsiktig fjernet fra gelen for å forhindre revner mellom brønnene. Metallskivene på siden for å hindre siden av gelen fra å renne ut ble også fjernet. Dette resulterte i en gel med to rekker bestående av 20 brønner hver. Resten av gel-karet ble dermed fylt opp med 1xTAE buffer slik at toppen av gelen akkurat ble dekket av denne bufferen.

Alle brønnene ble fylt opp med 3 μL av PCR-prøvemateriale i en rekkefølge som stemmer overens med tabell 1 og 2. For tabell 1 ble de 4 første brønnene tilsatt 3 μL fra metode 1-1, de

neste 4 fra 1-2, etc. For tabell 2 ble de 8 første brønnene for metode A med de 4 første brønnene for metode A-1 og de 4 neste for metode A-2. De neste 8 brønnene for metode B, og sådan for metode C. Alle brønnene ble tilsatt 1 μ L loading dye (LD), før en spenning på 100V ble tilført i 45 minutter. Etter dette ble spenningen slått av, gelen løftet ut av gel-karet og overført til en UV-lampe hvor et bilde ble tatt gjennom programmet ImageLab for å vise resultatet av gelelektroforesen.

Denne prosessen av gelelektroforese ble repetert 5 ganger, 1 for optimalisering av DNA-konsentrasjon og 1 for hver av de 4 PCR-programmene som metode A, B og C ble testet for. Totalt ble 118 prøver testet og vurdert for den beste metoden, og til slutt ble UV-bildene av gelene analysert for metoden som ga det beste utbyttet. Hele prosessen ble dermed gjentatt ved å bruke denne metoden, med en større mengde ulike DNA-prøver.

For denne metoden ble PCR-metoden repetert slik den ble gjort første gang, og alle 40 brønnene i gelelektroforesen ble benyttet med unntak av de 4 ytterst på gelen. Dette er fordi spenningen er svakest her. Den aller første brønnen av de fylte i rad 1 ble fylt med en negativ kontroll, mens brønn nummer 10 i begge radene ble tilsatt en DNA-ladder for å ha et referansepunkt for baseparlengden til amplifiserte produkter. Denne gelen ble også plassert under en UV-lampe og fotografert. I denne polymerase kjedereaksjonen ble det benyttet 33 nye DNA-prøver, ulike fra de benyttet tidligere under optimaliseringsprosessen (figur 7).

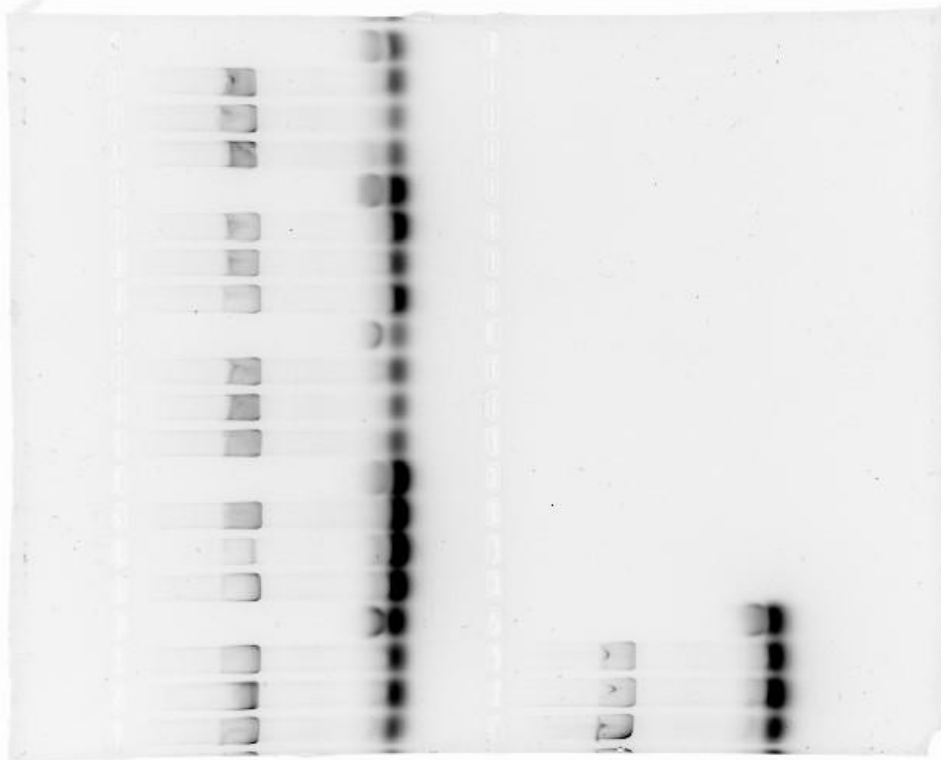


Created in BioRender.com

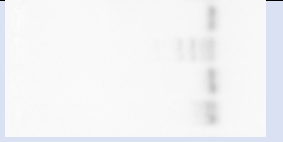



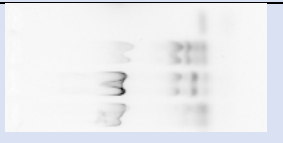
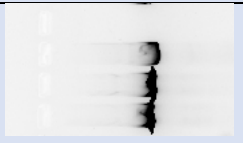
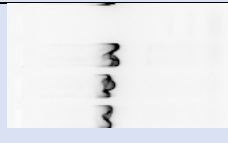
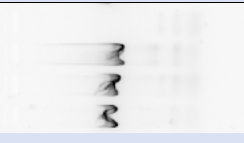








