

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Dette er en masteroppgave i mikrobiologi ved Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB), institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Arbeidet har blitt utført hos Forsvarets Forskningsinstitutt (FFI), avdeling Beskyttelse fra september 2011 til mai 2012. Professor Janet Martha Blatny har vært fagansvarlig. PhD. Stipendiat Marius Dybwad og forsker Jon Fredrik Hanssen har vært veiledere.

Jeg vil rette en stor takk til PhD. Stipendiat Marius Dybwad for god veiledning og gode synspunkter både i det praktiske arbeidet og skriveprosessen. Jeg vil også takke Jon Fredrik Hanssen for støtte og veiledning i skriveprosessen, samt takke ansatte ved FFI, avdeling beskyttelse for et godt arbeidsmiljø. Av disse vil jeg spesielt takke Ing. Tone Aarskaug for god opplæring og veiledning i laboratoriet.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til min samboer, familie og venner for god støtte gjennom studietiden, og til mine medstudenter for et godt miljø og fem flotte år ved UMB.

Forsvarets Forskningsinstitutt

Kjeller, 15.mai 2012

Maria Hedenstad

Sammendrag

Eksponering overfor bioaerosoler som inneholder patogene mikroorganismer kan påvirke dyr og menneskers helse og dagligliv. For å bedre forstå konsekvensene av eksponering må man tilegne seg mer kunnskap om sammensetningen av bioaerosoler. Dette krever tilgang på, og bruk av effektive metoder, for å kartlegge den totale diversiteten av mikroorganismer i luft, både med dyrkningsbaserte og molekylærbiologiske metoder.

For å isolere total-DNA fra luftbårne mikroorganismer ble det i denne oppgaven testet seks ulike DNA-isoleringsmetoder. Det var deretter ønskelig å undersøke om det var mulig å isolere nok total-DNA fra luftprøver til å utføre direkte pyrosekvensering. DNA-isoleringsmetoder ble testet med kjente bakteriekonsentrasjoner (Gram negative og Gram positive vegetative celler og bakterielle endosporer), med og uten tilsatt luftmatriks. Den mest egnede metoden ble valgt ut fra kriterier som utbytte, renhet og fragmenteringsgrad av det isolerte DNA'et.

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ble brukt til å isolere total-DNA fra luftprøver høstet med SASS 3100 filter-lufthøster og MAS 100 lufthøster på Akershus Universitetssykehus (AHUS). Total-DNA ble analysert ved bruk av kvantitativ sanntids PCR og Quant-iT PicoGreen. Isolering av total-DNA fra luftprøver ga høy nok DNA-konsentrasjon/utbytte til å utføre PCR-baserte analysemetoder som denaturerende gradient gelelektroforese og amplikon-basert pyrosekvensering, men det var ikke nok til å utføre direkte pyrosekvensering. Helgenomamplifisering av det isolerte total-DNA'et ga heller ikke høy nok DNA-konsentrasjon/utbytte til å utføre direkte pyrosekvensering.

Dyrkbar diversitet i luftmiljøet på AHUS ble karakterisert med Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry og viste at *Micrococcus* og *Staphylococcus* var dominerende genus. Denaturerende gradient gelelektroforese ble benyttet for å sammenlikne bakteriell diversitet i luftmiljøet på AHUS og det ble observert at dyrkningsuavhengig diversitet var større enn dyrkbar diversitet.

Observasjonene i denne oppgaven bidrar til en realistisk forståelse av utfordringene knyttet til karakterisering av luftbårne bakterier og isolering av total-DNA fra luftprøver med den hensikt å utføre metagenomanalyser.

Summary

Exposure to bioaerosols that contain pathogenic microorganisms can affect animal and human health and daily life. To better understand the consequences of exposure there is a need to acquire better knowledge about the composition of bioaerosols. Such attempts require access to effective methods for determining the airborne diversity and will include both culture based and molecular methods.

In this study, air samples were added to known concentrations of bacteria (Gram negative and Gram positive vegetative cells and bacterial endospores) to evaluate six DNA extraction methods. It was desirable to investigate their ability to extract metagenomic DNA from bacteria in air samples for the purpose of direct pyrosequencing. The most suitable method was selected based on criteria such as yield, purity and fragmentation of metagenomic DNA.

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit were used to extract metagenomic DNA from air samples harvested with SASS 3100 high-volume air sampler and MAS 100 air sampler at Akershus University Hospital, Akershus Norway (AHUS). Metagenomic DNA was analyzed by quantitative real-time PCR and Quant-iT PicoGreen. The concentration of metagenomic DNA was satisfactory for the performance of Denaturant Gradient Gel Electrophoresis and amplicon-based pyrosequencing. However, the concentration of metagenomic DNA extracted with MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit did not satisfy the criteria of direct pyrosequencing.

Airborne bacteria at AHUS were identified with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and showed that *Micrococcus* and *Staphylococcus* was the dominant genus. Denaturant Gradient Gel Electrophoresis was used to study the bacterial diversity in the air at AHUS. Analysis revealed that that uncultured bacterial diversity was greater than culture based diversity.

The findings of this study contribute to a realistic understanding of the challenges associated with characterization of airborne bacteria and extraction of metagenomic DNA from air samples with the intention to perform metagenomic analysis, such as direct pyrosequencing.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1 Bioaerosoler.....	1
1.2 Prøvetakingsmetoder for bioaerosoler.....	2
1.3 Dyrkningsbaserte analyser.....	3
1.3.1 Klassifisering av mikroorganismer med MALDI-TOF MS.....	3
1.4 Dyrkningsuavhengige analyser.....	4
1.4.1 Metagenomics.....	4
1.4.2 DNA-isolering	4
1.4.3 DNA-isolering for metagenomanalyse.....	5
1.4.4 Bruk av 16S rRNA genet som biomarkør i diversitetsrettet metagenomanalyse..	6
1.4.5 Denaturerende gradient gelelektroforese.....	7
1.4.6 Pyrosekvensering.....	7
1.5 Formål.....	10
2. Materialer og metode.....	11
2.1 Lufthøsting på Akershus Universitetssykehus	11
2.2 Testing av DNA-isoleringsmetoder.....	14
2.2.1 Dyrking og kvantifisering av bakteriestandarder	14
2.2.2 Preparering av luftmatriks	15
2.2.4 Testing av DNA-isoleringsmetoder.....	15
2.2.5 Estimering av bakteriekonsentrasjoner med kvantitativ sanntids PCR.....	17
2.2.6 Kvantifisering av DNA med Quant-iT PicoGreen	19
2.2.7 Gelelektroforese	19
2.3 Analyse av luftprøver fra AHUS	20
2.3.1 Dyrkningsbaserte metoder.....	20

2.3.2 Dyrkningsuavhengige metoder.....	22
3. Resultat.....	27
3.1 Testing av DNA-isoleringsmetoder.....	27
3.1.1 Testing av DNA-isoleringsmetoder uten tilsatt luftmatriks	28
3.1.2 Testing av DNA-isoleringsmetoder tilsatt luftmatriks fra AHUS.....	29
3.1.3 Testing av DNA-isoleringsmetoder tilsatt blandingsluftmatriks.....	30
3.2 Analyse av luftprøver fra AHUS	32
3.2.1 Dyrkningsbaserte analyser.....	32
3.2.2 Dyrkningsuavhengige analyser	38
4. Diskusjon.....	44
4.1 Litteraturstudie.....	44
4.2 Sammenlikning av DNA-isoleringsmetoder	45
4.3 Analyse av luftmiljøet på AHUS.....	46
4.3.1 Dyrkningsbaserte analyser.....	46
4.3.2 Dyrkningsuavhengige analyser	47
4.3.4 Videre arbeid	51
5. Konklusjon	53
Referanser.....	54
Vedleggsliste	60

1. Introduksjon

1.1 Bioaerosoler

Bioaerosoler er luftbårne partikler i størrelsesorden 20 nm til 100 μm , som inneholder mikroorganismer eller organisk materiale (Douwes et al. 2003; Gilbert & Duchaine 2009). Bioaerosoler i størrelse 1-10 μm kan inhaleres av mennesker gjennom nese og munn og dersom de er mindre enn 5 μm kan de penetrere inn til lungene (Cole et al. 1999; Douwes et al. 2003; Forcier 2002; Gilbert & Duchaine 2009; Stetzenbach et al. 2004).

Bioaerosoler kan bestå av ufarlige, opportunistiske og patogene mikroorganismer i form av viable, ikke-viable eller døde bakterier, sopp, virus etc. (Douwes et al. 2003). De fleste mikroorganismer som er til stede i miljøet er ikke helseskadelige, men i bioaerosoler, både innendørs og utendørs, kan noen finnes i unormalt høye konsentrasjoner. Inhalering av bioaerosoler som inneholder høye konsentrasjoner av opportunistiske mikroorganismer eller infektiv dose av patogene mikroorganismer, kan føre til inflammasjon, respiratoriske allergier og infeksjon, særlig blant immunsvake personer (Forcier 2002).

”Luft i seg selv representerer ikke et miljø hvor mikroorganismer kan vokse” (Gilbert & Duchaine 2009), men de vil kunne overleve i luften ved at de aerosoliseres. Aerosolisering kan skje ved at mikroorganismene festes i støv og vanndråper som spres over et område (Forcier 2002; Tringe et al. 2005). Nesten alle miljøer som er reservoar for mikroorganismer kan også være en kilde til bioaerosoler og det er en økende interesse for helseeffekter assosiert med dem da kostnadene for samfunnet i slike tilfeller er enorme (Douwes et al. 2003; Gilbert & Duchaine 2009).

Innleggelse på sykehus kan ofte føre til at pasienter pådrar seg sykehusinfeksjoner, deriblant luftbårne (Scheel & Stormark 1999). Studier har også vist at det er høy forekomst av luftveisinflammasjon blant arbeidere innenfor ulike industrier og miljøer, for eksempel blant arbeidere innen avfallssektoren som ofte utsettes for høye konsentrasjoner av mikroorganismer (Douwes et al. 2000; Douwes et al. 2003; Xu et al. 2011). Spredning av virus på tvers av mennesker og dyr har blitt observert, blant annet fugleinfluensaviruset (H5N1) som for første gang ble observert i Hong Kong i 1997 og svineinfluensaviruset

(H1N1) (Neumann et al. 2009). I 2001 ble det rapportert om et tilfelle av bioterrorisme i USA med spredning av *Bacillus anthracis* via konvolutter eller pakker (Jernigan 2001).

Skadelige konsentrasjoner av patogene mikroorganismer i luft kan ofte skyldes utiltenkt frigjøring fra naturens side, men det kan også være et resultat av bioterrorisme (Dybwad et al. 2012). Man vet lite om sammensetningen av bakterier i luft og det gjør det vanskelig å forutse hvilke deteksjonsmetoder som kan brukes ved eventuelle utbrudd uten å måtte gjennomgå grundig testing av miljøet på forhånd (Kuske 2006). Bakteriell diversitet i bioaerosoler har blitt undersøkt i flere ulike miljøer og er et viktig steg i riktig retning for å øke kunnskapen om den mikrobielle sammensetningen i bioaerosoler (Bowers et al. 2011; Just et al. 2011; Tringe et al. 2005; Urbano et al. 2011). Å ha gode metoder for deteksjon av den totale diversiteten i luft ved et utbrudd, enten av naturlig årsak eller som følge av bioterrorisme, vil kunne gjøre det enklere å detektere mulig årsak i en tidlig fase og på den måten begrense konsekvensene av utbruddet.

1.2 Prøvetakingsmetoder for bioaerosoler

Høsting av luftbårne mikroorganismer kan enten gjøres passivt eller aktivt. Passiv lufthøsting er en billig og enkel metode for kvalitativt å vurdere et område ved langvarige forsøk og foregår ved at man plasserer åpne skåler med næringsmedium på stedet man ønsker å samle luftbårne partikler fra, hvorpå partikler deponeres på mediet. Passiv lufthøsting kan ikke sies å være kvantitativ, da antall partikler som samles på skålen avhenger av partiklenes størrelse, form og ikke minst luftstrømmer i det aktuelle området (Pasquarella et al. 2000).

Tradisjonelle måter for aktiv lufthøsting er impaction, impingement og filtrering. Ved impaction deponeres partikler fra en luftstrøm ned på en overflate. MAS 100 lufthøster er et eksempel på en impaction metode hvor luftstrøm blir dratt inn i instrumentet og luftbårne partikler blir avsatt direkte på næringsmedium (Kalogerakis et al. 2005). Dersom hensikten med studien er å se på levende mikroorganismer vil dyrkningsbaserte analyser og mikroskopering være hensiktsmessig. Impingement vil si at luften dras inn ved hjelp av vakuum over i væske. Væsken hindrer mikroorganismene i å tørke ut og gjør det mulig å fortynne prøvene (King & McFarland 2011). Filtreringsmetoden høster luftbårne partikler ved at luft dras gjennom et filter hvorpå partikler deponeres på et filteret (Dybwad et al. 2012).

Benytter man filtreringsmetoder må man imidlertid være oppmerksom på at det kan oppstå dehydrering som følge av en betydelig mengde luft som passerer filteret i tillegg til at man kan måtte fjerne uønsket materiale som har festet seg på filteret, for eksempel fluer, noe som kan være vanskelig uten å berøre filteret (Cox & Wathes 1995).

Valg av lufthøstingsinstrument avhenger av hensikten med studien, sted for prøvetaking og hvilken informasjon man ønsker å oppnå. På sensitive steder som sykehus må man ta hensyn til pasienter og ansatte og lydnivået bør derfor være så lavt som mulig. Skal man derimot ta luftprøve utendørs er ikke lydnivået en begrensende faktor, men man må tenke på temperatur og værforhold. Andre faktorer som at sporer har en tendens til å være resistente mot ytre miljøpåvirkninger, mens vegetative celler lettere blir påvirket av ytre stress, og dermed lettere skadet, må også tas med i vurderingen når man skal bestemme seg for lufthøstingsmetode (Peccia & Hernandez 2006)

1.3 Dyrkningsbaserte analyser

Identifisering og kvantifisering av mikroorganismer har i stor grad vært basert på tradisjonelle dyrkningsmetoder som detekterer aktive metabolske prosesser og fenotypiske karakteristikker (Bizzini & Greub 2010; Seng et al. 2009). Dyrkningsbaserte metoder vil imidlertid ikke kunne detektere mikroorganismer som har andre krav til næring enn det som er tilgjengelig i det valgte næringsmediet, eller mikroorganismer som er stresset eller i en tilstand hvor de er viable, men ikke dyrkbare (VBNC).

1.3.1 Klassifisering av mikroorganismer med MALDI-TOF MS

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) er en teknikk som kan benyttes for å klassifisere sopp og bakterier basert på ribosomale proteiner (Steensels et al. 2011). Ribosomale proteiner fungerer som gode biomarkører for taksonomisk klassifisering da aminosyresekvensene i de ribosomale proteinene er konserverte. Små forskjeller i aminosyresekvensen mellom ulike mikroorganismer gjør at ribosomale proteiner gjør at det egner seg godt som biomarkør (Sun et al. 2006). Mikroorganismene identifiseres ved hjelp av laser-pulser som ioniserer peptidene slik at de akselererer i et elektrisk felt i vakuumet. Ioner med lav masse/ladning vil akselerere

raskere og dermed nå detektoren før molekyler med høy masse/ladning. Fordi dette foregår i vakuum er analysen kun avhengig av masse og påvirkes derfor ikke av andre faktorer. Massespekteret kan deretter leses ved hjelp av tilhørende dataprogram og sammenliknes med lagrede profiler i database for klassifisering på artsnivå (Hortin 2006).

1.4 Dyrkningsuavhengige analyser

Det faktum at < 1 % av mikroorganismene i de fleste miljøer lar seg dyrke i laboratoriet med dagens metoder, gjør at molekylærbiologiske analysemetoder blir mye brukt for deteksjon av mikroorganismer og i studier som omhandler mikrobiell diversitet (Amann et al. 1995).

1.4.1 Metagenomics

I 1980 årene skjedde det et skifte innenfor mikrobiologi. Det ble stilt spørsmålsteget ved den etablerte oppfatningen om at mikroorganismer ikke eksisterte hvis de ikke kunne dyrkes i laboratoriet, og den økende bevisstgjøringen om at det fantes en større diversitet av ukjente mikroorganismer som ikke lot seg dyrke førte til etterlysning av metoder som kunne kartlegge total mikrobiell diversitet. Terminologien metagenomics, også kalt metagenomanalyser, beskriver analyse av det samlede genetiske materialet fra mikroorganismer ved bruk av molekylærbiologiske analysemetoder, enten for å kartlegge funksjonelle egenskaper eller total mikrobiell diversitet i et miljø. Slike metagenomanalyser vil kunne gi verdifull informasjon om struktur og sammensetning av mikrobielle samfunn, noe som kan bidra til en bedre forståelse av oppbyggingen av biologiske samfunn og hvordan mikrober oppfører seg i sitt naturlige habitat (Blanco et al. 1989; Handelsman 2004; Schloss & Handelsman 2005; Streit & Schmitz 2004).