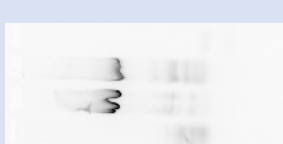

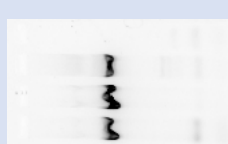

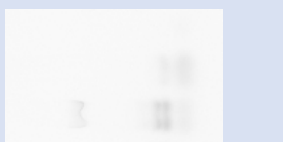

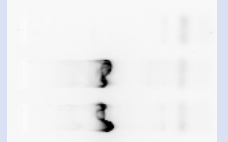
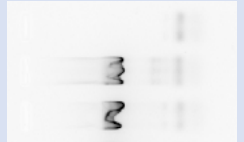
Figur 7: Prøveoppsett for siste gel. De 4 ytterste brønnene er tomme da spenningen er lavest her, brønn 2 i venstre kolonne ble brukt som negativ kontroll, og brønn 10 i begge kolonner ble tilsatt en DNA-ladder. Alle brønnene i figuren uten beskrivelse inneholdt 3 μ L prøvemateriale og 1 μ L loading dye (LD). Figuren er laget i BioRender.com. [25]

Resultater

Gelene hvor de ulike PCR-reaksjonene ble målt på via elektroforese ble fotografert under UV lys. For Metode A, B og C ble bildene av de ulike brønnene deretter ført inn i en tabell fordelt etter benyttet metode og hvilket PCR-program som prøvene gjennomgikk. Et bilde ble også tatt av den endelige gelen, som inneholdt et større utvalg DNA-prøver som ble behandlet med PCR-metoden, som resulterte i den mest gunstige amplifiseringen.

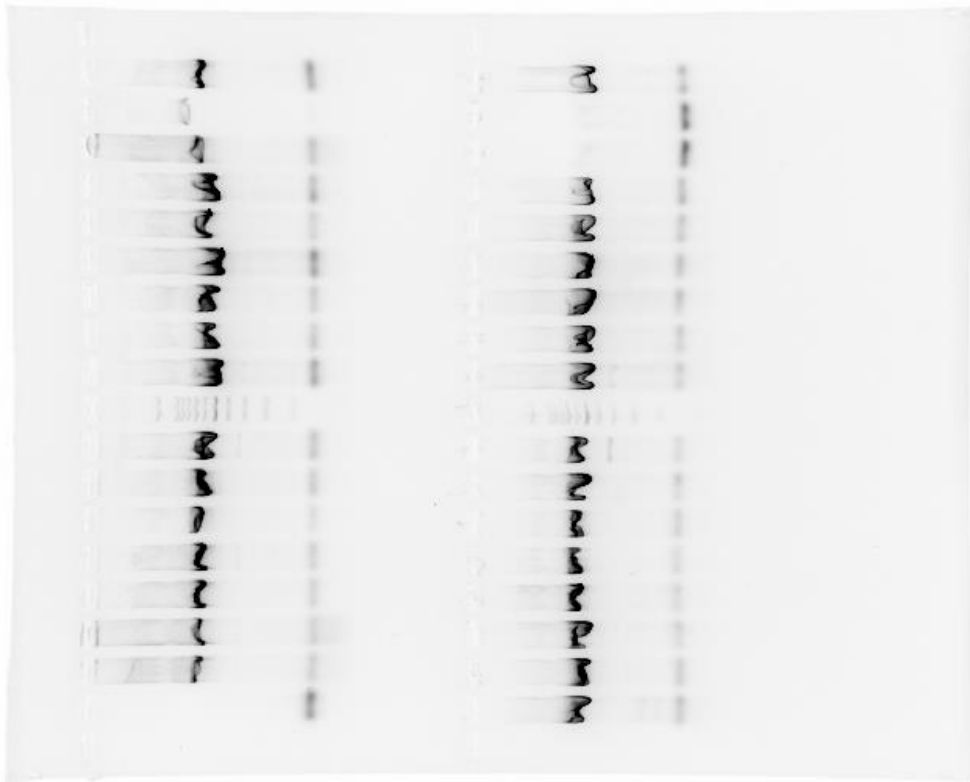


Figur 8: Bildet viser gelen fra gelelektroforese utført på prøvene fra forsøket hvor DNA-konsentrasjonen ble testet. Prøvene er tilsatt brønnene i rekkefølge som stemmer overens med tabell 1. Dvs. at de fire prøvene nederst i venstre kolonne er fra metode 1-1, de 4 neste er fra metode 1-2, etc. Prøvene i høyre kolonne er fra metode 3-2. Hver fjerde prøve er benyttet som negativ kontroll.

Metoder	PCR-program			
	Touchdown metoden	57°C	56°C	55°C
A - 1				
A - 2				
B - 1 (DMSO)				
B - 2 (DMSO)				
C - 1 (MgCl ₂)				
C - 2 (MgCl ₂)				

Tabell 3: Tabellen viser de ulike 4 brønner (inkl. negativ kontroll) per ulik metode benyttet, som henvist i tabell 2. Disse metodene ble kjørt i PCR med touchdown og hybridiseringstemperaturer på 55°C, 56°C og 57°C.

Eks.: Metode A-1 inneholder 7,5 µL Taq polymerase mix, 1 µL primer, 5,5 µL ddH₂O og 0 µL tilsatt MgCl₂. Prøven ble dermed kjørt på touchdown PCR, og 3 PCR-programmer med faste hybridiseringstemperaturer på 55°C, 56°C og 57°C. Alle prøvene gjennomgikk 35 sykluser av PCR.



Figur 9: En endelig gel ble fotografert. Her er den optimale metoden C-1 benyttet og behandlet med PCR med en konstant hybridiseringstemperatur på 56°C. I midten (brønn 10) av hver kolonne er det fylt inn en DNA-ladder for å bedre tolke resultatene. De 4 ytterste brønnene er tomme, da spenningen er svakest her, og brønn nr.2 fra bunnen i kolonne 1 er benyttet som negativ kontroll. Se figur 7 for prøveoppsett.

34 totale prøver, inkludert 1 negativ kontroll, ved bruk av metode C – 1 på 56°C gjennomgikk gelelektroforese. Av de 33 prøvene som inneholdt DNA var 30 av dem positive som vist i gelelektroforesen. Dette gir en suksessrate på 91% ($30/33 = 0,909 \rightarrow 0,909 * 100 \approx 91\%$).

Diskusjon

DNA-konsentrasjon

Basert på resultatene fra den første PCR-analysen, hvor det ble testet for ulike konsentrasjoner av DNA, tyder det på at mengden DNA som ble tilsatt ikke hadde stor innvirkning på amplifiseringen av ITS genet. Ut av prøvene i dette forsøket ser metode 3 – 1 ut til å akkurat gi litt bedre resultater enn de andre prosedyrene, da primer dimer biproduktene er svakest i dette tilfellet. Likevel vises det ingen stor forskjell på amplifiseringen av DNA ved tilsetning av 2, 3 eller 4 μL tilsatt templat-DNA, og i alle tilfeller er det dannet betydelige mengder med mindre genetiske biprodukter. Dette er tydelig ved de mørke markørene til høyre for alle de amplifiserte produktene, da mindre DNA-molekyler vil reise raskere gjennom gelen. Disse produktene utgjøres i stor grad antakeligvis av primer dimere, som er primere som har bundet til andre primere i stedet for templat tråden, og i flere tilfeller måles disse i større grad enn målgenet på gelen. Alle de negative prøvene, som ikke er tilsatt noe av templat-DNAet, har produsert slike genetiske biprodukter, og også produsert noen produkter som er noen basepar lengere enn biproduktene til de positive prøvene. Prøvene ble også testet for ulike konsentrasjoner av ITS primerløsning, hvor metode 1 – 2, 2 – 2 og 3 – 2 ble tilsatt 1,0 mM primerløsning i stedet for 0,5. Disse prøvene har mange flere primer dimere enn prøvene med lavere konsentrasjon av primere, da disse primerne heller har bundet seg til hverandre enn til målgenet og dannet flere biprodukter. Halene til høyre for de amplifiserte målgenene viser også tegn på uspesifikke bindinger.

Dette forsøket viser at en optimalisering må gjøres for å forbedre ITS primernes evne til å binde seg til målgenet i stedet for hverandre. Dette kan gjøres ved å finne en gunstig hybridiseringstemperatur, eller tilsette ulike komponenter som kan fremme spesifikk primerbinding. Tilsetningsreagenser som MgCl_2 eller DMSO kan ha en positiv effekt på bindingen av primerne til målgenet på templatråden.

Prøver behandlet med touchdown-metoden

Ut ifra alle UV-bildene av de endelige PCR-resultatene viser touchdown-metoden det laveste utbyttet av brukbare prøver. Bare en håndfull prøver ble positive, i hovedsak metode A-2 og B-1. Av disse prøvene ser det ut til å være et merkbart antall ikke-spesifikke bindinger. De

positive prøvene fra metode A-2 og B-1 har gjennomgått en reaksjon som resulterte tydelige kopier av det ønskede genet, men halene bak og strekene foran disse merkene i gelen tyder på at det er blitt kopiert opp flere gener som ikke korrigerer med ITS. Det skal også merkes at de to første positive prøvene fra metode C-1 også resulterte i to synlige prøver, men de er betydelig svakere enn prøvene fra metode A-2 og B-1. Den eneste forskjellen mellom metode A-1 og A-2 er mengden primere tilsatt i blandingen, hvilket tyder på at økt mengde primere vil gi flere positive prøver dersom $MgCl_2$ eller DMSO ikke benyttes. Samtidig ser også flere primere ut til å bely flere bindingssteder, og dermed flere uspesifikke DNA-kopier. Alle prøvene har også produsert en viss grad primer dimere hvor primerne ikke har bundet seg til templatet, men har heller en tendens til å binde til hverandre dersom hybridiseringstemperaturen ikke holdes konsistent.

Når det gjelder DMSO-tilsatt *Taq* polymerasen er det derimot oppstått et svakere resultat i prøvene som er tilsatt flere primere. Siden DMSO kan bely flere primerbindinger på tilfeldige steder på målgenet, kan dette være en faktor i hvorfor så mange uspesifikke bindinger kommer frem i disse prøvene. Ved tilsetning av DMSO vil smeltetemperaturen til primerne senkes. Dette har sannsynligvis en sammenheng med at DMSO prøvene gjennomgått touchdown-metode har et bedre utbytte siden hybridiseringstemperaturen blir lavere og lavere for hver syklus i reaksjonen. DMSO sin evne til å forhindre re-hybridisering av denaturert DNA kan også ha hatt en effekt på hvorfor det er amplifisert mer av målgenet her enn hos de andre metodene. Halen til båndene og alle de mørke flekkene lenger utover på gelen viser likevel at det er mange uspesifikke bindinger her, som kan indiseres ved bruk av DMSO.

$MgCl_2$ fungerer både som en co-faktor for *Taq* polymerase, og legger til rette for en mer nøyaktig templat primerbinding. Når det er sagt, har også $MgCl_2$ som funksjon å øke reaksjonens smeltetemperatur. Denne egenskapen til $MgCl_2$ er høyst sannsynlig ansvarlig for det dårlige utbyttet av DNA-kopier i touchdown-metoden. Touchdown PCR har den høyeste temperaturen, men også den laveste etter bare et fåtall sykluser. Dersom temperaturen er høy nok for de første syklusene, vil ikke dette bety stort dersom ingen av de siste 35 syklusene er varme nok i hybridiseringsstadiet til å separere de oppkopierte DNA-trådene. Den eksponentielle fordelingen av nye kopier stopper opp alt for tidlig i reaksjonen til å gi et godt utbytte. $MgCl_2$ s egenskaper til å påvirke *Taq* polymerase og primerbinding kan ikke ha virkning dersom smeltetemperaturen er for høy. Derfor er $MgCl_2$ ikke gunstig for en touchdown PCR-reaksjon. Primer dimerne i gelen til de siste 8 prøvene viser at primerne for det meste bare har bundet til hverandre i reaksjonen.