1.4.2 DNA-isolering

For å kunne utføre molekylærbiologiske analyser av miljøprøver må mikrobielle celler ekstraheres fra matrisen og lyses slik at nukleinsyrer kan isoleres. Metoder for å lysere mikrobielle celler kan deles inn i tre hovedgrupper: Mekanisk (bead-beating, fryse/tine behandling), kjemisk (SDS, CTAB, Triton X) og enzymatisk (Lysozyme, Proteinase, RNAse) cellelysering (Bakken & Frostegård 2006; Peccia & Hernandez 2006)

Etter cellelysering er det nødvendig å separere nukleinsyrer fra uønskede komponenter som polysakkarider, lipider og proteiner som kan hemme PCR amplifisering. Slik separering, også kalt rensing av nukleinsyrer, kan blant annet gjøres ved kolonneseparasjon, magnetiske kuler, fenolkloroform eller etanol presipitering (Bakken & Frostegård 2006; Peccia & Hernandez 2006).

1.4.3 DNA-isolering for metagenomanalyse

Isolering av total-DNA (også kalt metagenom-DNA) fra miljøprøver kan være en utfordring da de kan inneholde inhibitorer som kontaminerer det isolerte DNA'et (Streit & Schmitz 2004). I tillegg vil enhver miljøprøve ofte inneholde en blanding av ulike organismer som bakterier, virus, protozoer, alger, sopp, planter og dyr. Hver organisme kan ha flere ulike celler tilstede, for eksempel metabolsk aktive/hvilende vegetative celler og metabolsk inaktive/hvilende sporer fra sopp og bakterier. DNA-isolering kan ha ulik effekt på forskjellige celletyper og det er derfor viktig å teste flere DNA-isoleringsmetoder for å sikre at man får frigjort så mye DNA som mulig og at det isolerte DNA'et er representativt for miljøet det isoleres fra (Marco 2010).

Bakterielle endosporer vil for eksempel kreve kraftigere lyseringsmetoder enn vegetative celler, mens Gram positive celler trenger mer robust lysing av celler enn Gram negative celler på grunn av flere kryssbindinger i peptidoglykanlaget i celleveggen (Peccia & Hernandez 2006). I tillegg kan introduksjon av mekanisk cellelysering for å inkludere nukleinsyrer fra de mer resistente cellene, føre til at nukleinsyrer fra mindre celler og celler som lettere lyseres går tapt som følge av fragmentering av nukleinsyrene (Bakken & Frostegård 2006; Miller et al. 1999). Utfordringer knyttet til dette er tidligere erfart ved FFI. I 2011 ble det observert at 3 minutter bead-beating ga et høyere utbytte av nukleinsyrer fra bakterielle endosporer, mens utbyttet av nukleinsyrer fra vegetative celler ble markant mindre allerede etter kun 1 minutt bead-beating, sannsynligvis på grunn av fragmentering (Valen 2011). Dette bekreftes også i en studie utført av (Peccia & Hernandez 2006) hvor det ble isolert DNA fra jordprøver til PCR-DGGE analyse. Studien viste at mekanisk bead-beating lyserte flere celler, men at det førte til mer fragmentert DNA.

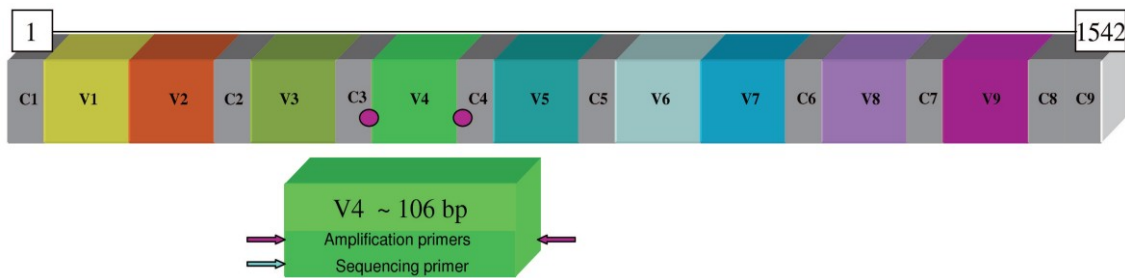
Dersom man har klart å isolere høy nok DNA-konsentrasjon til å utføre direkte pyrosekvensering, for eksempel Roche/454 FLX Pyrosekvensering, vil ikke fragmentering av

DNA være en kritisk faktor da mekanisk nebulisering vil fragmentere DNA'et før emulsjons-PCR (Mardis 2008). Dersom DNA'et skal helgenomamplifiseres, er det derimot en fordel om det er mest mulig høymolekylært. Enzymet ϕ 29 DNA polymerase som benyttes i illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare 2006), er et effektivt enzym for elongering av DNA-templat (Blanco et al. 1989; Hawkins et al. 2002). Dette medfører at høymolekylært DNA vil kunne gi et bedre utbytte i helgenomamplifisering enn DNA som er fragmentert.

1.4.4 Bruk av 16S rRNA genot som biomarkør i diversitetsrettet metagenomanalyse

En biomarkør kan karakteriseres som en "biologisk komponent som indikerer tilstedeværelse av en gruppe mikroorganismer i ulike stadier av taksonomisk oppløsning" (Tzeneva et al. 2008). Eksempler kan være komponenter av celleveggen, DNA, RNA, proteiner eller lipider og et fellestrekk er at alle kan detekteres selv når mikroorganismen er død (Tzeneva et al. 2008).

Genet som koder for den lille subenheten av ribosomalt RNA, også kjent som 16S rRNA i prokaryote og 18s rRNA i eukaryote, er mye brukt som biomarkør innen diversitetsbasert metagenomanalyse da det er universelt distribuert i alle cellulære organismer. At det er funksjonelt homologt på tvers av alle cellulære livsformer bidrar til at det kan gi et bilde av den totale diversiteten i et mikrobielt miljø (Marco 2010; Tzeneva et al. 2008). I tillegg er det funksjonelt begrenset da dets sekundære og tertiære struktur er konservert, det vil si at dets primære sekvens er relativt stabil over tid med hensyn på evolusjon (Marco 2010). Genet inneholder konserverte regioner avbrutt av variable sekvenser med ni hypervariable regioner på mellom 50-100 baser, som gjør det mulig å identifisere, sammenlikne og vurdere cellulære organismer i et gitt miljø (figur 1.1) (Petrosino et al. 2009).



Figur 1.1. Konserverte og hypervariable regioner i 16S rRNA genet. Konserverte regioner (C1-C9) er vist i grått. Hypervariable regioner (V1-V9) vises i ulike farger. Primerforslag for DNA amplifisering og sekvensbasert mikrobiell identifikasjon er illustrert (V4 med rosa sirkler viser primer bindingssete.) (Petrosino et al. 2009).

1.4.5 Denaturerende gradient gelelektroforese

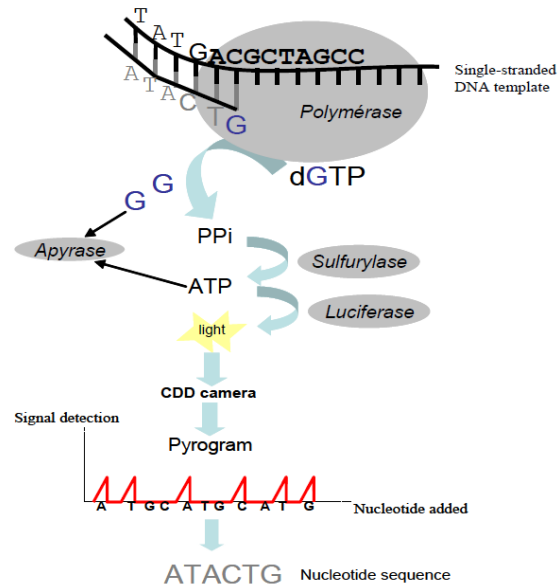
Denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE) kan anses som en metode innenfor metagenomanalyse da den gir et fingeravtrykk av et mikrobielt samfunn ved bruk av 16S rRNA genet som biomarkør. Metoden kan vise mikrobiell diversitet i en prøve ved å separere DNA-fragmenter med hensyn på sekvensbasert smeltepunkt i en polyakrylamidgel med en gradient av kjemisk denaturant. Hvert migrert bånd i gelen vil i prinsippet representere en bakteriell fylogtype (Novais & Thorstenson 2011). Fragmenter som inneholder mange AT vil denaturere raskere enn fragmenter med mange GC, dette fordi AT inneholder færre hydrogenbindinger enn GC. Fragmenter som inneholder mye GC vil derfor holde seg stabile og forbli dobbeltrådet lenger enn fragmenter som inneholder mange AT basepar, og dermed vandre lenger i akrylamidgelen (Hongoh et al. 2003).

Fragmentene som vises i gelen kan kuttes ut av gelen og sekvenseres. Dette er imidlertid ikke den beste måten å oppnå sekvenser på da det er tidkrevende og kan skade DNA'et. I tillegg kan det skjule seg multiple sekvenser bak et bånd i gelen (Hongoh et al. 2003).

1.4.6 Pyrosekvensering

Pyrosekvensering ble utviklet i 1990 årene og tillater direkte sekvensering av PCR produkter, også kalt amplicon-basert pyrosekvensering (Novais & Thorstenson 2011). Amplicon-basert pyrosekvensering er benyttet i flere studier (Dowd et al. 2008; Nonnenmann et al. 2010; Yang

et al. 2012), men enkelte studier har også benyttet direkte pyrosekvensering uten bruk av PCR (Belda-Ferre et al. 2012; Ghai et al. 2011). Mengden DNA som trengs for å utføre direkte pyrosekvensering varierer fra 2 µg (Kilde: Norwegian Sequencing Centre) til 5 µg (Ghai et al. 2011).



Figur 1.2. Pyrosekvensering er en kaskadereaksjon som starter med binding av primer til enkeltrådet DNA templat og polymerisering av nukleinsyrer ved bruk av DNA polymerase. Polymeriseringen frigjør pyrofosfat (PPi) som omdannes til ATP ved hjelp av ATP-sulfurylase. Dette genererer nok energi for Luciferase som omdanner ATP til lyssignal ved oksidasjon av luciferin. Lyssignalet kan leses i et pyrogram hvorpå nukleotidet (ene) som er polymerisert kan bestemmes og som etter hvert kan settes sammen til en sekvens. Enzymet Apyrase degraderer ATP som frigjøres og nukleotider (dNTP) som ikke blir inkorporert. (Novais & Thorstenson 2011) (Ronaghi 2001) (Petrosino et al. 2009). Bilde: (Armougom & Raoult 2009).

At DNA sekvensen leses i sanntid (figur 1.2), gjør pyrosekvensering til en raskere metode enn Sanger dideoxy sekvensering (Novais & Thorstenson 2011).

Første generasjons instrumenter for pyrosekvensering genererte 100 basepar (bp) leselengder og 30-60 Mb/kjøring, noe som er forholdsvis korte leselengder og som gir lite sekvensdata per mikroorganisme. Metoden er stadig i utvikling og tredje generasjons pyrosekvensering kan generere leselengder opp til 350 bp og ca 400 Mb/kjøring. Dette er allikevel forholdsvis korte leselengder og nettopp på grunn av dette fokuserer pyrosekvensering på hypervariable

regioner i den lille ribosomale subenheten, spesielt 16S rRNA genet, hvor lengden på de hypervariable regionene varierer fra 50 til 100 baser. Sekvensdataene kan blant annet benyttes til taksonomisk klassifisering, identifikasjon og diversitetssammenlikning (Petrosino et al. 2009).

1.5 Formål

Ved Forsvarets Forskningsinstitutt (FFI) har det over lengre tid pågått forskning på bioaerosoler, med blant annet testing av lufthøstere, isolering av DNA fra luftprøver og prøveanalyser med både dyrkningsbaserte og dyrkningsuavhengige metoder.

For å kunne studere den totale diversiteten av mikroorganismer i luftprøver settes det høye krav til metodene som benyttes for å isolere total-DNA. Hensikten med denne oppgaven var å finne en DNA-isoleringsmetode egnet for å isolere total-DNA fra luftprøver. Kvantitativ sanntids PCR, gelelektroforese og Quant-iT PicoGreen ble brukt som grunnlag for å kunne vurdere metodene med hensyn på utbytte, renhet og fragmenteringsgrad av det isolerte DNA'et.

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ble brukt til å isolere total-DNA fra luftprøver høstet på Akershus Universitetssykehus (AHUS). Kvantitativ sanntids PCR, Quant-iT PicoGreen og helgenomamplifisering ble brukt til å analysere konsentrasjonen av total-DNA for å undersøke om det var oppnådd høy nok DNA-konsentrasjon/utbytte til å utføre direkte pyrosekvensering.

Dyrkbar konsentrasjon og diversitet av luftbårne bakterier i luftmiljøet på AHUS, ble studert ved beregning av CFU/m³ og klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF MS.

16S rRNA PCR produkt ble benyttet til denaturerende gradient gelelektroforese for å sammenlikne bakteriell diversitet i luftmiljøet på AHUS.

2. Materialer og metode

Reagenser og medier brukt i studiet er gitt i vedlegg A.

2.1 Lufthøsting på Akershus Universitetssykehus

Tid og sted for prøvetaking var 19. Januar kl.16.00 til 20. Januar kl.16.00, 2012 på Akershus universitetssykehus (AHUS). Avdeling "A" og "B".

Høsting av luftbårne partikler ble gjort ved hjelp av en SASS 3100 filter-lufthøster, (figur 2.1.1). Høstingen foregikk i 24 timer med SASS 3100 koblet på et stativ ca. 1,5 meter over gulvet. Luftinntaket ble vasket med 70 % etanol før filteret ble plassert. Luftstrømmen gjennom filteret var 300 liter per minutt, noe som korresponderer til 432 m³ luft høstet i løpet av 24 timer. Når luftstrømmen er 320 liter per minutt er lufthøstingseffektiviteten er ca. 78-79 % for partikler i størrelsesorden 0,5–5,0 µm (Dybwad et al. 2012). En 24-timers prøve ble tatt både på avdeling A og B.

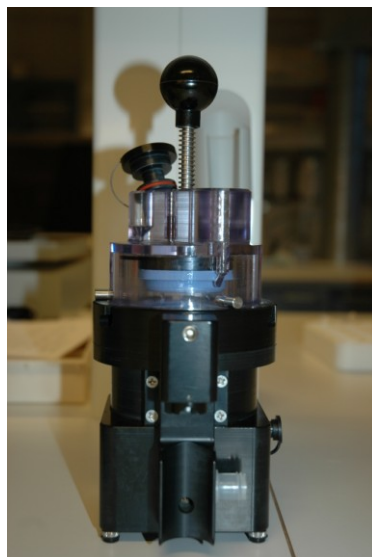


Figur 2.1.1. SASS 3100 filter-lufthøster (Bilde fra AHUS)

Filtrene som ble brukt til lufthøstingen ble behandlet på FFI sitt laboratorium. Transporttid fra AHUS til laboratoriet var ca. 20 minutter og filteret ble oppbevart i en steril plastpose merket med dato og prøvenavn under transport. Luftbårne partikler som var høstet på filteret ble ekstrahert med en SASS 3010 manuell partikkelekstraktor (Figur 2.1.2).

Før filtreringen ble ekstraktoren vasket med ekstraksjonsbuffer (EB) (2×10 ml). Etter å ha plassert filteret i ekstraktoren, ble luftbårne partikler ekstrahert i et 50 ml falconrør ved hjelp av 2×10 ml EB. Filteret ble deretter fjernet og ekstraktoren vasket med EB (2×10 ml) før det ble tilsatt 35 % hydrogen peroksid (20 ml) for 10 minutters vasking av ekstraktoren.

100 μ l ekstrakt (råekstrakt) fra hvert av filtrene ble overført til eppendorfrør merket med navn_dato_avdeling og fryselagret ved -20°C inntil videre analyse med dyrkningsuavhengige metoder. Resten av ekstraktet ble fordelt på to 15 ml falconrør og sentrifugert for å spinne ned bakteriecellene (6000 g, 45 minutter, 5°C) To bakteriepelletter fra hver avdeling (pellett A og B) ble merket med navn_dato_avdeling og fryselagret ved -20°C inntil videre bruk. Halvparten av pellettene fra hver avdeling ble brukt som luftmatriks til testing av DNA-isoleringsmetoder, den andre halvparten+råekstraktene ble brukt til dyrkningsuavhengige analyser av luftmiljøet på AHUS.



Figur 2.1.2. SASS 3010 manuell partikkelekstraktor (Bilde fra FFI)

For tillaging av ekstra luftmatriks til bruk i testing av DNA-isoleringsmetoder ble det høstet luftprøver med SASS 3100 filter-høster på FFI sitt uteområde oktober 2011. Luftprøven ble ekstrahert, sentrifugert ned til pellett og fryselagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ som beskrevet for luftprøver høstet på AHUS.