Prøver behandlet med 55°C

Reaksjonene som benytter faste temperaturer i hybridiseringsstadiet har, i motsetning til touchdown-metoden, bare positive prøver og med betydelig mindre uspesifikke DNA-kopier. I reaksjonen som benyttet 55 °C som hybridiseringstemperatur er prøvene konsise i utbytte, men er også noe svakere enn i reaksjonene med hybridiseringstemperaturer 56 og 57°C. Av disse prøvene har metodene B-1, B-2, C-1 og C-2 et større utbytte av kopierte prøver enn metode A-1 og A-2, men halene bak på gelen viser til at det er kopiert opp flere uspesifikke produkter her. Både tilsatt DMSO og MgCl₂ øker sjansen for flere ikke-spesifikke produkter dersom større mengder benyttes. Det gir derfor mening at metode A-1 har det laveste utbyttet av uspesifikt DNA siden disse prøvene inneholder det laveste nivået av begge kjemikalene, og også den laveste av de to primerkonsentrasjonene. Færre primere har i dette tilfellet bevist seg å resultere i et mindre utbytte av totalt kopiert DNA, men dette betyr også at, gjennom relasjon, er det blitt kopiert opp færre ikke-spesifikke DNA-tråder. Metode A-2 har en høyere konsentrasjon av ITS primer, hvorav et større antall av disse har bundet seg til tilfeldige steder på templatet og resultert i uspesifikke bindinger. Spesielt i de to siste prøvene fra denne metoden.

Prøver behandlet med 56°C

I PCR-reaksjonen hvor 56°C ble benyttet for hybridiseringstemperatur ble det produsert betydelige mengder av det ønskede målgenet. Ut av alle metodene som ble testet ga metodene B-1 og B-2 de sterkeste UV signalene, men disse prøvene har også tydelige spor på uspesifikke bindinger. Liknende spor finnes også i mindre grad for metode A-1, A-2 og C2 i denne gelen, mens metode C-1 har gelens laveste innhold av ikke-spesifikke kopier. Denne metoden kombinert med PCR-protokollen resulterte også i en av de mest konsentrerte prøvene ut ifra alle gelene. Dette er trolig grunnet en kombinasjon av MgCl₂'s økning av smeltetemperaturen og den lavere konsentrasjonen av primere. Økning av smeltetemperaturen gir en mer presis primerbinding og mer effektiv templat-syntetisering, og den lavere konsentrasjon av primere gir færre primere som kan bindes til feil sted på templatet eller til andre primere.

Prøver behandlet med 57°C

PCR-prøvene som ble behandlet med en hybridiseringstemperatur på 57°C hadde, blant de ulike PCR-programmene, det største utbyttet av amplifisert DNA. Målgenet ITS ble oppkopierte her i betydelige sterkere grad enn prøvene behandlet med 55°C, 56°C og touchdown-metoden. Av disse prøvene har prøvene fra metode B-2 de mest konsentrerte amplifiseringene med en skarp rett linje gjennom alle tre prøvene, og de alle de andre prøvene har også har også veldig gode amplifiseringer. Denne gelen er også den med de færreste primer dimere og genetisk biprodukt som er mindre enn målgenet, med et unntak av metode C-2. Dette kan tyde på at en hybridiseringstemperatur på 57 °C muligens er den gunstigste temperaturen for å få ITS4 og ITS5 til å binde seg til templatstråden og ikke til andre primere. MgCl₂ kan, som tidligere nevnt, føre til uspesifikke produkter og ut av prøvene med tilsatt MgCl₂ har prøven med høyest primerkonsentrasjon fått primer dimere.

Halene bak de ellers konsentrerte amplifiserte målgenene bør også tas i betraktning. I hver av de ulike metodene er det tydelige haler som indikerer visse mengder med uspesifikke bindinger, genetisk materiale som er lengre i basepar enn målgenet. Dette er spesielt tydelig i metode B-2. DMSO kan forårsake bindinger til uspesifikke steder på målgenet, og siden det er tilsatt flere primere her har antakelig flere av disse bundet seg til templatet på uspesifikke steder som fører til disse halene. Prøvene amplifisert med en hybridiseringstemperatur på 57°C har altså det minste antallet primer dimere av alle gelene, men de har fortsatt ikke det minste antallet uspesifikke bindinger. Flere av primerne her har heller bundet seg til feil steder på templatet i stedet for hverandre.

Tilsetningsreagenser

De ulike temperaturbehandlingene av PCR-reaksjonene hadde åpenbart en innvirkning på det endelige utbyttet av amplifisert DNA, men for å forklare alle reaksjonene i detalj må effektene av de ulike tilsetningsvariablene diskuteres.

Primerkonsentrasjonen ble testet for en konsentrasjon på 0,67 µM og 1,3 µM, og en høyere konsentrasjon av primere har i dette forsøket vist å forårsake flere uspesifikke bindinger. Dette kan spesielt sees i gelene til prøvene behandlet med 55 og 57 °C. I 55 °C gelen er har annenhver prøvegruppe nesten ingen primer dimere, mens prøvene som ble tilsatt 1,3 µM primerløsning har tydelige mørke flekker lenger ut på gelen. I 57 °C gelen er det samme sant for halene bak prøvene som indikerer uspesifikke lengre genetiske produkter. I touchdown-

gelen stemmer dette med prøvene som ikke ble tilsatt DMSO eller MgCl₂, og selv om effektene av primerkonsentrasjon er noe uklart i 56 °C gelen er det fortsatt så vidt synlig med flere uspesifikke produkter i prøvene med mer primerløsning. Ut ifra prøvene kan det konkluderes at en konsentrasjon på 0,67 µM primerløsning egner seg bedre enn en på 1,3 µM, som stemmer godt overens med uttalelsen at 0,1-1 µM er området primerløsning normalt tilsettes ved oppsett av en PCR-reaksjon. [36]

DMSO har også hatt tydelige effekter på amplifiseringen av målgenet i prøvene. Dette er tydelig i touchdown-gelen hvor de eneste prøvene med brukbare mengder kopiert mål-DNA var de som ble tilsatt DMSO. Her var trolig DMSO's evne til å senke smeltetemperaturen til primerne den største faktoren i hva som forårsaket dette. Det kan likevel determineres at touchdown-metoden ikke resulterte i et godt utbytte i noen av prøvene da de DMSO-tilsatte prøvene også produserte masse uspesifikke produkter. Når det gjelder de andre gelene, ser det ikke ut som at prøvene med konstante hybridiseringstemperaturer har et behov for en senkning av smeltetemperaturen, siden metode A-1 og A-2 begge har produsert relativt stabile amplifiseringer i de 3 andre gelene. DMSO tilsatte prøver i disse gelene har også vist seg å produsere tydelige haler som indikerer uspesifikke bindinger og produksjon av uspesifikke produkter. Halene til metode B-1 og -2 er mer fremtredende enn halene til metode A-1 og -2 i alle gelene. Det kan derfor konkluderes at DMSO's evne til å senke smeltetemperaturen til ITS primerne ikke gjør opp for dannelsen av uspesifikke bindinger, dersom det ikke er et behov for å senke smeltetemperaturen i utgangspunktet.

Det bør også betraktes at DMSO kan ha negative helseeffekter ved lengre eksponering. For biodiversitetsanalyser, som er prosesser som krever mange polymerase kjedereaksjoner med langtids-eksponering for DMSO, er de mulige helseeffektene DMSO kan ha på menneskekroppen noe som burde unngås dersom det kan. Hvis PCR-prosedyren ikke har et behov for bruk av DMSO, burde det benyttes andre optimaliseringsteknikker hvis mulig.

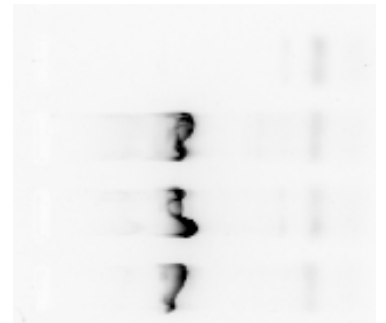
Tilsetningen av MgCl₂ har også hatt tydelige effekter på prøvene. Det øker smeltetemperaturen i stedet for å senke den, som er hvorfor touchdown-metoden ikke amplifiserte målgenet når det ble tilført, og legger til rette for en mer stabil binding mellom templatet og primerne. I prøvene hvor kun 1 µL primerløsning ble tilsatt ble det produsert få mengder med primer dimere, som kan ha vært på grunn av den stabile primer-templat bindingen. I prøvene som ble behandlet med 56°C hybridiseringstemperatur er det amplifiserte DNAet også ganske kompakt og samlet på gelen, hvilket betyr at primerne som

har bundet seg til templatet har hatt en liten grad av feilbindinger. Dette er tydelig på grunn av mangelen på haler i disse prøvene.

Forsøk utført med mest gunstige metode

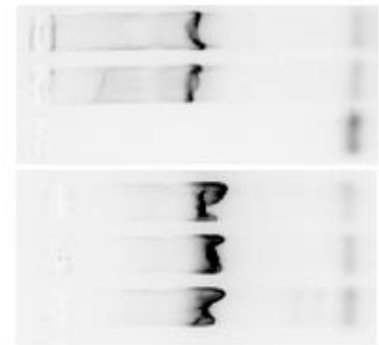
For å finne den optimale metoden for å amplifisere ITS genet, må utseendet til båndene i gelen undersøkes. Det må være liten grad av uspesifikke produkter. Dette gjelder både primer-relaterte biprodukter som primer dimere og mindre genetiske produkter, i tillegg til de større produktene som er uspesifikt bundet. Med andre ord må det ikke være merkbart tydelige haler eller flekker foran båndene som viser amplifisert målgen. Det er også ideelt med prøver som er konsentrerte i amplifiseringen, altså konsentrerte områder på gelen hvor båndene ikke strekker seg utover gelen. I tilfellet til DMSO er det også gunstig med en metode som ikke kan føre til negative helseeffekter dersom en laborant er eksponert for kjemikalet over lengre tid. Det er også verdt å notere at alle prøvene tilført konstante hybridiseringstemperaturer, og et fåtall av prøvene fra touchdown-metoden har tilstrekkelig med DNA for å utføre en suksessfull sekvensering og korrekt artsidentifisering. Likevel, er poenget med optimaliseringen å finne den mest gunstige metoden som vil lede til færrest antall feilidentifiseringer og mulige feilkilder.

Prøvene som er gjennomgått i metode C-1 og behandlet med en hybridiseringstemperatur på 56 °C oppfyller alle disse kravene (figur 10). Prøvene er godt konsentrert i gelen, og har minimalt med spor etter uspesifikke bindinger i form av en hale. Det er et lite tegn på primer relaterte biprodukter foran på gelen, og dette er i relativt liten grad når prøvene sammenliknes med resten av gelen. Disse biproduktene er dessuten langt mindre sannsynlige til å kompromittere sekvenseringen av genet enn lengre uspesifikke produkter som etterlater en hale på gelen. Denne metoden ble derfor valgt for testing på flere PCR-prøver for å se om effektene holdt seg i en større PCR-analyse.



Figur 10: Båndene på gelen hvor metode C-1 ble analysert ved PCR med konstant hybridiseringstemperatur på 56°C. Båndene er konsentrerte og tynne, de har relative usynlige haler og merkene foran på gelen er også lite synlige. Dette tyder på en mer nøyaktig amplifisering med begrenset mengde biprodukter.

I den siste PCR-analysen ble metode C-1 benyttet; altså en tilsetning av 7,5 μL VWR Taq Plus DNA Polymerase Master Mix, 0,67 μM ITS primerløsning, 3,2 μM MgCl_2 og 4,5 μL ddH₂O med en hybridiseringstemperatur på 56°C. Den negative kontrollen nederst til venstre i gelen har produsert en noe større mengde primer dimere enn resten av prøvene da primerne ikke hadde noe templat å binde seg til og heller bandt seg til hverandre. 30 av 33 totale DNA innholdige prøver ble positive, hvilket betyr en suksessrate på 91%. De positive prøvene inneholder mer synlige biprodukter enn prøvene fra C-1 forsøket, både i form av haler og flekker foran på gelen som tyder til noe feilbinding og produksjon av uspesifikke produkter. Prøvene viser også tegn til ulik styrke i amplifiseringen, med enkelte bånd som er mørkere enn andre. Det er spesielt en økning i amplifisering i de første 7 prøvene i gelen, og generelt en relativt liten konsistens i styrken på båndene i gelen. Dette er spesielt tydelig med båndene nederst på gelen (figur 11).