For å få et inntrykk av dyrkbar diversitet i luftmiljøet på AHUS ble det utført lufthøsting direkte på TSA næringsmedium ved hjelp av MAS 100 mikrobiell lufthøster (figur 2.1.3). MAS 100 ble koblet på et stativ på samme måte som SASS 3100 filter-lufthøster og vendt i en 45 graders vinkel. En steril petriskål støpt med næringsmedium ble plassert i toppen av instrumentet. Luftstrømmen ble satt til 100 liter per minutt, noe som korresponderer til 1 m^3 luft høstet i løpet av 10 minutter. Under lufthøstingen ble luft presset ned på skålen hvorpå luftbårne partikler ble høstet direkte på næringsmedium. Det ble tatt 10, 5 og 2,5 minutters luftprøver både på avdeling A og B, samt en 10 minutters luftprøve i hovedinngangen til sykehuset. 5 og 2,5 minutters prøvene ble tatt på næringsmedium tilsatt det sopphekkende middelet cycloheximid. Skålene ble merket med navn_dato_sted_antall minutter.



Figur 2.1.3. MAS 100 lufthøster (Bilde fra AHUS)

2.2 Testing av DNA-isoleringsmetoder

På bakgrunn av innledende litteraturstudie som omhandlet isolering og direkte pyrosekvensering av total-DNA fra luft og andre matrikser (vedlegg B), samt erfaringer ved FFI, ble det valgt ut seks DNA-isoleringsmetoder for testing. Metodene ble testet på kjente bakteriekonsentrasjoner med og uten tilsatt luftmatriks. For å representere en diversitet bestående av bakterielle endosporer, Gram negative vegetative celler og Gram positive vegetative celler, ble følgende bakteriestammer benyttet: *Bacillus atrophaeus*, *Escherichia coli* og *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*).

2.2.1 Dyrking og kvantifisering av bakteriestandarder

E. coli og *K. rhizophila* ble dyrket på TSA næringsmedium i 48 timer. Deretter ble en koloni inokulert i 5 ml flytende BHI medium og innkubert i 16 timer på risting (200 rpm, 37°C).

Etter 16 timer ble prøven sentrifugert, supernatanten dekantert og 2,5 ml PBS ble tilsatt for vasking av cellene. Det ble laget en fortynningsrekke og antall celler ble kvantifisert i tellekammer i mikroskop, 3×16 ruter (×2). Cellekonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av tellekammer, Thoma Hawksley 1/400 mm², dybde 0,02 mm. Mikroskop brukt var Zeiss, Axiskop2 plus, med linse Zeiss, Achroplan 40×.

Antall celler/ml ble beregnet ved hjelp av formel, Thoma Hawksley 1/400 mm², dybde 0,02 mm:

$$\frac{N_c \times 10^3}{\frac{1}{20} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{50} \times \frac{1}{D}}$$

N_c = gjennomsnitt av 16 ruter. D = fortynningsfaktor.

Prøven ble fortynnet med PBS til ønskelig antall celler/ml (1×10^8). 1 ml prøve ble deretter fordelt i 1,5 ml eppendorfrør og sentrifugert ved 3000 rpm i 6 min ved romtemperatur. Supernatanten ble dekantert og pelleten fryselagret ved -20 °C inntil videre bruk for testing av DNA-isoleringsmetoder.

B. atrophaeus (BG-sporer) (2 mg/ml) ble løst i vann og kvantifisert.

Kvantifisering av bakteriekonsentrasjoner ble utført tre ganger (tabell 2.2.1).

Tabell 2.2.1. Konsentrasjon av *B. atrophaeus*, *E. coli* og *K. rhizophila*. Benevning i celler/ml

Kvantifisering nr.	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>
1*	$7,9 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$
2**	$1,3 \times 10^8$	$6,68 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$ ⁽¹⁾
3***	$6,7 \times 10^8$	$8,3 \times 10^7$	8×10^7

*Benyttet i testing av DNA-isoleringsmetoder uten tilsatt luftmatriks.

**Benyttet i testing av DNA isoleringsmetoder med luftmatriks fra AHUS. ⁽¹⁾ Samme bakteri standard som i *.

*** Benyttet i testing av DNA-isoleringsmetoder med blandingsluftmatriks.

2.2.2 Preparering av luftmatriks

En pellett fra avdeling A og en pellett fra avdeling B ble hver tilsatt 5 ml 1×TE buffer, slått sammen og fordelt i 100 eppendorfrør med 100 µl luftmatriks i hver. For en tredje testing av DNA-isoleringsmetodene ble det laget en ”blandingsluftmatriks” bestående av luft høstet på FFI sitt uteområde oktober 2011, blandet med rester av AHUS luftmatriks høstet med SASS 3100 filter-lufthøster 19.-20. januar 2012.

2.2.4 Testing av DNA-isoleringsmetoder

DNA ble isolert fra kjente konsentrasjoner av *B. atrophaeus*, *E. coli* og *K. rhizophila* (tabell 2.2.1). Alle seks metodene ble først testet med utgangspunkt i 0-volum prøve i form av sentrifugert bakteriepellett uten tilsatt luftmatriks. For testing av DNA-isoleringsmetoder med luftmatriks var startvolumet bakteriepellet + 100 µl luftmatriks i alle metodene.

Det ble utført to DNA-isoleringer med hver metode, både med og uten luftmatriks. Hver DNA-isolering ble utført på to replikate prøver og hver replikat ble kjørt på qPCR som tre replikate brønner. I alle DNA-isoleringsmetodene ble det inkludert to negativ kontroller bestående av reagenser fra DNA-isoleringsmetodene og to prøver bestående av kun luftmatriks.

Det ble laget kokepreparater av kjente konsentrasjoner av *B. atrophaeus*, *E. coli* og *K. rhizophila* ved å tilsette 100 µl TE buffer og koke prøvene ved 95 °C i 10 minutter. Ved DNA-isolering med luftmatriks ble de respektive bakteriestandardene tilsatt 100 µl matriks og kokt ved 95 °C i 10 minutter.

Følgende seks DNA-isoleringsmetoder ble testet:

Biomérieux NucliSens Magnetic Extraction Reagents (vedlegg C)

Utført i henhold til produsentens protokoll.

Mo Bio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MoBioLaboratories-Inc. 2010)

Utført i henhold til produsentens protokoll med følgende modifikasjoner: Mini Bead Beater 8 i 2 minutter.

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit (Epicentre 2012)

Utført i henhold til produsentens protokoll.

Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen 2005)

Utført i henhold til produsentens protokoll med følgende modifikasjoner: Inkuberingstid *E.coli*: 1,5 timer ved 80 °C. *K. rhizophila*: 10 min ved 55°C. *B. atrophaeus*: 10 min ved 55°C deretter 1 time ved 80°C.

QIAamp Stool DNA Purification Kit (QIAGEN 2010)

Utført i henhold til produsentens protokoll.

CTAB kombinasjonsprotokoll ble laget på bakgrunn av artikler og protokoll fra NTNU brukt på oljeprøver. Metoden baserer seg på SDS og organisk separasjon med fenolkloroform og presenteres som CTAB, SDS, fenolkloroform i tabeller og figurer (Henne et al. 1999; Zhou et al. 1996) (Vedlegg D).

Tabell 2.2.2. Oversikt over DNA-isoleringsmetoder testet med tilhørende cellelysering, DNA binding/rensing og elueringsvolum

DNA-isoleringsmetode	Cellelysering	DNA binding/rensing	Elueringsvolum
Biomérieux NucliSens Magnetic Extraction Reagents	Lysisbuffer*	Magnetic beads	100 µl
Mo Bio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit	Bead-beating	Spin filter	50 µl
MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit	Enzymatisk+lysisbuffer*	Enzymatisk	35 µl
Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit	Enzymatisk	Magnetic beads	200 µl
QIAamp Stool DNA Purification Kit	Enzymatisk+Guanidine hydroklorid	Silica membran	200 µl
CTAB, SDS, fenolkloroform	Enzymatisk	Fenolkloroform	50 µl

*Innhold ikke oppgitt

2.2.5 Estimering av bakteriekonsentrasjoner med kvantitativ sanntids PCR

For amplifisering av 16S rRNA genet fra DNA isolert med de ulike DNA-isoleringsmetodene, ble det benyttet kvantitativ sanntids PCR (qPCR) i Light Cycler 480® (Roche).

BSA (10 mg/ml) ble tilsatt reaksjonsblandingen til qPCR for å minske effekten av eventuelle hemmere (tabell 2.2.3). 16S-27F og 16S-1492R primere (tabell 2.2.4), ble brukt for amplifisering av 16S rRNA genet i Light Cycler (tabell 2.2.5).

Alle amplifiseringer ble kjørt med kokepreparater som kontroll for kjøringene i tillegg til negativkontroller fra DNA-isoleringene. Fortynninger av DNA isolert fra *K. rhizophila* tilsatt 100 µl blandingsluftmatriks ble amplifisert med qPCR for å undersøke effekt av luftmatriks på qPCR.

Tabell 2.2.3. Reaksjonsblanding for qPCR. Vist for hver 20 µl prøve

Reagens	Mengde (µl)
2 × Master Miks (SybrGreen)	10
dH ₂ O	2
Primersett ^{a)}	4
Bovine Serum Albumin (13,4 µg/µl)	2
Templat	2
Totalt reaksjonsvolum	20

^{a)} 2µl av hver primer (F+R)

Tabell 2.2.4. Oversikt over primere benyttet, målgen og sekvens

Primer	Målgen	Nukleotidsekvens 5' → 3'	Referanse
16S-27F	16S rRNA*	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Hongoh et al. 2003; Polz & Cavanaugh 1998)
16S-1492R	16S rRNA**	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	(Hongoh et al. 2003; Polz & Cavanaugh 1998)

*Posisjon 8-27

**Posisjon 1492-1513

Tabell 2.2.5. Program brukt til qPCR av 16S rRNA genen på Light Cycler 480®

	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Denaturering	95	5 min	
	Denaturering	95	20 sek
Amplifisering	Annealing	58	20 sek
	Elongering	72	80 sek
Final extention	72	5 min	40

Etter siste syklus ble det utført smeltepunktanalyse med temperaturer på 95-58-95 °C.

Standardkurve for beregning av konsentrasjon (celler/ml) ble laget i Light Cycler 480® (Roche) (vedlegg E). *E. coli* ble løst i PBS og kvantifisert i tellekammer for bestemmelse av konsentrasjonen i celler/ml som beskrevet i avsnitt 2.2.1. Konsentrasjonen ble bestemt til $1,8125 \times 10^9$ celler/ml ved bruk av formel (avsnitt 2.2.1), og det ble laget fortyningsserie hvorpå 1 ml av hver fortyning ble sentrifugert ned for dannelse av bakteriepellett.

DNA ble deretter isolert fra hver bakteriepellett ved hjelp av MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit og fortyningene ble amplifisert ved qPCR (Tabell 2.2.5), for tillaging av standardkurve. For å bestemme forholdet mellom colony forming units (CFU) og celler/ml ble det strøket ut en fortyningsrekke på TSA medium, inkubert ved 37°C over natt (vedlegg E).

2.2.6 Kvantifisering av DNA med Quant-iT PicoGreen

For kvantifisering av DNA-konsentrasjon (ng/ml) og DNA-utbytte (ng) fra de ulike DNA-isoleringsmetodene ble det brukt Quant-iT PicoGreen. Alle forsøk utført med Quant-iT PicoGreen ble utført på Fluostar Optima, BMG.

Bruksløsning av Quant-iT PicoGreen reagent ble laget samme dag som den skulle brukes ved å fortynne reagensen 200 ganger i 1×TE buffer. 100 µl DNA (eventuelt DNA + 1×TE buffer til totalvolum 100 µl) ble tilsatt 100 µl bruksløsning av Quant-iT PicoGreen og inkubert ved romtemperatur i 5 min beskyttet fra lys. Som mål på bakgrunnsstøy ble tre brønner tilsatt 100 µl bruksløsning + 100 µl dH₂O (Invitrogen 2008).

For å kunne beregne DNA-konsentrasjonen i prøvene ble det laget en standardkurve ved hjelp av lambda DNA (100µg/ml). 35 µl lambda DNA ble tilsatt 1465 µl 1×TE buffer for å gi en øvre konsentrasjon i standardkurven på 1000 ng/ml (vedlegg F)

2.2.7 Gelelektroforese

For å undersøke fragmenteringsgrad av DNA isolert med de forskjellige metodene ble DNA kjørt direkte på gelelektroforese etter isolering. Ved tillaging av agarosegel ble 1 gram agarose (LE agarose, Seakem) løst i 100 ml 1×TBE buffer og varmet i mikrobølgeovn ved full effekt i 2 min. Etter å ha blitt kjølt ned til ca. 50 °C ble 1 dråpe SYBR Safe tilsatt og blandet uten dannelse av luftbobler. Blandingen ble helt over i brønn og størknet i 40 min. Gelen ble deretter plassert i elektroforesebad fylt med 1×TBE buffer. For visualisering av DNA'et i prøvene ble det blandet 50:50 med loading buffer (LB). 1 KB pluss DNA ladder (0,7 µg) ble fortynnet med 1 del DNA + 4 deler LB for å gi 0,6–0,8 µg i en brønn med 3-4 µl ladderløsning. Etter applisering på gel ble strømkablene koblet i og spenningen satt til 88 V. Gelen ble kjørt i 15-75 minutter.

2.3 Analyse av luftprøver fra AHUS

Luftprøver høstet med MAS 100 lufthøster på avdeling A, B og hovedinngangen på AHUS, ble dyrket i laboratoriet på FFI. Dyrkningsbaserte metoder ble benyttet for beregning av konsentrasjon av luftbårne bakterier og klassifisering av bakterieisolater ved bruk av MALDI-TOF MS. Det ble isolert total-DNA fra bakteriesuspensjon med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit for bruk til dyrkningsuavhengige metoder.

Luftprøver høstet med SASS 3100 filter-lufthøster ble analysert som rækstrakt og pelletter fra avdeling A og B på AHUS. MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ble brukt til å isolere total-DNA fra rækstrakt og pelletter. Total-DNA fra rækstrakt, pelletter og bakteriesuspensjon ble benyttet i dyrkningsuavhengige metoder som qPCR, Quant-iT PicoGreen, helgenomamplifisering og DGGE.

2.3.1 Dyrkningsbaserte metoder

2.3.1.1 Konsentrasjon av luftbårne bakterier

Skålene fra lufthøsting med MAS 100 lufthøster på AHUS ble fraktet til FFI sitt laboratorium og innkubert ved 30°C i 48 timer. Antall CFU ble telt og konsentrasjonen av luftbårne bakterier beregnet og rapportert som CFU/m³.

2.3.1.2 Renstryking av kolonier for klassifisering med MALDI-TOF MS

For klassifisering av bakterieisolater fra avdeling A og B og hovedinngangen på AHUS, ble det plukket et representativt utvalg bakteriekolonier basert på synlige morfologiske kriterier som størrelse, form og pigmentering, fra skåler høstet med MAS 100 lufthøster. Disse ble renstrøket på TSA næringsmedium. Skålene ble merket med navn_dato_sted_antall minutter og innkubert ved 30 °C over natt. Dersom de viste seg urene, ble de strøket ut flere ganger.

2.3.1.3 Klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF MS

Klassifisering av bakterieisolater ble utført med et MicroFlex MALDI-TOF MS instrument (Bruker Daltonics Inc.) og tilhørende klassifiseringsprogramvare (MALDI Biotyper) og referansedatabase (Bruker Taxonomy). For direkte identifisering av bakterier ble en koloni fra et renstrøket bakterieisolat overført til en spot på MALDI targetplate ved hjelp av tannpirker.

Spoten ble tørket i romtemperatur og overlatt med 1 μl α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matriks. Etter et par minutter i romtemperatur var spoten klar for identifisering.

Bakterieisolater som ikke ga noe resultat (verdi < 2) ved direkte overføring av bakterier, ble forsøkt identifisert med mer omfattende prepareringsprotokoll med etanol/maursyre ekstraksjon. Dette ble utført ved å overføre en enkeltkoloni til et eppendorfrør med 300 μl rent vann. Det ble sørget for en homogen suspensjon ved å pipettere opp og ned og vortekse i minst ett minutt. 900 μl ren etanol ble tilsatt etterfulgt av vorteksing i ett minutt. Prøven ble deretter sentrifugert i 2 min ved 13000 rpm. Supernatanten ble fjernet ved pipettering og prøven sentrifugert på nytt i 2 min ved 13000 rpm (viktig at all etanol blir fjernet). Det ble deretter laget en 70 % maursyre (FA) løsning ved å tilsette 70 μl FA til 30 μl H_2O . 10 μl FA ble tilsatt pelleten og blandet godt med pipettering og vorteksing. Deretter ble et likt volum (10 μl) acetonitril (ACN) forsiktig tilsatt langs kanten av eppendorfrøret. Prøvene ble sentrifugert i 2 min ved 13000 rpm før 1 μl supernatant ble overført til en spot på MALDI targetplate. Prøvene ble tørket på spoten og overlatt med HCCA matriks. Ferdigpreparerte targetplater ble tørket i avtrekkskap i 5 min før videre analyse med MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics 2011)

På hver MALDI targetplate ble en spot tilsatt bakteriestandard for kalibrering av MicroFlex MALDI-TOF MS instrument. Bakteriestandard (BTS) brukt var BRUKER BTS standard (prod. No. 255343) og ble forberedt ved å tilsette 50 μl OS-løsning (tabell 2.3.1) til BTS røret og blandet ved pipettering uten dannelse av bobler. Løsningen ble innkubert i 5 min ved romtemperatur og sentrifugert i 2 min ved 13000 rpm. Løsningen ble allikvotert i rør og fryselaagret ved -18°C inntil videre bruk. (Bruker Daltonics 2011).