Figur 11: De seks nederste prøvene i gelen hvor den endelige metoden ble testet. De tre øverste prøvene er fra venstre side av gelen, og de tre nederste er fra høyre side. Båndene på høyre side av gelen viser en sterkere amplifisering av målgenet enn prøvene fra venstre side av gelen.

En forklaring på denne forskjellen mellom prøvene kan være relatert til DNA-konsentrasjonen. Optimaliseringsforsøket relatert til konsistensen av templat-DNAet ble utført separat fra optimaliseringen av tilsatte reagenser og PCR-programmer. Dette er i den siste gelen den eneste variabelen som ikke er identiske for alle prøvene. Siden informasjonen om konsentrasjonen til forsørget templat-DNA ikke ble delt ved levering av DNA-prøvene, forble denne informasjonen utilgjengelig i forsøket og kan ha påvirket det endelige resultatet. I utførelsen av den endelige gelen ble det også benyttet ulike DNA-prøver fra de som ble benyttet i optimaliseringsforsøket. Den ulike amplifiseringsstyrken til prøvene i den endelige gelen har derfor trolig en sammenheng med den variable konsentrasjonen til DNA-prøvene forsørget av NINA. De positive prøvene inneholder likevel nok genetisk materiale til å gjennomføre en sekvensering, men den variable båndstyrken og produserte biprodukter kan mulig lede til feilkilder i den endelige sekvenseringen. Derfor kan videre optimalisering av DNA-konsentrasjon benyttet i PCR være gunstig for å oppnå et enda bedre utbytte. Metode C-1 hadde i den siste gelen en suksessrate på 91% av positive prøver, men suksessraten på fullstendig korrekt identifisering av prøvene i en biodiversitet analyse kan ikke konkluderes før en slik analyse er fullstendig gjennomgått fra innsamling av prøver til fullstendig sekvensering levert fra leverandør.

Konklusjon

Ut ifra de parameterne som ble testet i dette forsøket kan det konkluderes med at resultatet som minst sannsynlig vil føre til komplikasjoner ved videre biodiversitet analyse ved bruk av ITS genet er ved bruk av; 0,69 μM ITS primerløsning og 3,2 mM MgCl_2 i en PCR-protokoll på 35 sykluser med en konstant hybridiseringstemperatur på 56°C.

Referanser

- [1] – Hancock L. What is biodiversity? [Internett]. Washington DC: World Wildlife Fund; 2023 [hentet 04.05.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.worldwildlife.org/pages/what-is-biodiversity>
- [2] – Carrington D. What is biodiversity and why does it matter to us? [internett] The guardian. 12. mars 2018 [Hentet 04.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.theguardian.com/news/2018/mar/12/what-is-biodiversity-and-why-does-it-matter-to-us>
- [3] – Steel C. Naturmangfold [internett] Oslo: Saibma; [hentet 04.05.23] Tilgjengelig fra: <https://www.sabima.no/hva-er-naturmangfold/>
- [4] – Universitetet i Oslo. Biodiversitet [internett]. Oslo: Institutt for biovitenskap; 4. februar 2011 [oppdatert 06.01.22; hentet 04.05.23] Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/b/biodivers.html>
- [5] – Miljødirektoratet. Nesten 1500 fremmede arter i Norge [internett]. Trondheim: Miljødirektoratet; 4. mai 2022 [oppdatert 04.05.22; hentet 07.05.23] Tilgjengelig fra: <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/fremmede-arter>
- [6] – Norsk institutt for naturforskning (NINA). Fremmede arter [internett]. Trondheim: NINA; [oppdatert 2023; hentet 07.05.23] Tilgjengelig fra: <https://www.nina.no/Naturmangfold/Fremmede-arter>
- [7] – Miljøministeriet. Hvad er invasive arter? [internett]. Odense, Danmark: Miljøministeriet; [hentet 07.05.23] Tilgjengelig fra: <https://mst.dk/natur-vand/natur/invasive-arter/hvad-er-invasive-arter/>
- [8] – Magnussen K., Lindhjem H., Pedersen S., Dervo B. Samfunnsøkonomiske kostnader ved fremmede arter i Norge: Metodeutvikling og noen foreløpige tall [internett]. Trondheim: Norsk institutt for naturforskning; 5. januar 2015 [hentet 07.05.23 Rapportnr. 52/2014. Tilgjengelig fra: [file:///C:/Users/tobia/Downloads/va2014-52_samfunns_konomiske_kostnader_av_fremmede_arter%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/tobia/Downloads/va2014-52_samfunns_konomiske_kostnader_av_fremmede_arter%20(2).pdf)

- [9] – Westergaard K.B., Hanssen O., Endrestøl A., Often A., Stabbetorp O., Staverløkk A., Ødegaard F. Spredning av fremmede arter med planteimport til Norge. Trondheim: Norsk institutt for naturforskning; 30. oktober 2015 [hentet 07.05.2023] Rapport nr. 1136. Tilgjengelig fra: <https://brage.nina.no/nina-xmlui/handle/11250/2358776>
- [10] – Heide B. R. Forslag til tiltaksplan for bekjempelse av skadelige fremmede organismer [internett]. Trondheim: Miljødirektoratet; 2019 [Hentet 08.05.23]. M-1373. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m1373/m1373.pdf>
- [11] – Norsk institutt for naturforskning. Tidlig oppdagelse av nye fremmede arter [internett]. Trondheim: NINA; [hentet 08.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.nina.no/tidligvarsling>
- [12] – Fløistad I.S., Kaczmarek-Derda W. Hagelupin [internett] Ås: Plantevernleksikonet; [oppdatert 11.10.23 – hentet 22.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.plantevernleksikonet.no/l/oppslag/1624/>
- [13] – Artsdatabanken. *Lupinus polyphyllus* hagelupin [internett] Trondheim: Artsdatabanken; 5. juni 2018 [oppdatert 04.06.23 – hentet 04.06.23] Tilgjengelig fra: <https://artsdatabanken.no/fremmedarter/2018/n/144>
- [14] – Artsdatabanken. Hagelupin *Lupinus polyphyllus* [internett]. Trondheim: Artsdatabanken; 2012 [Hentet 04.06.23]. Tilgjengelig fra: <http://www2.artsdatabanken.no/faktaark/Faktaark241.pdf>
- [15] – Rotevatn S., Mæland M., Astrup N., Bollestad O., Hareide K. A., Bru T., Ingebrigtsen O. E., Sanner J. T., Bakke-Jensen F. Bekjempelse av fremmede skadelige organismer [internett]. Oslo: Klima- og miljødepartementet; Juli 2020 [hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/contentassets/flc4ed10cef245edac260a0c5ba329fe/t-1570-b.pdf>
- [16] – Saibma. Økosystemtjenester – naturens goder [internett]. Oslo: Saibma; [hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra; <https://www.sabima.no/okosystemtjenester-naturens-goder/>
- [17] – Westergaard K. B., Endrestøl A., Hanssen O., Often A., Fossøy, F., Davey M., Dahle S., Åström J., Staverløkk A. Overvåking av spredningsveien planteimport. Basisovervåking 2021 og implementering av miljø-DNA [internett] Trondheim: Norsk institutt for naturforskning; Desember 2021 [hentet 25.05.23]. Rapport nr. 2059. Tilgjengelig fra: <https://brage.nina.no/nina-xmlui/handle/11250/2836528>

[18] – Forest Research. Metabarcoding [internett]. Storbritannia: Forest Research; [oppdatert 2023 – Hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.forestresearch.gov.uk/research/metabarcoding/>

[19] – NorBOL. Hva er DNA-strekkoding? [internett]. Trondheim: NorBOL; [hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.norbol.org/hva-er-dna-strekkoding/>

[20] – International barcode of life. What is DNA barcoding? [internett]. Washington DC, USA: iBOL; [Hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://ibol.org/about/dna-barcoding/>

[21] – Smith M. Polymerase Chain Reaction (PCR) [internett]. USA: National human genome research institute; [oppdatert 02.04.23 – Hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>

[22] – Universitetet i Oslo. PCR [internett]. Oslo: Institutt for biovitenskap; 4. februar 2011 [oppdatert 19.05.23 – hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>

[23] – Khan Academy. Polymerase chain reaction (PCR) [internett]. USA: Khan Academy; [Hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

[24] – Thermo Fisher Scientific. PCR Cycling Parameters – Six Key Considerations for Success [internett]. Waltham MA, USA: ThermoFisher; [Hentet 25.05.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>

[25] – Aoki S., Shteyn K., Marien R. BioRender. Toronto, Canada: BioRender; 2023 [hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.biorender.com/>

[26] – Selvaraj D., Sarma R. K., Sathishkumar R. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding [internett]. USA: National Library of Medicine; 8. september 2008 [Hentet – 20.05.23]. Tilgjengelig fra:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19052662/>

[27] – Nilsson R. H. Tedersoo L., Ryberg M., Kristiansson E., Hartmann M., Unterseher M., Porter T. M., Bengtsson-Palme J., Walker D. M., de Sousa F., Gamper H. A., Larsson E., Larsson K. Kõljalg U. Edgar R.C., Abarenkov K. A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts [internett]. USA: National Library of Medicine; 19. mars 2015 [Hentet 20.05.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462924/>

[28] – bioMérieux. Phylogenetic typing with internal transcribed spacers (ITS) [internett]. Frankrike: bioMérieux; 2023 [Hentet 20.05.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.applied-maths.com/applications/phylogenetic-typing-internal-transcribed-spacers-its>

[29] – Mcbreen K., Lockhart P. J., Melenachan T., Robertson A. The use of molecular techniques to resolve relationships among traditional weaving cultivars of *Phormium* [internett]. New Zealand: ResearchGate; mai 2003 [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: https://www.researchgate.net/figure/of-primers-used-ITS4-and-ITS5-are-standard-primers-for-amplifying-the-ITS-region_tbl2_228814650

[30] – Scitable – by nature education. Gel electrophoresis [internett]. London, Storbritannia: Nature.com; 2014 [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286/>

[31] – Universitetet i Oslo. Gelelektroforese [internett]. Oslo: Institutt for biovitenskap; 4. februar 2011 [oppdatert 28.06.22 – Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gelelektrofor.html>

[32] – Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C., Yong Hoon Kim Y. H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments [internett]. USA: National Library of Medicine; 20. april 2012 [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>

[33] – J. Logan, K. Edwards, N. Saunders. Real-time PCR – Current Technology and Applications. Norfolk, Storbritannia. Caister Academic Press; 2009

- [34] – Thermo Fisher Scientific. How to Simplify PCR Optimization Steps for Primer Annealing [internett]. Waltham MA, USA: ThermoFisher; [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/pcr-annealing-optimization-universal-annealing.html>
- [35] – Korbie D. J., Mattick J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification [internett]. London, Storbritannia: nature protocols; 21. august 2008 [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.133>
- [36] – Thermo Fisher Scientific. PCR Setup – Six Critical Components to Consider. [internett]. Waltham MA, USA: ThermoFisher; [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html#Primers>
- [37] – NVIGEN. DNA Cleanup for NGS Library: Basics, Methods and Examples [internett]. Campbell CA, USA: Nvigen inc.; [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.nvigen.com/dna-clean-up/>
- [38] – Chauhan T. What Is The Function Of MgCl₂ In PCR? [internett]. New Jersey, USA: Genetic Education; 6. august 2028 [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: https://geneticeducation.co.in/what-is-the-function-of-mgcl2-in-pcr/#google_vignette
- [39] – Excedr. What is the Role of MgCl₂ in PCR? [internett]. San Fransisco CA, USA: Excedr; [Oppdatert 09.04.22 – Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.excedr.com/resources/what-is-the-role-of-mgcl2-in-pcr/>
- [40] – Chauhan T. Role Of DMSO In PCR [internett]. New Jersey, USA: Genetic Education; 5. oktober 2018 [Hentet 02.06.23]. Tilgjengelig fra: https://geneticeducation.co.in/what-is-the-function-of-mgcl2-in-pcr/#google_vignette
- [41] – Madsen B. K., Hilscher M., Zetner D., Rosenberg J. Adverse reactions of dimethyl sulfoxide in humans: a systematic review [internett]. Washington DC, USA: National Library of Medicine; 6. august 2019 [Hentet 04.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707402/>