For tillaging av HCCA matriks ble TFA og acetonitril tilsatt sterilt, ione-fritt vann (LC-MS Chromasolv), og blandet ved risting. 250 μl Organisk løsning-OS (tabell 2.3.1), ble deretter tilsatt porsjonert HCCA for tillaging av HCCA matriks. Ferdig HCCA matriks lagres mørkt.

Tabell 2.3.1. Organisk løsning-OS

Forbindelse	Volum (μl)
Sterilt ione-fritt vann (LC-MS Chromasolv)	47,5
Trifluoroacetic acid (TFA) 99,9 %	2,5
Acetonitril 100 %	50

2.3.2 Dyrkningsuavhengige metoder

2.3.2.1 Isolering av total-DNA fra luftprøver høstet med SASS 3100 filter-lufthøster

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit (Epicentre 2012) ble brukt til å isolere total-DNA fra råekstrakt og pelleter høstet fra avdeling A og B på AHUS (avsnitt 2.1). Pellett fra avdeling A ble løst i 1 ml vann for å teste effekt av matriks på qPCR, hvorav total-DNA ble isolert fra 150 µl med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit. Det reelle resultatet for denne pelletten vil derfor ligge 6,67 ganger høyere enn resultatene vil vise. Pellett B ble løst i 150 µl 1×TE buffer.

Råekstrakt fra avdeling A og B utgjør hver seg 100 µl av totalt 10 ml ekstrakt fra hver avdeling, ekstrahert med SASS 3010 Manuell partikkelekstraktor. Konsentrasjonen må derfor ganges med 100 for å få konsentrasjonen som var representert i totalt 10 ml ekstrakt.

Det ble inkludert en positiv kontroll i form av bakteriepellet fra BG-sporer og negativ kontroll inneholdende reagenser fra MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit. Rør med isolert total-DNA ble merket med navn_dato og fryselagret ved -20°C.

2.3.2.2 Isolering av total-DNA fra bakteriesuspensjon fra luftprøver høstet med MAS 100 lufthøster

Skålene med bakteriekolonier fra luftprøver høstet med MAS 100 lufthøster på avdeling A og B, samt hovedinngang på AHUS i januar 2012 (avsnitt 2.1), ble hver tilsatt ca 1 ml autoklavert vann for å lage en bakteriesuspensjon på sine respektive skåler. Bakteriesuspensjonen ble overført til eppendorfrør og merket med navn_dato_antall minutter og fryselagret ved -20°C.

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit (Epicentre 2012) ble brukt til å isolere total-DNA fra 100 µl bakteriesuspensjon fra 5 og 10 minutters luftprøver på avdeling A og B. Rør med isolert total-DNA ble merket med navn_dato_antall minutter, og fryselagret ved -20°C.

2.3.2.3 illustra GenomiPhi helgenomamplifisering

Total-DNA isolert fra luftprøver høstet på AHUS, ble helgenomamplifisert ved bruk av illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit. En positiv kontroll inneholdende lambda DNA (10 ng/μl) og negativ kontroll inneholdende reagenser fra illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification kit ble inkludert.

5 μl total-DNA isolert fra råkstrakt og pelletter fra avdeling A og B ble tilsatt 5 μl prøvebuffer. For denaturering av DNA ble prøvene varmebehandlet ved 95°C i 3 minutter og deretter avkjølt til 4 °C på is. 9 μl reaksjonsbuffer og 1μl enzymmiks ble tilsatt og prøvene ble inkubert ved 30 °C i 1,5 timer. Phi29 DNA polymerase ble deretter inaktivert ved å varmebehandle prøvene ved 65 °C i 10 minutter for deretter å bli avkjølt til 4°C på is. Prøvene ble merket med navn_dato_avdeling og fryselagret ved -20 °C (Belda-Ferre et al. 2012; GE Healthcare 2006).

2.3.2.4 Estimering av bakteriekonsentrasjoner med qPCR

Amplifisering av 16S rRNA genet fra total-DNA isolert fra råkstrakt, pelletter (avsnitt 2.3.2.1) og bakteriesuspensjon (avsnitt 2.3.2.2) ble utført i henhold til beskrivelse av qPCR i avsnitt 2.2.5.

For å undersøke effekt av luftmatriks på qPCR, ble det utført inhiberingstest med fortynningsrekker av rene luftmatriks prøver og kokepreparater tilsatt luftmatriks fra AHUS og blandingsluftmatriks.

2.3.2.5 Kvantifisering av DNA med Quant-iT Picogreen

Konsentrasjon (ng/ml) og utbytte (ng) av total-DNA isolert fra råkstrakt, pelletter (avsnitt 2.3.2.1) og bakteriesuspensjon (avsnitt 2.3.2.2), samt helgenomamplifisert total-DNA (avsnitt 2.3.2.3) ble kvantifisert i henhold til beskrivelse i avsnitt 2.2.6.

2.3.2.6 PCR for DGGE

DGGE ble benyttet for sammenlikning av bakteriell diversitet i luftmiljøet på AHUS. 16S rRNA genet i isolert total-DNA fra råekstrakt, pelletter, bakteriesuspensjon og helgenomamplifisert total-DNA, ble amplifisert i Light Cycler 480® (Roche).

BSA (50 mg/ml) ble tilsatt reaksjonsblandingen for PCR for å minske effekten av eventuelle hemmere (tabell 2.3.2). For å hindre fullstendig denaturering av fragmentene i DGGE, ble det benyttet primere med GC-klype, som festes på 5' enden av molekylet under amplifisering (Tzeneva et al. 2008) (tabell 2.3.3).

Det ble testet flere amplifiseringsprogram for DGGE. 50°C annealingstemperatur med 30 sykluser, og 55°C annealingstemperatur med 35 sykluser ble testet med primerkonsentrasjoner på 2 µl og 4 µl. Smeltepunktsanalyse ble inkludert for vurdering av programmene og 55°C annealingstemperatur og 35 sykluser ble brukt til PCR for DGGE (tabell 2.3.4). Smeltepunktsanalyse ble utelatt i det endelige programmet.

Amplifiseringen ble kjørt med kokepreparat som positiv kontroll og dH₂O som negativ kontroll.

Tabell 2.3.2. Reaksjonsblanding for PCR. Vist for hver 20 µl prøve

Reagens	Mengde (µl)
2 × Master Miks (SybrGreen)	10
dH ₂ O	5,6
Primersett ^{a)}	2
Bovine Serum Albumin (50 mg/ml)	0,4
Templat	2
Totalt reaksjonsvolum	20

^{a)} 1µl av hver primer (F+R)

Tabell 2.3.3. Oversikt over primere benyttet i PCR for DGGE

Primer	Målgen	Nukleotidsekvens 5' → 3'	Referanse
Eub F 933	16S rRNA*	GC-klype -GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	(Miller et al. 1999)
EubR 1387	16S rRNA**	GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG	(Miller et al. 1999)
GC-klype		CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGG	(Miller et al. 1999)

*Posisjon 933-955, region: V6, 7, 8

** Posisjon 1387-1368, region: V6, 7, 8

Tabell 2.3.4. Program brukt til PCR amplifisering av 16S rRNA genen til DGGE på Light Cycler 480®

		Temperatur	Tid	Antall sykluser
Denaturering		95	5 min	
	Denaturering	95	20 sek	
Amplifisering	Annealing	55	20 sek	35
	Elongering	72	30 sek	
Final extention		72	20 min	

2.3.2.7 Gelelektroforese

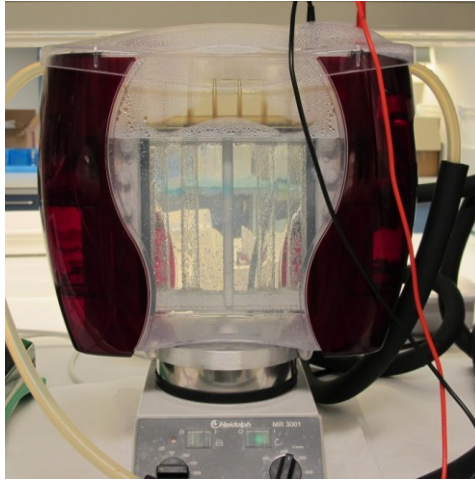
For å detektere 16S rRNA PCR produkt til DGGE ble det benyttet agarosegel. Gelelektroforesen ble utført i henhold til beskrivelse gitt i avsnitt 2.2.7.

2.3.2.8 DGGE

For separering av 16S rRNA PCR produkt ble DGGE utført i et Hoefer Scientific SE600 vertikalt DGGE system (figur 2.3.1), med bruk av en polyakrylamidgel med en denaturerende gradient bestående av urea og formamid. Løsningene DGGE A (0 %) og DGGE B (100 %) ble blandet for å lage løsninger med 20 % og 60 % denaturant konsentrasjoner. 10 % ammonium persulfat (APS) og N’N’N’N-tetrametylendiamin (TEMED) ble tilsatt løsningene for å starte polymeriseringen. Løsningene ble deretter overført til gelformen ved hjelp av en gradientblander for å gi en jevn denaturerende gradient.

Etter støping av gelen ble brønnene vasket med 0,5×TAE buffer for å fjerne rester av urea og formamid. Deretter ble DNA (45 µl) produkt blandet med 10×loading buffer (5 µl) og applisert på gelen. Det ble benyttet et kokepreparat som positiv kontroll og to negativ kontroller som inneholdt reagenser fra DNA-isolering med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit og dH₂O. Gelen ble kjørt på 40 volt i 10 minutter, deretter på 85 volt i 17 timer (vedlegg G).

For fotografering ble gelen fjernet fra gelkammeret og farget med 50 ml 1×TAE med 1×SYBR Gold (10000×SYBR Gold, Invitrogen) og dH₂O i 30 minutter i mørket. Gelen ble deretter avfarget i dH₂O og fotografert på et UV-bord med Canon G12 kamera.



Figur 2.3.1. DGGE kammer (Bilde FFI)

3. Resultat

3.1 Testing av DNA-isoleringsmetoder

DNA isolert med ulike DNA-isoleringsmetoder (tabell 3.1.1), ble analysert ved bruk av qPCR for beregning av konsentrasjon (celler/ml) og Quant-iT PicoGreen ble brukt for å beregne DNA-konsentrasjon (ng/ml). Nedre og øvre deteksjonsgrense for beregning av celler/ml ble kalkulert til henholdsvis $1,8 \times 10^5$ og $1,8 \times 10^{10}$ på bakgrunn av standardkurve (vedlegg E).

Resultater basert på qPCR er ikke kompensert for volumforskjeller mellom metodene da C_T ble regnet om til konsentrasjon (celler/ml) ved bruk av standardkurve. qPCR resultater kompensert for volum (på grunnlag av C_T) ga imidlertid ikke motstridende resultat.

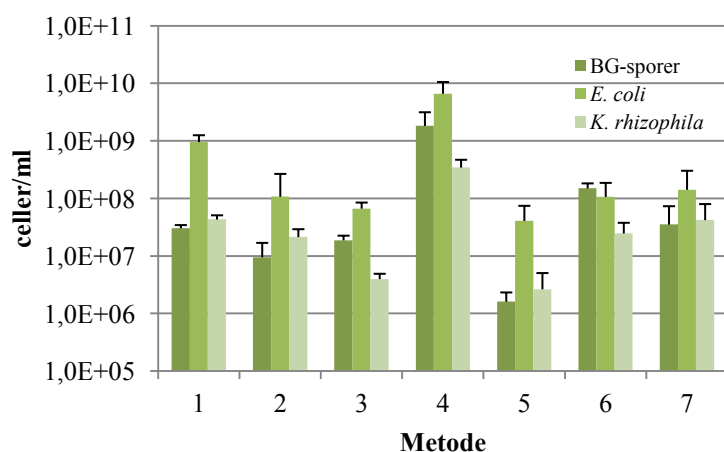
DNA-isoleringene presenteres som gjennomsnitt av to isoleringer der hver isolering ble utført på to replikate prøver og hver replikat ble kjørt på qPCR som tre replikate brønner. Variasjoner mellom de forskjellige bakteriestandardene brukt ble observert for alle testingene av DNA-isoleringsmetoder. Det ble observert at standardavvikene ble mindre etter hver DNA-isolering. Standardavvikene representerer metodens reproduserbarhet, men også variasjon i utførelsen av DNA-isoleringen.

Tabell 3.1.1. DNA-isoleringsmetoder testet, nummerert fra 2-7. Kokepreparat nr.1

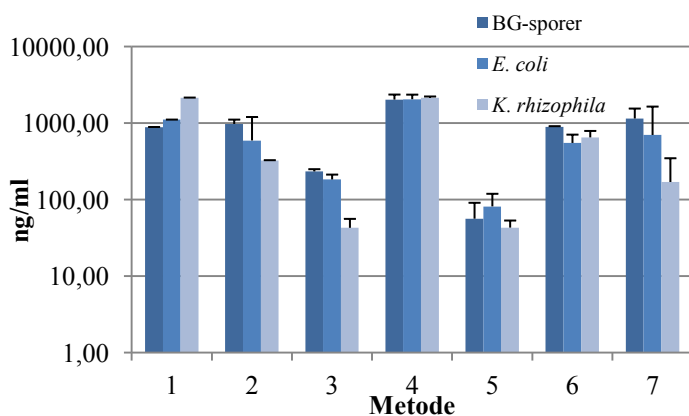
Nummer	DNA-isoleringsmetode	Produsent
1	Kokepreparat	
2	NucliSens Magnetic Extraction Reagents	Biomérieux (Vedlegg B)
3	MoBio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit	(MoBioLaboratories-Inc. 2010)
4	MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit	(Epicentre 2012)
5	QIAamp Stool DNA Purification Kit	(QIAGEN 2010)
6	Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit	(Invitrogen 2005) (Henne et al. 1999; Zhou et al. 1996)
7	CTAB, SDS, fenolkloroform	(Vedlegg B)

3.1.1 Testing av DNA-isoleringsmetoder uten tilsatt luftmatriks

Metode nr. 2-7 ble først testet for DNA-isolering fra kjente bakteriekonsentrasjoner uten tilsatt luftmatriks. qPCR viste at MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ga høyest konsentrasjon (figur 3.1.1). Kvantifisering av DNA med Quant-iT PicoGreen viste at MasterPure Gram Positive DNA isolation Kit ga høyest DNA-konsentrasjon (figur 3.1.2).



Figur 3.1.1. Konsentrasjon (celler/ml) beregnet ved qPCR. DNA-isoleringsmetode brukt vises på x-aksen. Bakteriestandard brukt med tilhørende stolpe vises i grafen.

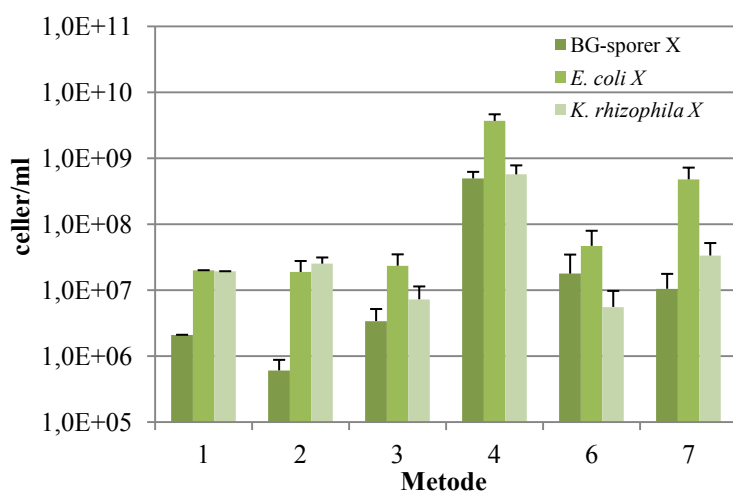


Figur 3.1.2. DNA-konsentrasjon (ng/ml) kvantifisert med Quant-iT PicoGreen. DNA-isoleringsmetode brukt vises på x-aksen. Bakteriestandard brukt med tilhørende stolpe vises i grafen.

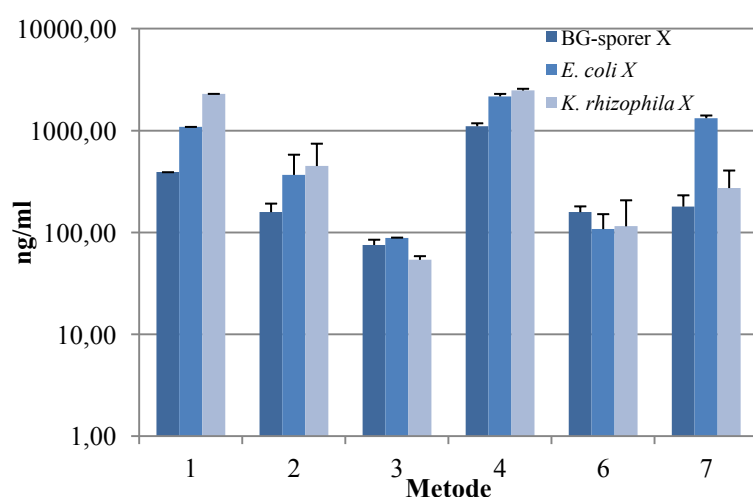
3.1.2 Testing av DNA-isoleringsmetoder tilsatt luftmatriks fra AHUS

På bakgrunn av første test (avsnitt 3.1.1) ble QIAamp Stool DNA Purification Kit (metode 5) utelatt i videre testing.

DNA isolert fra kjente bakteriekonsentrasjoner tilsatt 100 µl luftmatriks fra AHUS analysert med qPCR, viste at MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ga høyest konsentrasjon (figur 3.1.3). Kvantifisering av DNA med Quant-iT PicoGren viste at MasterPure Gram Positive DNA isolation Kit ga høyest DNA-konsentrasjon (figur 3.1.4).



Figur 3.1.3. Konsentrasjon (celler/ml) beregnet ved qPCR. DNA-isoleringsmetode brukt vises på x-aksen. X = bakteriestandard tilsatt 100µl luftmatriks fra AHUS.

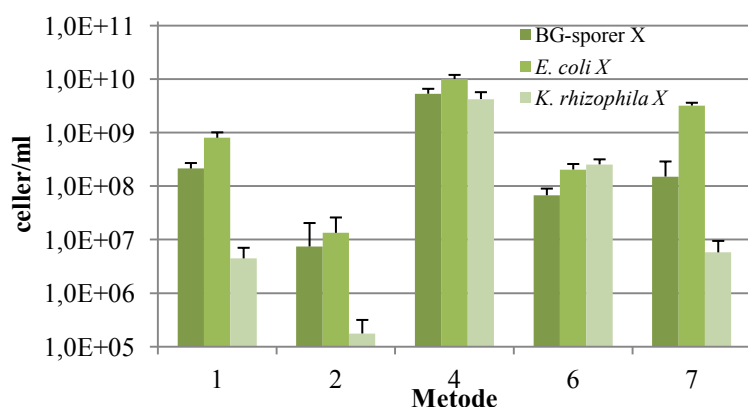


Figur 3.1.4. DNA-konsentrasjon (ng/ml) kvantifisert med Quant-iT PicoGreen. DNA-isoleringsmetode brukt vises på x-aksen. X= bakteriestandard tilsatt 100µl luftmatriks fra AHUS.

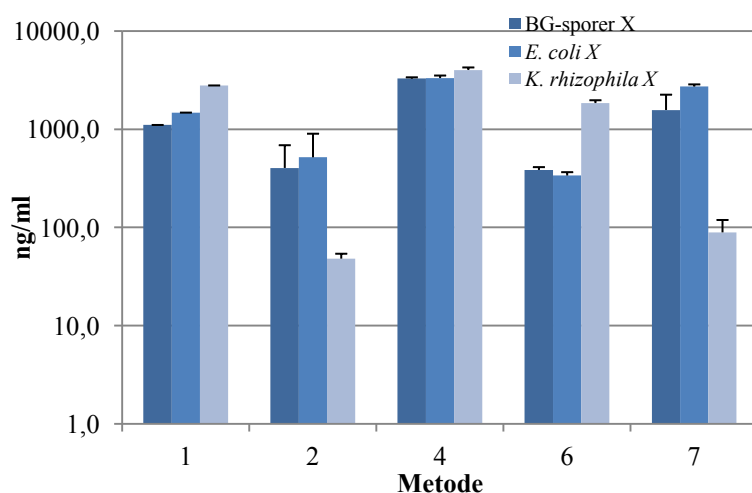
3.1.3 Testing av DNA-isoleringsmetoder tilsatt blandingsluftmatriks

På bakgrunn av test (avsnitt 3.1.2) ble Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (metode 3) utelatt i videre testing.

DNA isolert fra kjente bakteriekonsentrasjoner tilsatt 100 μ l blandingsluftmatriks analysert med qPCR, viste at MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ga høyest konsentrasjon (figur 3.1.5). Kvantifisering av DNA med Quant-iT PicoGreen viste at MasterPure Gram Positive DNA isolation Kit ga høyest DNA-konsentrasjon (figur 3.1.6).



Figur 3.1.5. Konsentrasjon (celler/ml) beregnet ved qPCR. DNA-isoleringsmetode brukt vises på x-aksen. X = bakteriestandard tilsatt 100 μ l blandingsluftmatriks.



Figur 3.1.6. DNA-konsentrasjon (ng/ml) kvantifisert med Quant-iT PicoGreen. DNA-isoleringsmetode brukt vises på x-aksen. X= bakteriestandard tilsatt 100 μ l blandingsluftmatriks.

Isolert DNA fra alle metodene ble kjørt direkte på gelelektroforese uten amplifisering i qPCR for å undersøke fragmenteringsgraden. Det var kun DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation kit som ga synlige bånd i gelen, med en fragmentstørrelse > 12 Kb. Alle DNA-isoleringsmetodene ga imidlertid C_T i qPCR. Dette bekrefter at 16S ble amplifisert og kan tyde på at fragmenteringsgraden var liten.

DNA ble isolert fra 100 µl ren luftmatriks uten bakteriestandard fra AHUS og blandingsluftmatriks med metode 2, 3, 4, 6 og 7. Dette ga generelt lave konsentrasjoner under øvre deteksjonsgrense i standardkurven. Høyeste konsentrasjon målt for luftmatriks ble isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit fra blandingsluftmatriks. Konsentrasjonen målt var $1,2 \times 10^6$ celler/ml i qPCR og en DNA-konsentrasjon på 67,35 ng/ml kvantifisert med Quant-iT PicoGreen. Inhiberingstester viste også at det ble ikke observert effekt av luftmatriks i qPCR.

Basert på kriterier som utbytte, renhet og fragmentering av isolert DNA, ble MasterPure Gram Positive DNA Isolation kit valgt som den mest egnede metoden for isolering av total-DNA fra luftprøver.

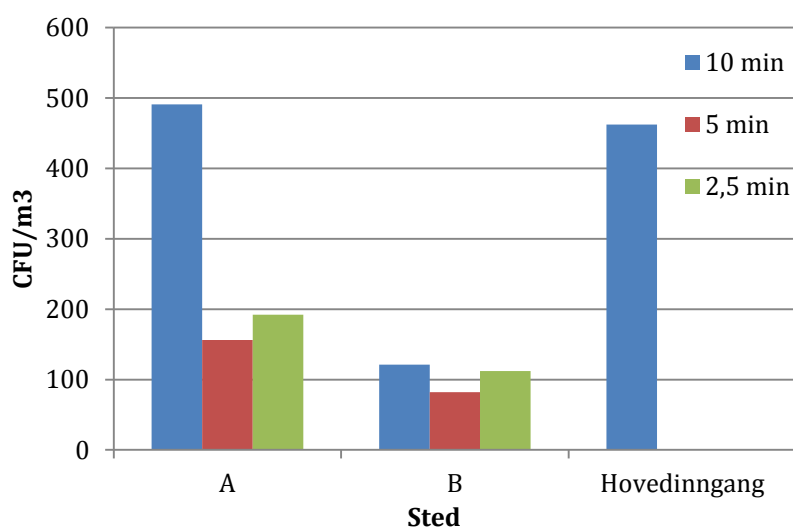
3.2 Analyse av luftprøver fra AHUS

Konsentrasjon av luftbårne bakterier på AHUS ble beregnet (CFU/m³) og bakterieisolater ble klassifisert med MALDI-TOF MS. Total-DNA isolert fra rækstrakter, pelletter og bakteriesuspensjon med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit, ble analysert med dyrkningsuavhengige metoder som qPCR, Quant-iT PicoGreen, helgenomamplifisering og DGGE.

3.2.1 Dyrkningsbaserte analyser

3.2.1.1 Konsentrasjon av luftbårne bakterier

For å studere konsentrasjonen av dyrkbare bakterier i det studerte luftmiljøet på AHUS ble CFU/m³ beregnet (figur 3.2.1). 10 minutters prøvene er tatt på TSA næringsmedium uten tilsatt cycloheximid. 5 og 2,5 minutters prøvene er tatt på TSA næringsmedium tilsatt cycloheximid. Skålene med luft høstet i 10, 5 og 2,5 minutter ble inkubert i 48 timer.



Figur 3.2.1. CFU/m³ fra luftprøve tatt med MAS 100 lufthøster på avdeling A og B, samt hovedinngang AHUS. I hovedinngangen ble det kun tatt en 10 minutters prøve på næringsmedium uten tilsatt cycloheximid. CFU/m³ var høyest på avdeling A både når luft ble høstet på næringsmedium med og uten cycloheximid. For alle tre prøvetakingstedene var CFU/m³ høyest når luft ble høstet på næringsmedium uten tilsatt cycloheximid.

3.2.1.2 Diversitet av luftbårne bakterier

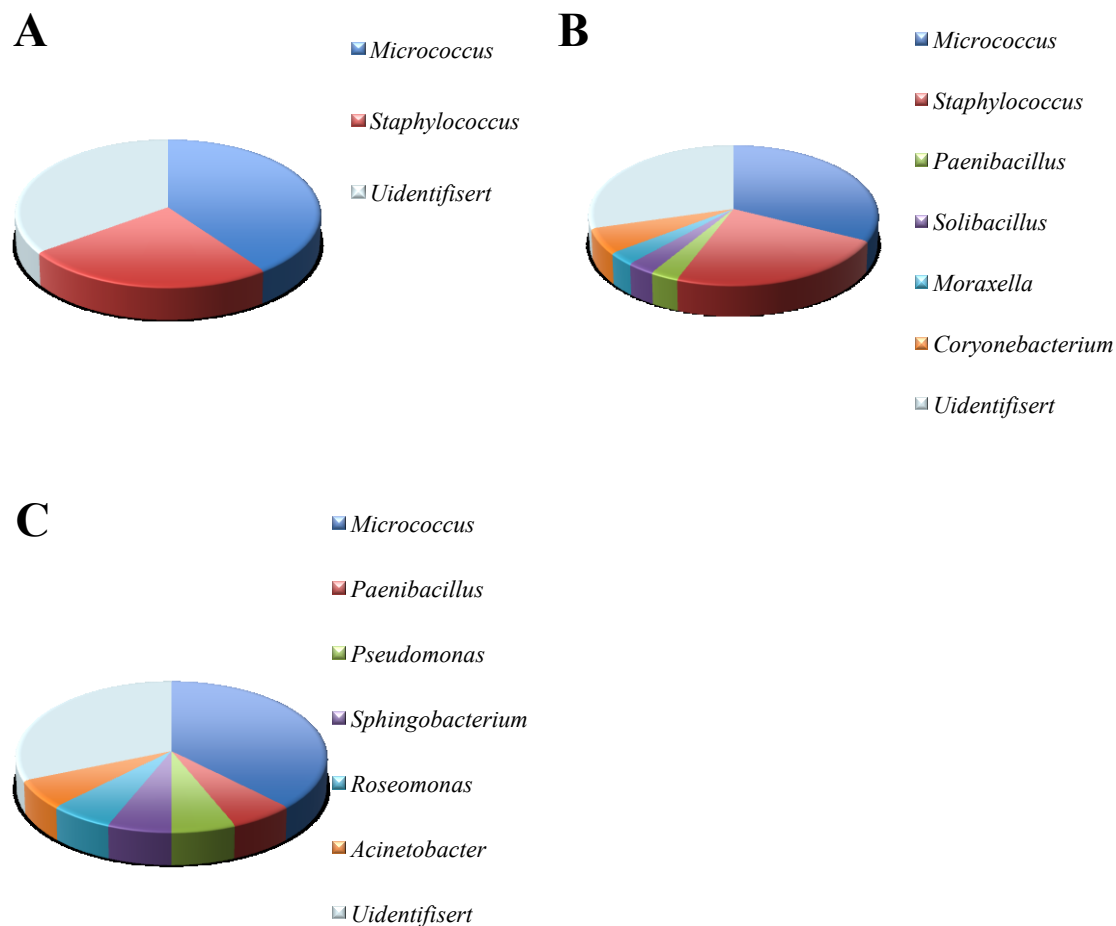
MALDI-TOF MS ble brukt til å klassifisere bakterieisolater fra 10, 5 og 2,5 minuttersprøver på artsnivå, med hensyn på prøvetakingsted, uavhengig av cycloheximid. Diversiteten på artsnivå avhengig av cycloheximid og uavhengig av prøvetakingsted ble også undersøkt. For sannsynlig identifikasjon på artsnivå ble kun verdier > 2 inkludert i resultatene (Bruker Daltonics 2011).

Det ble ikke identifisert sopp verken ved overføring av bakterieisolater direkte til MALDI targetplate eller ved etanol/maursyre ekstraksjon. Det ble observert at diversiteten ble mindre på skåler tilsatt cycloheximid og at omtrent halvparten av koloniene plukket fra næringsmedium uten tilsatt cycloheximid lot seg ikke identifisere på artsnivå (figur 3.2.5).

Resultater presentert som genus er laget på grunnlag av klassifisering på artsnivå. Uidentifiserte kolonier er merket med fargen blåhvit i alle figurer.

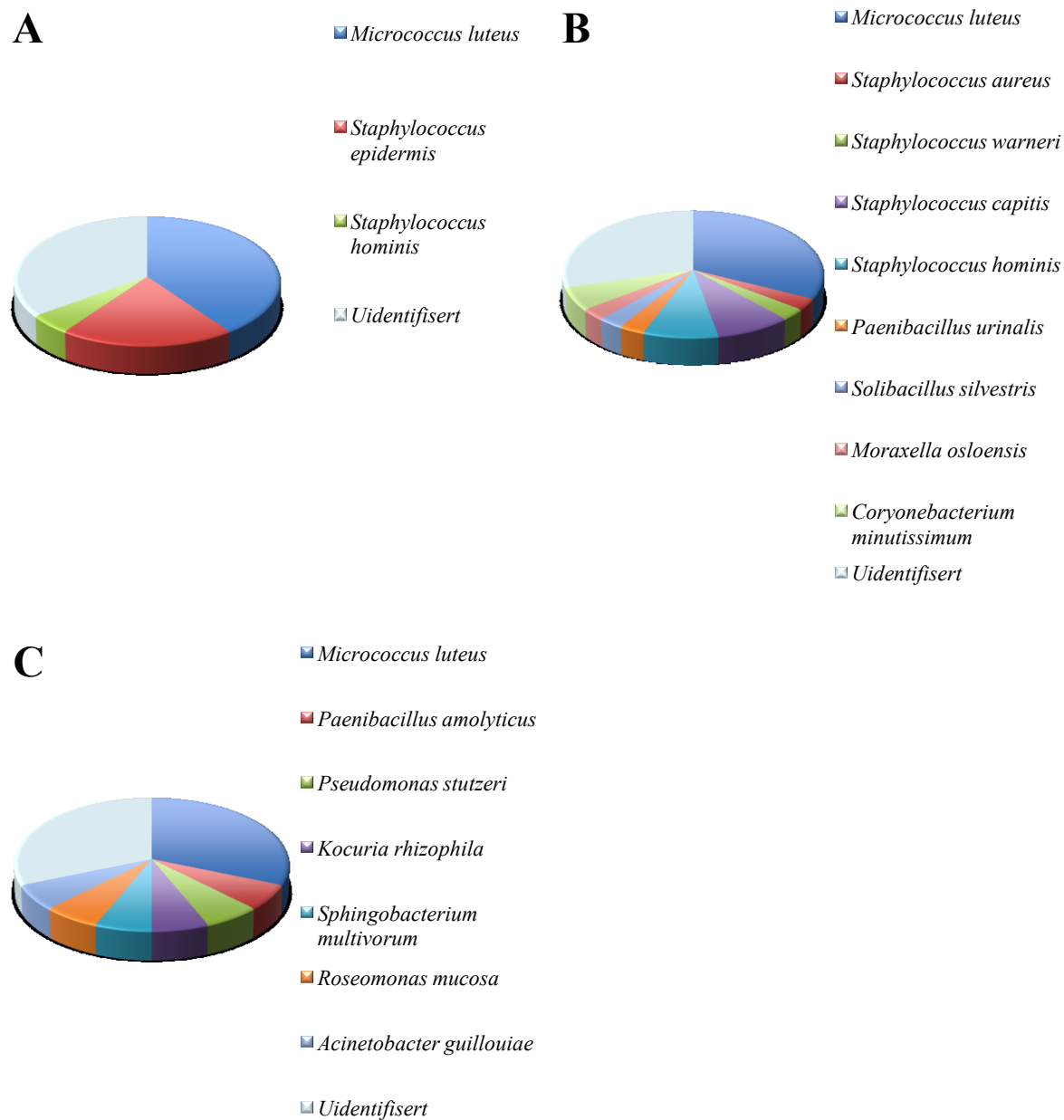
3.2.1.2.1 Diversitet uavhengig av cycloheximid

Dyrkbar diversitet på avdeling A, B og hovedinngangen (C) ble sammenliknet på genus nivå (figur 3.2.2).



Figur 3.2.2. Diversitet på genus nivå på avdeling A, avdeling B og hovedinngang (C) på AHUS. Diversiteten på genusnivå var minst på avdeling A. Diversiteten på avdeling B og hovedinngangen (C) var like stor med hensyn på antall genus representert, men diversiteten var fordelt mellom ulike genus. Den dominerende genus var *Micrococcus* på både avdeling A, B og i hovedinngangen (C).

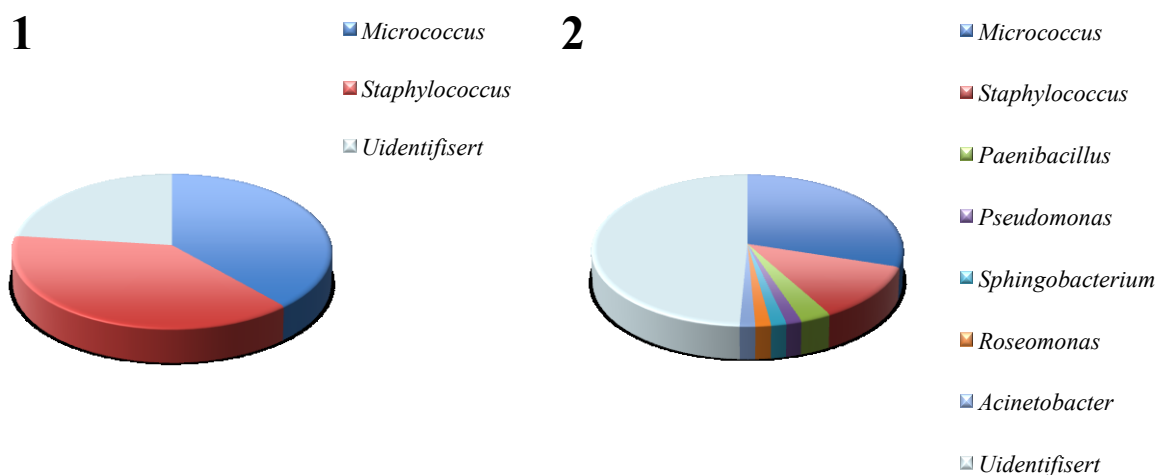
Dyrkbar diversitet på avdeling A, B og hovedinngang (C) sammenliknet på artsnivå (figur 3.2.3).



Figur 3.2.3. Diversitet på artsnivå på avdeling A, avdeling B og hovedinngang (C) på AHUS. Diversiteten på artsnivå var minst på avdeling A og størst på avdeling B. Den dominerende art på alle tre prøvetakingstedene (A, B, C) var *Micrococcus luteus*.

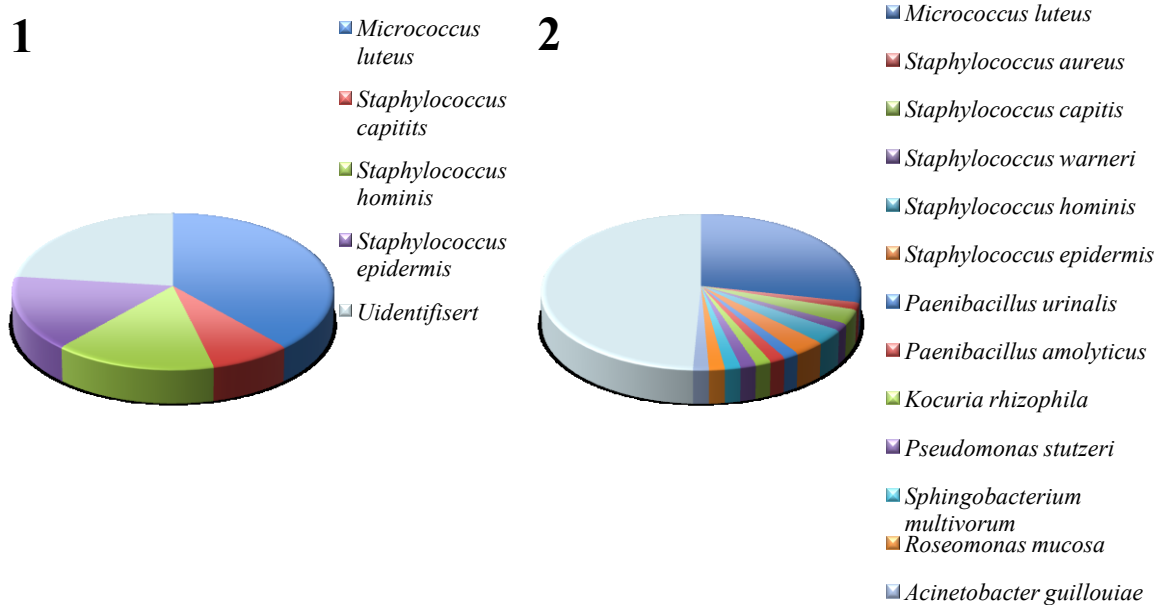
3.2.1.2.2 Diversitet med og uten cycloheximid

Sammenlikning av dyrkbar diversitet med og uten cycloheximid uavhengig av avdeling viste at diversiteten på genusnivå var mindre på skåler tilsatt cycloheximid enn på skåler uten tilsatt cycloheximid (figur 3.2.4).



Figur 3.2.4. Identifisering av bakteriekolonier på genusnivå på TSA-næringsmedium med og uten uten cycloheximid. På skåler tilsatt cycloheximid var diversiteten jevnt fordelt mellom *Staphylococcus* og *Micrococcus* på genus nivå, mens det på skåler uten tilsatt cycloheximid var *Micrococcus* som var dominerende genus. 1: Med cycloheximid. 2: Uten cycloheximid.

Sammenlikning av skåler med og uten cycloheximid viste at diversiteten på artsnivå var mindre på skåler tilsatt cycloheximid enn på skåler uten tilsatt cycloheximid (figur 3.2.5).



Figur 3.2.5. Identifisering av bakteriekolonier på artsnivå på TSA-næringsmedium med og uten cycloheximid. *Micrococcus luteus* var dominerende art på skåler både med og uten tilsatt cycloheximid. 1: Med cycloheximid 2: Uten cycloheximid.

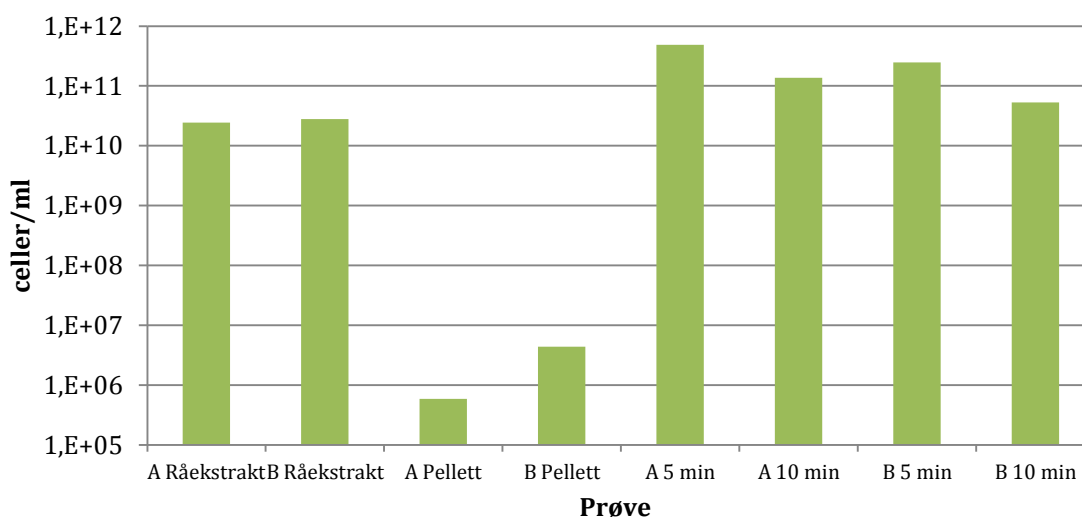
3.2.2 Dyrkningsuavhengige analyser

3.2.2.1 Total-DNA isolert fra luftprøver høstet på AHUS

Total-DNA ble isolert fra råkstrakt, pelletter og bakteriesuspensjon med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit.

qPCR viser at råkstraktene inneholder en høyere konsentrasjon enn pellettene. Råkstrakt A og B har forholdsvis lik konsentrasjon, men det observeres at pellett A har en konsentrasjon på ca. 1/7 av pellett B (figur 3.2.6).

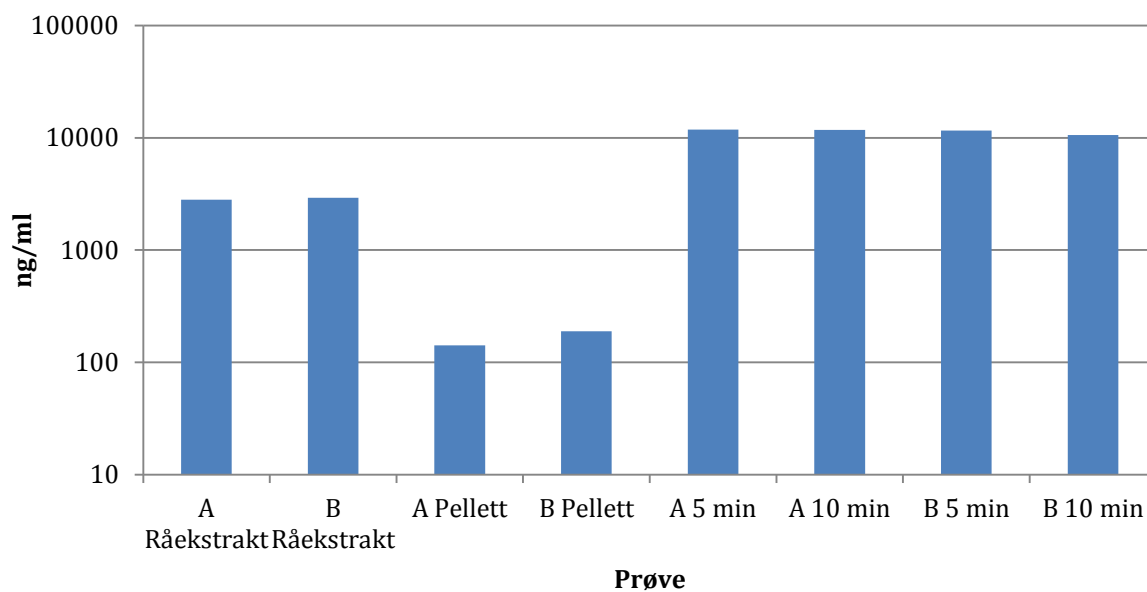
Konsentrasjonen er høyest i Prøve A 5 min. Det ser ikke ut til å være sammenheng mellom antall minutter lufthøstingen pågikk og konsentrasjon (figur 3.2.6).



Figur 3.2.6. Konsentrasjon (celler/ml) beregnet med qPCR. Total-DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit fra råkstrakt avdeling A og B, pellett avdeling A og B og bakteriesuspensjon fra 5 og 10 minutters luftprøve fra avdeling A og B. (A5min, A10min, B5min, B10min).

Total-DNA kvantifisert med Quant-iT PicoGreen viser at råkstraktene inneholder høyere konsentrasjon enn pellettene. Også her er konsentrasjonen i råkstrakt A og B forholdsvis like. Variasjonen mellom pellett A og B observert i qPCR er ikke like tydelig (figur 3.2.7).

Det ble observert at DNA-konsentrasjonen i bakteriesuspensjonene var mer jevne sammenliknet med observeasjoner i qPCR. Det ble ikke observert sammenheng mellom antall minutter lufthøstingen pågikk og konsentrasjonen isolert fra kolonier (figur 3.2.7).



Figur 3.2.7. DNA-konsentrasjon (ng/ml) kvantifisert med Quant-iT PicoGreen. Total-DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit fra råekstrakt avdeling A og B, pellett avdeling A og B og bakteriesuspensjon fra 5 og 10 minutters luftprøve fra avdeling A og B. (A5min, A10min, B5min, B10min).

MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit ga et total utbytte (ng) som var høyest for råekstraktene (tabell 3.2.1).

Tabell 3.2.1. Konsentrasjon (ng/ml) og totalt utbytte (ng) av total-DNA i 35 µl elueringsvolum fra MasterPure Gram Positive DNA IsolationKit

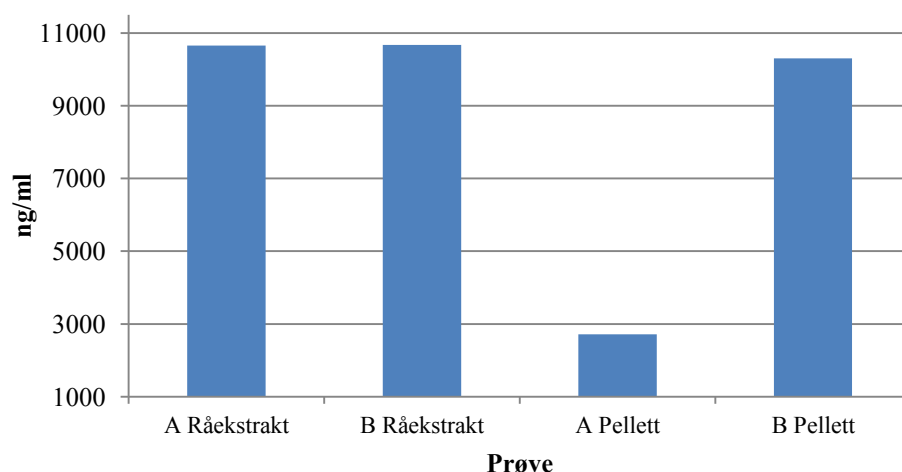
Prøve	ng/ml	ng
A Råekstrakt	2799,3	98
B Råekstrakt	2927,4	102
A Pellett	141,5	5
B Pellett	189,1	7

3.2.2.2 Helgenomamplifisert total-DNA

DNA-konsentrasjonen (avsnitt 3.2.2.1) var høy nok til å kunne utføre PCR-baserte analyser som DGGE og amplicon-basert pyrosekvensering, men det ble observert for lav DNA-konsentrasjon i rækstrakt og pelletter til å kunne utføre direkte pyrosekvensering.

5 μ l total-DNA fra rækstrakt A og B, samt pellett A og B, ble derfor helgenomamplifisert med illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit.

Konsentrasjonen var forholdsvis lik for begge rækstraktene og pellett B, mens pellett A hadde en konsentrasjon på ca. 1/4 av pellett B (figur 3.2.8).



Figur 3.2.8. DNA-konsentrasjon (ng/ml) kvantifisert med Quant-iT PicoGreen. Helgenomamplifisert DNA fra 5 μ l total-DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit, fra rækstrakt A og B, samt pellett A og B.

Totalt utbytte (ng) fra helgenomamplifiseringsreaksjonen var størst for råekstrakt A og B og lavest for pellett A (tabell 3.2.2).

Tabell 3.2.2. Konsentrasjon (ng/ml) og utbytte (ng) etter helgenomamplifisering av 5 µl isolert total-DNA i 20 µl elueringsvolum

Prøve	ng/ml	ng
A Råekstrakt	10657,8	213
B Råekstrakt	10673,9	213
A Pellett	2710,5	54
B Pellett	10301,3	206

Ved å se på forholdet mellom startkonsentrasjonen og sluttkonsentrasjonen i helgenomamplifiseringsreaksjonen, hadde råekstrakt A og B derimot minst utbytte av helgenomamplifisering (tabell 3.2.3).

Tabell 3.2.3. Utbytte av helgenomamplifisering oppgitt i faktor relativ til ng/µl inn i reaksjonen og ng/µl ut av reaksjonen

Prøve	Faktor
A Råekstrakt	3
B Råekstrakt	3
A Pellett	15
B Pellett	44

3.2.2.3 DGGE

Total-DNA isolert fra råekstrakt, pelletter og bakteriesuspensjon ble benyttet til DGGE for sammenlikning av bakteriell diversitet i luftmiljøet på AHUS. Også helgenomamplifisert DNA fra råekstrakter og pelletter ble inkludert. Gelelektroforese bekreftet amplifisering av 16S rRNA genet da det ble identifisert i det riktige området i gelen, på ca 500 basepar.

Alle prøver, untatt prøve nr. 3 og 4, ble fortennet 1:100 før PCR for DGGE (tabell 3.2.4). For positiv kontroll ble det laget kokepreparat av 100 µl bakteriesuspensjon fra avdeling A 5 min, som beskrevet i avsnitt 2.2.4.

Tabell 3.2.4. Prøver inkludert i DGGE-analyse for sammenlikning av bakteriell diversitet i luftmiljøet på AHUS

Nummer	Prøve
1	A råekstrakt U*
2	B råekstrakt U*
3	A bakteriepellett U*
4	B bakteriepellett U*
5	A råekstrakt H**
6	B råekstrakt H**
7	A bakteriepellett H**
8	B bakteriepellett H**
9	A 5 min U***
10	A 10 min U***
11	B 5 min U***
12	B 10 min U***
13	Positiv kontroll
14	Neg. kontroll (Reagenser MasterPure Gram Positive DNA Isolation kit)
15	Neg.kontroll (dH ₂ O)

*Luftprøver høstet med SASS 3100 filter-lufthøster. U= uhelgenomamplifisert

**Luftprøver høstet med SASS 3100 filter-lufthøster. H= helgenomamplifisert

***Luftprøver høstet med MAS 100 lufthøster. U= uhelgenomamplifisert

Gelen ble farget med SybrGold nukleinsyre farge, et fluorsecerende fargestoff som binder spesifikt til dobbeltrådet DNA. Brønnene i gelen vises øverst og man kan se at de inneholder DNA som ikke har vandret inn i gelen (figur 3.2.9). Deretter observeres det et opphold hvor det ikke er tilstedeværelse av bånd. Lenger nede dukker det opp et referansebånd som er tilstede i alle prøvene.

Den bakterielle diversiteten synes å være større i total-DNA isolert fra pelletter, både uhelgenomamplifisert og helgenomamplifisert, enn i råekstrakt og bakteriesuspensjon. Total-DNA isolert fra bakteriesuspensjon viser derimot en større bakteriell diversitet enn råekstraktene. Pellett A, både uhelgenomamplifisert og helgenomamplifisert, viser noe svakere bånd enn de andre prøvene.

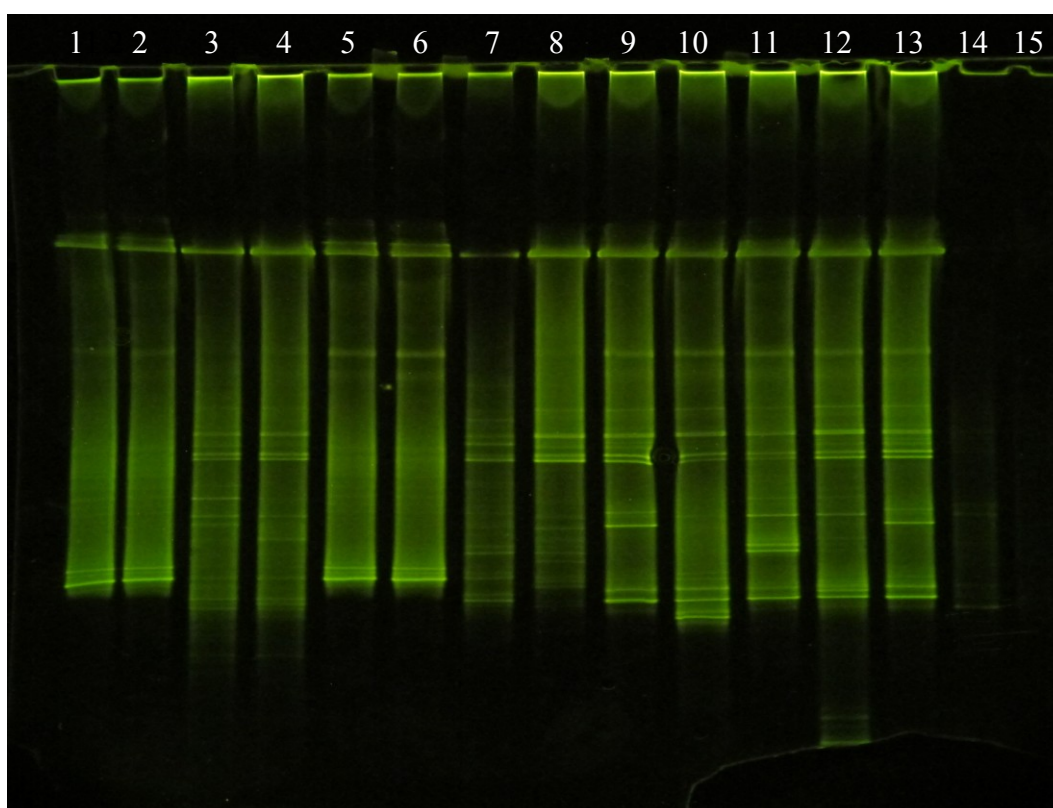
Helgenomamplifisering av råekstrakt og pelletter ser ut til å bevare den bakterielle diversiteten i prøvene. Enkelte bånd som var synlige i pellett A før helgeomamplifiseringen er

ikke like synlige i helgenomamplifisert pellett A. Andre bånd er derimot mer synlige i helgenomamplifisert DNA enn i uhelgenomamplifisert total-DNA fra pellett A.

Enkelte bånd i bakteriesuspensjon observeres både i avdeling A og avdeling B, og at de gjentas både i 5 og 10 minuttersprøven. Andre bånd lenger nede i gelen er tilstede i 10 minutters prøven og ikke i 5 minutters prøven.

Positiv kontroll viser tydelige bånd. Negativ kontroll som inneholder reagenser fra MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit viser svake bånd. Negativ kontroll inneholdende dH₂O er så vidt synlig i gelen.

Det er mangel på referansebånd i nedre del av gelen og det kan se ut som enkelte av båndene har blitt dratt ut.



Figur 3.2.9. DGGE. Separering av 16S PCR produkt fra råekstrakt, pelletter og bakteriesuspensjon.

4. Diskusjon

I denne oppgaven ble det fokusert på å finne en DNA-isoleringsmetode egnet for isolering av total-DNA fra luftprøver for å utføre metagenomanalyse i form av direkte pyrosekvensering. Testing av forskjellige DNA-isoleringsmetoder viste at MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit var mest egnet for isolering av total-DNA fra luftprøver, basert på kriterier som konsentrasjon/utbytte, renhet og fragmenteringsgrad. Variasjon observert mellom qPCR og Quant-iT PicoGreen vil skyldes at Quant-It PicoGreen binder alt dobbeltrådet DNA, mens qPCR med bruk av 16S primere vil gi en indikasjon på hvor mye bakterielt DNA prøvene inneholder.

Luftbårne bakterier ble karakterisert ved bruk av MALDI-TOF MS og bakteriell diversitet (dyrkningsbasert og dyrkningsuavhengig) ble studert ved bruk av DGGE.

4.1 Litteraturstudie

I innledende fase av oppgaven ble det utført en litteraturstudie for å undersøke om det tidligere var isolert total-DNA fra luft for bruk til direkte pyrosekvensering. Da det ikke ble funnet eksempler på at total-DNA fra luftprøver var brukt til direkte pyrosekvensering, ble litteraturstudien utvidet til å omhandle isolering av total-DNA fra andre matriser som jord, vann etc. for bruk til direkte pyrosekvensering. Det ble funnet eksempler på studier som hadde isolert total-DNA til direkte pyrosekvensering (vedlegg B), og på bakgrunn av litteraturstudien og erfaringer ved FFI, ble det valgt ut seks DNA-isoleringsmetoder som ble testet.

4.2 Sammenlikning av DNA-isoleringsmetoder

Testing av DNA-isoleringsmetoder med kjente bakteriestandarder med og uten tilsatt luftmatriks viste gjennomgående at MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit egnet seg best til å isolere total-DNA fra luftprøver.

Bakteriestandarder bestående av Gram positive og Gram negative vegetative celler og bakterielle endosporer ble brukt for å vurdere DNA-isoleringsmetodenes effekt på ulike celler. Med tanke på at ulike celler har forskjellige krav til DNA-isolering var det forventet å se sprik mellom bakteriestandardene i de forskjellige metodene. I en studie gjennomført ved FFI i 2011 ble det brukt MoBio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit for isolering av DNA, en metode som inkluderer cellelysering i form av bead-beating. Denne oppgaven viste at 2 minutters bead-beating var det optimale for lysing av bakterielle endosporer samtidig som nukleinsyrer fra vegetative celler forble mest mulig høymolekylært (Valen 2011). 2 minutters bead-beating ble brukt for den samme metoden i denne oppgaven, men dette ga en lavere DNA-konsentrasjon fra BG-sporer enn DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation kit.

Det er allikevel ikke mulig å konkludere med at kjemisk cellelysering er en bedre lysingsmetode for bakterielle endosporer enn mekanisk lysing, da resultatene kan skyldes at tap av DNA under isolering er mindre for MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit enn MoBio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit.

Det var kun MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit som ga en høyere konsentrasjon (celler/ml) og DNA-konsentrasjon (ng/ml) enn kokepreparatene. Årsaker til at de andre metodene ga en lavere konsentrasjon enn kokepreparatene kan være tap av DNA under isolering eller at luftmatriksen inneholdt inhibitorer som hemmet PCR-reaksjonen. Det ble imidlertid utført inhiberingstester som viste at luftmatriksen ikke hadde noen effekt på amplifisering av bakteriestandardene. Det samme er blitt observert i en studie for deteksjon av biologiske trusselstoffer i luftprøver (Fykse et al. 2008). Det er imidlertid også tidligere observert at luftmatriks kan hemme qPCR (Dybwad et al. 2012). Dette tyder på at miljøet luftprøven tas i kan være avgjørende for om man ser effekt av luftmatriks i qPCR.

4.3 Analyse av luftmiljøet på AHUS

4.3.1 Dyrkningsbaserte analyser

Da det var karakterisering av luftbårne bakterier i miljøet på AHUS som var interessant, ble det fokusert på å telle bakteriekolonier ved beregning av CFU/m³ og det ble forsøkt å plukke et representativt utvalg av bakteriekolonier for klassifisering med MALDI-TOF MS. Da det i mange tilfeller vil være vanskelig å skille sopp fra bakterier ved kun å studere kolonier på næringsmedium, kan det ikke utelukkes at en eller flere uidentifiserte isolater representerer sopp. MALDI-TOF MS identifiserte imidlertid ikke sopp i noen av isolatene som ble klassifisert.

Klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF viste at diversiteten på skåler tilsatt cycloheximid var mindre enn på skåler uten tilsatt cycloheximid (figur 3.2.4 og 3.2.5). Cycloheximid er et sopphekkende middel og skal i utgangspunktet ikke være hemmende for bakterier. Det er imidlertid vanskelig å trekke noen konklusjon ut av dette da sammenlikningsgrunnlaget er lite. 13 kolonier ble plukket fra skåler tilsatt cycloheximid og 57 kolonier ble plukket fra skåler uten cycloheximid. At det ble plukket et representativt utvalg kolonier vil imidlertid være en indikasjon på forskjell i diversitet som følge av cycloheximid. Både *Micrococcus* og *Staphylococcus*, som viste seg å være de dominerende genus i det studerte luftmiljøet på AHUS, er bakterier som finnes på huden hos mennesker og naturlig vil finnes på et område hvor det ferdes mange mennesker (Kloos & Musselwhite 1975).

Det kan være feilkilder knyttet til resultatene av MALDI-TOF MS da en eller flere kolonier som representerer en ny art lett kan bli oversett på skåler med mange kolonier. Flere av de uidentifiserte isolatene kan i tillegg representere nye bakteriearter og sopp, eller de kan være identiske med arter som allerede er identifisert slik at resultatene dermed presenterer et underestimat av art/genus på det aktuelle prøvetakingstedet. Underestimering av konsentrasjon og diversitet vil også kunne skyldes at dyrkningsbaserte metoder dyrker bakterier i et miljø som ikke nødvendigvis samsvarer med deres naturlige habitat (Marco 2010).

Konsentrasjonen av luftbårne bakterier varierte mellom avdelingene og prøvetakingstid, fra 82-491 CFU/m³. Det ble observert at avdeling A hadde høyere CFU/m³ enn avdeling B for

alle prøvetakingstidene (figur 3.2.1). Klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF viste imidlertid at diversiteten var større på avdeling B enn på avdeling A (figur 3.2.2 og 3.2.3). Dette kan være en indikasjon på at diversiteten på avdeling A består av en høyere konsentrasjon av noen få genus/arter, mens det på avdeling B er en lavere konsentrasjon bestående av flere arter. Andel uidentifiserte isolater er imidlertid litt høyere på avdeling A enn på avdeling B og kan bidra til å underestimere diversiteten på avdelingen. (Li & Hou 2003) beregnet luftbåren konsentrasjon av bakterier på et sykehus og fant at konsentrasjonen lå mellom 1-423 CFU/m³ avhengig av avdeling, noe som samsvarer med resultatene i denne oppgaven.

4.3.2 Dyrkningsuavhengige analyser

Molekylærbiologiske analyser av total-DNA isolert fra luftprøver høstet på AHUS viste at råkstraktene inneholdt mer DNA, både bakterielt og total-DNA, enn bakteriepellettene. Årsaken til dette kan være at bakteriecellene har sprukket og tørket inn på filteret under lufthøstingen eller at det er fritt DNA i luften på AHUS som ikke har blitt sentrifugert ned. På bakgrunn av forskjellene som ble observert mellom råkstrakt og pellett, ville det optimale for å få høyest mulig DNA-utbytte, være å isolere total-DNA fra råkstraktet. Dette lar seg imidlertid ikke gjennomføre på grunn av volumbegrensninger i DNA-isoleringsmetodene. Ved inhalasjon av bioaerosoler er det imidlertid viable og intakte celler som er interessant og grunnen til at råkstraktet ble sentrifugert ned til pellett.

Pellett A ble løst i 1 ml vann før isolering av total-DNA. Dette ble gjort som en av flere tester for å undersøke effekt av matriks på qPCR. Pellett A inneholder derfor 1/7 av den bakterielle konsentrasjonen til pellett B (figur 3.2.6). Det samme ble observert i konsentrasjonen av total-DNA kvantifisert med Quant-iT PicoGreen etter helgenomamplifisering (figur 3.2.8), men ikke i DNA-konsentrasjon av total-DNA isolert fra luftmatriks (figur 3.2.7). Målingene av total-DNA isolert fra luftmatriks for pellett A og B er imidlertid såpass lave at de ligger i nedre del av deteksjonsgrensen for standardkurven. Det vil dermed være usikkerhet knyttet til resultatene og man må kritisk vurdere nøyaktigheten av disse målingene.

Helgenomamplifisering ble utført for å undersøke om man kunne oppnå høy nok DNA-konsentrasjon til å utføre direkte pyrosekvensering. Utbyttet av reaksjonen var størst for pellett A og B. Tatt i betraktning at det ble tilsatt flere ng DNA inn i reaksjonen fra råkstrakt

A og B enn fra pellettene, er det oppsiktsvekkende at pellett B ender på ca. samme DNA-konsentrasjon som råkstrakt A og B etter helgenomamplifisering. En mulig årsak kan være at DNA'et i råktraktene var mer fragmentert enn i pellettene.

Pellett A hadde derimot meget lav DNA-konsentrasjon etter helgenomamplifisering sammenliknet med pellett B og råkstraktene. illumina GenomiPhi manualen for helgenomamplifisering tar utgangspunkt i at det skal tilsettes 1µl tilsvarende 10 ng DNA, noe som skal gi et teoretisk utbytte på 4-7 µg per reaksjon. I dette forsøket ble det tilsatt 5 µl isolert total-DNA for å innfri kravet om 10 ng DNA. Dette ble imidlertid kun innfridd for råkstraktene og ikke for pellett A og B. Antall ng inn i helgenomamplifisering var forholdsvis lik for begge pellettene, men det burde muligens ha blitt kompensert for den lave konsentrasjonen i pellett A ved å tilsette flere ng isolert total-DNA inn i helgenomamplifiseringen.

For råkstraktene, som var de mest konsentrerte prøvene, tilsvarte 5 µl isolert total-DNA 13,9 ng inn i helgenomamplifiseringsreaksjonen. Disse reaksjonene ga på det meste et totalt DNA-utbytte på 213 ng. Ettersom direkte pyrosekvensering krever 2-5 µg total-DNA, ble det ikke oppnådd høy nok DNA-konsentrasjon til å utføre slik analyse (Kilde: Norwegian Sequencing Centre)(Ghai et al. 2011). DNA-konsentrasjonen var derimot høy nok til å kunne utføre PCR baserte analyser som DGGE og amplikon-basert pyrosekvensering (Dowd et al. 2008; Nonnenmann et al. 2010; Yang et al. 2012).

Et volum på 5 µl total-DNA tilsatt til helgenomamplifiseringen fremfor 1 µl kan ha bidratt til et feil forhold mellom prøve og reaksjonsbuffer, eventuelt andre reagenser, da det ikke ble gjort noen andre kompensasjoner i forhold til at det ble tilsatt flere µl enn anbefalt i reaksjonen.

4.3.2.1 Denaturerende gradient gelelektroforese

Bakteriell diversitet i råkstrakt, pelletter og bakteriesuspensjon ble sammenliknet ved bruk av DGGE (figur 3.2.9). Det ble observert at helgenomamplifisering ikke påvirket diversiteten i prøvene. Enkelte bånd i helgenomamplifiserte prøver er sterkere enn bånd i prøver som er uhelgenomamplifiserte, men dette gjelder ikke alle og det kan dermed tyde på at enkelte bånd blir amplifisert i større grad enn andre.

Sammenlikning av bakteriell diversitet i råekstrakt, pelletter og bakteriesuspensjon antyder at diversiteten er større i pellettene enn i bakteriesuspensjon fra avdeling A og B. Dette er naturlig med tanke på at bakteriesuspensjonen representerer den dyrkbare diversiteten, mens råekstrakt og pelletter representerer dyrkningsuavhengig diversitet. Det ble imidlertid også observert at flere bånd var tilstede både i pelletter og bakteriesuspensjon og viser at en andel av bakteriene som detekteres av dyrkningsuavhengige metoder også lar seg dyrke i laboratoriet.

DGGE-analyse av bakteriesuspensjonen viste, i liket med klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF, at bånd som er tilstede i prøver uten cycloheximid er fraværende i prøver med cycloheximid.

Dyrkningsbaserte metoder viste at avdeling A hadde høyere CFU/m³ enn avdeling B i alle prøvetakingstidene (figur 3.2.1). Klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF viste imidlertid at dyrkbar diversitet var større på avdeling B enn på avdeling A og (figur 3.2.2 og 3.2.3). Det ble det spekulert i om diversiteten på avdeling A besto av en høyere konsentrasjon av noen få genus/arter, mens det på avdeling B var en lavere konsentrasjon bestående av flere arter. DGGE viser at bakteriell diversitet i bakteriesuspensjon fra 5 minutters prøvene fra avdeling A og B, stort sett ser ut til å inneholde de samme, og et likt antall bånd. Det samme ble observert ved sammenlikning av 10 minutters prøvene.

Råekstraktene viste mindre bakteriell diversitet enn pellettene i DGGE selv om DNA-konsentrasjonen i disse prøvene, målt med både qPCR og Quant-iT PicoGreen, var høyere enn i pellettene (figur 3.2.6; 3.2.7). Dette kan tyde på at diversiteten i råekstraktene er dominert av fritt DNA fra noen få bakteriearter. I tillegg utgjør råekstrakt kun 1/100 (ved 100 % sentrifugeringseffektivitet) av det totale råekstraktet, og 1/100 av pelletterbare og intakte celler sammenliknet med pelletene som er laget på bakgrunn av 10 ml råekstrakt. Dette kan være en årsak til at diversiteten synes å være mindre i råekstrakt enn pelletter. Enkelte bånd er tilstede både i råekstrakt og pelletter, noe som er naturlig da pellettene er sentrifugert ned fra råekstraktet.

Det ble observert at det lå DNA igjen i brønnene som ikke var kommet ut i gelen. Dette kan skyldes at konsentrasjonen av den denaturerende gradienten mulighens har vært for høy eller

det kan ha vært rester av høymolekylært DNA i brønnene. Fravær av referanseband i nedre del av gelen kan tyde på en dårlig denaturerende gradient. For å få bedre bånd i gelen kunne DGGE protokollen vært optimalisert med hensyn på tillaging av denaturerende gradient og mengde PCR produkt applisert på gelen. PCR programmet kunne vært optimalisert ytterligere når det kommer til annealing temperatur, antall sykluser og templatmengde.

4.3.4 Videre arbeid

For å oppnå en større mengde isolert total-DNA kan det i det videre arbeidet være hensiktsmessig å ta et større antall luftprøver med SASS 3100 filter-lufthøster enn det som ble tatt i denne oppgaven. Ved å ta flere luftprøver vil man få flere bakteriepelletter som kan løses i så lite volum som mulig, for eksempel 150 µl som er prøvevolumet MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit er optimalisert for. Dette vil gi en mer konsentrert luftprøve som igjen vil kunne gi en høyere DNA-konsentrasjon/utbytte.

Selv om det ikke ble isolert nok total-DNA til å utføre direkte pyrosekvensering i denne oppgaven, viste qPCR resultatene og DGGE-analysen at det isolerte DNA'et vil kunne benyttes til PCR baserte analysemetoder, slik som amplikon-basert pyrosekvensering.

Utbyttet av helgenomamplifiseringsreaksjonen i denne oppgaven samsvarte ikke med utbyttet forespeilet i protokollen. For å få høyere DNA-utbytte vil være mulig å utføre for eksempel syv helgenomamplifiseringsreaksjoner med 5 µl total-DNA i hver reaksjon (35 µl elueringsvolum i MasterPure Gram Positive DNA Isolation kit). I denne oppgaven ville det gitt et DNA-utbytte på 1,49 µg for ræktraktene og 1,44 µg for pellett B som var mest konsentrert, men dette ville heller ikke vært nok til å utføre direkte pyrosekvensering.

Ved å følge protokollen for helgenomamplifisering vil man også kunne utføre 35 reaksjoner med 1 µl DNA tilsatt i hver reaksjon for å få et høyere DNA-utbytte. Da unngår man eventuelle feilkilder som kan oppstå med tanke på forholdet mellom mengde DNA tilsatt og andre reagenser som inngår i illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit. Det bør imidlertid undersøkes hvilke volumbegrensninger direkte pyrosekvensering har, da syv og 35 reaksjoner vil gi et høyt volum. Ved volumbegrensninger kan oppkonsentrering av DNA utføres.

Dersom det lar seg gjøre å isolere høy nok konsentrasjon av total-DNA fra luftprøver på AHUS til å utføre direkte pyrosekvensering, ville det vært interessant å sammenlikne resultatet med den dyrkbare diversiteten i luftmiljøet på AHUS detektert med MALDI-TOF MS.

For kartlegging av luftbårne bakterier i miljøet kan det tas flere luftprøver med MAS 100 for sammenlikning av konsentrasjoner (CFU/m³), både med og uten cycloheximid, for å undersøke effekten på bakteriell diversitet som ble observert i denne oppgaven, og for videre karakterisering av bakterieisolater med MALDI-TOF MS.

5. Konklusjon

Av de seks DNA-isoleringsmetodene som ble testet, ble det i denne oppgaven funnet at MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit egner seg best for isolering av total-DNA fra luftprøver. Oppgaven demonstrerte videre at konsentrasjonen av total-DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit fra råkstrakter, pelletter og bakteriesuspensjoner, var høy nok til å utføre PCR baserte analysemetoder som DGGE og amplikon-basert pyrosekvensering. Konsentrasjonen av total-DNA var derimot ikke høy nok til å utføre direkte pyrosekvensering.

Klassifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF MS viste at *Micococcus* og *Staphylococcus* var de dominerende genus i luftmiljøet på AHUS.

Sammenlikning av dyrkbar og dyrkningsuavhengig diversitet i DGGE-analyse viste at pelletter hadde større bakteriell diversitet enn både bakteriesuspensjon og råkstrakter. At diversiteten var større i pelletter samsvarte ikke med resultater basert på qPCR og PicoGreen, men kan være en effekt av at råkstraktene utgjør 1/100 av det toale volumet, mens pelettene er sentrifugert ned fra 10 ml ekstrakt.

Referanser

- Abbai, N. S., Govender, A., Shaik, R. & Pillay, B. (2011). Pyrosequence Analysis of Unamplified and Whole Genome Amplified DNA from Hydrocarbon-Contaminated Groundwater. *Mol Biotechnol.*
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59 (1): 143-69.
- Armougom, F. & Raoult, D. (2009). Exploring Microbial Diversity Using 16S rRNA High-Throughput Methods. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 02 (01): 74-92.
- Bakken, L. & Frostegård, Å. (2006). *Nucleic Acid Extraction from Soil*. Soil Biology, b. 8. Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simon-Soro, A., Pignatelli, M. & Mira, A. (2012). The oral metagenome in health and disease. *ISME J*, 6 (1): 46-56.
- Bizzini, A. & Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (11): 1614-19.
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C. & Salas, M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 264 (15): 8935-40.
- Bowers, R. M., Sullivan, A. P., Costello, E. K., Collett, J. L., Jr., Knight, R. & Fierer, N. (2011). Sources of Bacteria in Outdoor Air across Cities in the Midwestern United States. *Appl Environ Microbiol*, 77 (18): 6350-6.
- Bruker Daltonics. (2011). *MALDI Biotyper 3.0 User Manual*.
- Cole, D. J., Hill, V. R., Humenik, F. J. & Sobsey, M. D. (1999). Health, safety, and environmental concerns of farm animal waste. *Occupational medicine (Philadelphia, Pa.)*, 14 (2): 423-48.
- Cox, C. S. & Wathes, C. M. (1995). *Bioaerosols handbook*. Inertial Samplers: Biological Perspectives: Lewis Publishers. 621 s.
- Douwes, J., Wouters, I., Dubbeld, H., van Zwieten, L., Steerenberg, P., Doekes, G. & Heederik, D. (2000). Upper Airway Inflammation Assessed by Nasal Lavage in Compost Workers: A Relation with Bio-Aerosol Exposure. *American Journal of Industrial Medicine*, 37 (5): 459-68.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N. & Heederik, D. (2003). Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47 (3): 187-200.

- Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R. & Edrington, T. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*, 8 (1): 125.
- Dybwad, M., Granum, P. E., Bruheim, P. & Blatny, J. M. (2012). Characterization of Airborne Bacteria at an Underground Subway Station. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (6): 1917-29.
- Epicentre. (2012). *MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit*. Tilgjengelig fra: <http://www.epibio.com/item.asp?id=429> (lest 20.03.2012).
- Forcier, F. (2002). Biosolids And Bioaerosols-The Current Situation. Report for the Quebec Ministry of Environment: SOLINOV Inc., consultants specializing in waste management. 2-22 s.
- Fykse, E. M., Langseth, B., Olsen, J. S., Skogan, G. & Blatny, J. M. (2008). Detection of bioterror agents in air samples using real-time PCR. *J Appl Microbiol*, 105 (2): 351-58.
- GE Healthcare. (2006). *illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit*. Tilgjengelig fra: http://cichlid.umd.edu/cichlidlabs/protocols/Basic/GPHI_V2_25660030_revB.pdf (lest 28.04.2012).
- Ghai, R., Martin-Cuadrado, A. B., Molto, A. G., Heredia, I. G., Cabrera, R., Martin, J., Verdu, M., Deschamps, P., Moreira, D., Lopez-Garcia, P., et al. (2010). Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing. *ISME J*, 4 (9): 1154-66.
- Ghai, R., Rodriguez-Valera, F., McMahon, K. D., Toyama, D., Rinke, R., Cristina Souza de Oliveira, T., Wagner Garcia, J., Pellon de Miranda, F. & Henrique-Silva, F. (2011). Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. *PLoS One*, 6 (8): 1-12.
- Gilbert, Y. & Duchaine, C. (2009). Bioaerosols in Industrial Environments: a Review. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 36 (12): 1873-86.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (4): 669-85.
- Hawkins, T. L., Detter, J. C. & Richardson, P. M. (2002). Whole genome amplification — applications and advances. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (1): 65-67.
- Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A. & Gottschalk, G. (1999). Construction of Environmental DNA Libraries in Escherichia coli and Screening for the Presence of Genes Conferring Utilization of 4-Hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol*, 65 (9): 3901-07.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiology Letters*, 221 (2): 299-304.
- Hortin, G. L. (2006). The MALDI-TOF Mass Spectrometric View of the Plasma Proteome and Peptidome. *Clinical Chemistry*, 7 (52): 1223-37.

- Invitrogen. (2005). *Invitrogen LifeTechnologies, Instruction Manual Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit*. Tilgjengelig fra: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/CS11301> (lest 20.03.2012).
- Invitrogen. (2008). *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits*. Tilgjengelig fra: <http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=Picogreen+protocol&resultPage=1&resultsPerPage=15> (lest 20.03.2012).
- Jernigan, J. A., Stephens D.S., Ashford D.A., Omenaca C., Topiel M.S., Galbraith M., Tapper M., Fisk T.L., Zaki S., Popovic T., Meyer R.F., Quinn C.P., Harper S.A., Fridkin S.K., Sejvar J.J., Shepard C.W., McConnell M., Guarner J., Shieh W.J., Malecki J.M., Gerberding J.L., Hughes J.M., Perkins B.A., and Anthrax Bioterrorism Investigation Team. (2001). Bioterrorism-related inhalational anthrax: The first 10 cases reported in the United States. *Emerg. Infect Dis.*, 7 (6): 933-44.
- Just, N., Kirychuk, S., Gilbert, Y., Létourneau, V., Veillette, M., Singh, B. & Duchaine, C. (2011). Bacterial diversity characterization of bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations. *Environmental Research*, 111 (4): 492-98.
- Kalogerakis, N., Paschali, D., Lekaditis, V., Pantidou, A., Eleftheriadis, K. & Lazaridis, M. (2005). Indoor air quality-bioaerosol measurements in domestic and office premises. *Journal of Aerosol Science*, 36 (5–6): 751-61.
- King, M. D. & McFarland, A. R. (2011). Bioaerosol Sampling with a Wetted Wall Cyclone: Cell Culturability and DNA Integrity of *Escherichia coli* Bacteria. *Aerosol Science and Technology*, 46 (1): 82-93.
- Kloos, W. E. & Musselwhite, M. S. (1975). Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *Applied Microbiology*, 30 (3): 381-95.
- Kuske, C. R. (2006). Current and emerging technologies for the study of bacteria in the outdoor air. *Current Opinion in Biotechnology*, 17 (3): 291-96.
- Li, C.-S. & Hou, P.-A. (2003). Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Science of The Total Environment*, 305 (1-3): 169-76.
- Liles, M. R., Williamson, L. L., Rodbumrer, J., Torsvik, V., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (2008). Recovery, purification, and cloning of high-molecular-weight DNA from soil microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 74 (10): 3302-5.
- Marco, D. (2010). *Metagenomics. Theory, Methods and Applications*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 212 s.
- Mardis, E. R. (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9: 387-402.

- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. & Ghiorse, W. C. (1999). Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol*, 65 (11): 4715-24.
- MoBioLaboratories-Inc. (2010). *MoBio Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit*. Tilgjengelig fra: <http://www.mobio.com/soil-dna-isolation/ultraclean-soil-dna-isolation-kit.html> (lest 20.03.2012).
- Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459 (7249): 931-39.
- Nonnenmann, M. W., Bextine, B., Dowd, S. E., Gilmore, K. & Levin, J. L. (2010). Culture-independent characterization of bacteria and fungi in a poultry bioaerosol using pyrosequencing: a new approach. *J Occup Environ Hyg*, 7 (12): 693-9.
- Novais, R. C. & Thorstenson, Y. R. (2011). The evolution of Pyrosequencing for microbiology: From genes to genomes. *J Microbiol Methods*, 86 (1): 1-7.
- Pasquarella, C., Pitzurra, O. & Savino, A. (2000). The index of microbial air contamination. *J Hosp Infect*, 46 (4): 241-56.
- Peccia, J. & Hernandez, M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric Environment*, 40: 3941-61.
- Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A. & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*, 55 (5): 856-66.
- Polymenakou, P. N., Mandalakis, M., Stephanou, E. G. & Tselepidis, A. (2008). Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an Intense African dust event in the eastern Mediterranean. *Environ Health Perspect*, 116 (3): 292-6.
- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol*, 66 (4): 3724-30.
- QIAGEN. (2010). *QIAamp DNA Stool Handbook*. Tilgjengelig fra: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnastoolminikit.aspx#Tabs=t2> (lest 20.03.2012).
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*, 11 (1): 3-11.
- Scheel, O. & Stormark, M. (1999). National prevalence survey on hospital infections in Norway. *Journal of Hospital Infection*, 41 (4): 331-335.
- Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol*, 6 (8): 229.1-229.4.

- Schluter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Krahn, I., Krause, L., Kromeke, H., Kruse, O., et al. (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol*, 136 (1-2): 77-90.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J. M. & Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49 (4): 543-51.
- Steensels, D., Verhaegen, J. & Lagrou, K. (2011). Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacteria and Yeasts in a Clinical Microbiological Laboratory: A Review. *Acta Clinica Belgica*, 66 (4): 267-73.
- Stetzenbach, L. D., Buttner, M. P. & Cruz, P. (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15 (3): 170-74.
- Streit, W. R. & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*, 7 (5): 492-8.
- Sun, L., Teramoto, K., Sato, H., Torimura, M., Tao, H. & Shintani, T. (2006). Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (24): 3789-98.
- Tringe, S. G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen, K., Chang, H. W., Podar, M., Short, J. M., Mathur, E. J., Detter, J. C., et al. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308 (5721): 554-7.
- Tringe, S. G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W. H., Yap, J., Yao, F., Suan, S. T., Ing, S. K., Haynes, M., et al. (2008). The Airborne Metagenome in an Indoor Urban Environment. *PLoS One*, 3 (4): e1862.
- Tzeneva, V. A., Heilig, H. G. H. J., Vliet, W. A. v., D.L.Akkermans, A., Vos, W. M. d. & Smidt, H. (2008). 16S rRNA Targeted DGGE Fingerprinting of Microbial Communities. I: b. 410 *Environmental Genomics, Methods in Molecular Biology*, s. 335-50.
- Urbano, R., Palenik, B., Gaston, C. J. & Prather, K. A. (2011). Detection and phylogenetic analysis of coastal bioaerosols using culture dependent and independent techniques. *Biogeosciences*, 8 (2): 301-9.
- Vaishampayan, P. A., Kuehl, J. V., Froula, J. L., Morgan, J. L., Ochman, H. & Francino, M. P. (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol Evol*, 2: 53-66.
- Valen, A. (2011). *Characterization of Airborne Microorganisms at Nationaltheatret Subway Station*. Mastergradsoppgave. Norwegian University of Science and Technology/Forsvarets Forskningsinstitut: Norwegian University of Science and Technology, Department of