[42] – PubChem. Compound summary Dimethyl Sulfoxide [internett]. Bethesda MD, USA: National Library of Medicine; 16. september 2004 [Oppdatert 04.06.23 – Hentet 04.03.23]. Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethylsulfoxide>

[43] – VWR International. VWR Taq Plus DNA Polymerase Master Mix [internett]. Haasrode, Belgia: VWR Life Science; Oktober 2019 [Hentet 04.06.23]. Tilgjengelig fra: https://no.vwr.com/assetsvc/asset/no_NO/id/28580918/contents/tds-vwr-taq-plus-dna-polymerase-master-mix-500-reactions.pdf

[44] – Lan V. T. T., Loan P. T. T., Duong P. A. T., Thanh L. T., Ha N. T., Thuan T. B. Straightforward Procedure for Laboratory Production of DNA Ladder. Washington DC, USA: National Library of Medicine; 12. februar 2012 [Hentet 04.06.23]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306978/>

Vedlegg: Volum- og konsentrasjonsutregninger

Primerløsning tabell 1

ITS primerløsningen hadde en startkonsentrasjon på $10 \mu\text{M}$, og skulle tilsettes i reaksjonsrør med et totalvolum på $15 \mu\text{L}$ for å oppnå en konsentrasjon på $0,5 \mu\text{M}$. Volumet som tilsattes ble derfor;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$v2 = \frac{c2 * v2}{c1}$$

$$v1 = \frac{0,5\mu\text{M} * 15\mu\text{L}}{10\mu\text{M}}$$

$$c2 = \frac{(5 * 10^{-7}) * (1,5 * 10^{-5})}{(1 * 10^{-5})}$$

$$\underline{v1 = 7,5 * 10^{-7}\text{L}}$$

$$\underline{v1 = 0,75 \mu\text{L}}$$

For å oppnå en konsentrasjon på $1,0 \mu\text{M}$, ble tilsetningsvolumet;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$v2 = \frac{c2 * v2}{c1}$$

$$v1 = \frac{1,0\mu\text{M} * 15\mu\text{L}}{10\mu\text{M}}$$

$$c2 = \frac{(1 * 10^{-6}) * (1,5 * 10^{-5})}{(1 * 10^{-5})}$$

$$\underline{v1 = 1,5 * 10^{-6}\text{L}}$$

$$\underline{v1 = 1,5 \mu\text{L}}$$

Primerløsning tabell 2

Kommersiell ITS primerløsning har en konsentrasjon på 10 µM

I halvparten av metodene ble 1 µL tilsatt, hvilket gir en konsentrasjon på;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$c2 = \frac{c1 * v1}{v2}$$

$$c2 = \frac{10\mu\text{M} * 1\mu\text{L}}{15\mu\text{L}}$$

$$c2 = \frac{(1 * 10^{-5}) * (1 * 10^{-6})}{(1,5 * 10^{-5})}$$

$$c2 = 6,67 * 10^{-7}$$

$$\underline{\underline{c2 = 0,67\mu\text{M}}}$$

I halvparten av metodene ble 2 µL tilsatt, hvilket gir en konsentrasjon på;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$c2 = \frac{c1 * v1}{v2}$$

$$c2 = \frac{10\mu\text{M} * 2\mu\text{L}}{15\mu\text{L}}$$

$$c2 = \frac{(1 * 10^{-5}) * (2 * 10^{-6})}{(1,5 * 10^{-5})}$$

$$c2 = 1,33 * 10^{-6}$$

$$\underline{\underline{c2 = 1,3\mu\text{M}}}$$

DMSO

Kommersiell DMSO-tilsatt *Taq* polymerase mastermix har en DMSO konsentrasjon på 0,1mM. I den endelige løsningen blir konsentrasjonen;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$c2 = \frac{c1 * v1}{v2}$$

$$c2 = \frac{0,1\text{mM} * 7,5\mu\text{L}}{15\mu\text{L}}$$

$$c2 = \frac{(1 * 10^{-4}) * (7,5 * 10^{-6})}{(1,5 * 10^{-5})}$$

$$c2 = 5 * 10^{-5}$$

$$\underline{\underline{c2 = 0,05mM}}$$

MgCl₂

Kommersiell *Taq* polymerase (VWR Taq Plus DNA Polymerase Master Mix) hadde en MgCl₂ konsentrasjon på 3,0mM, hvilket ga en endelig konsentrasjon på;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$c2 = \frac{c1 * v1}{v2}$$

$$c2 = \frac{3,0\text{mM} * 7,5\mu\text{L}}{15\mu\text{L}}$$

$$c2 = \frac{(3 * 10^{-3}) * (7,5 * 10^{-6})}{(1,5 * 10^{-5})}$$

$$c2 = 1,5 * 10^{-3}$$

$$\underline{\underline{c2(A1 - B2) = 1,5mM}}$$

Konsentrasjonen av MgCl₂ løsningen tilsatt til metode C – 1 og C – 2 var 25mM, hvilket ga en endelig konsentrasjon på;

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

$$c2 = \frac{c1 * v1}{v2}$$

$$c2 = \frac{25\text{mM} * 1\mu\text{L}}{15\mu\text{L}}$$

$$c2 = \frac{(2,5 * 10^{-2}) * (1 * 10^{-6})}{(1,5 * 10^{-5})}$$

$$c2 = 1,6 * 10^{-3}$$

$$\underline{\underline{c2(tilsatt) = 1,67mM}}$$

$$\underline{\underline{c2(C1 + C2) = 1,5mM + 1,67mM = 3,2mM}}$$

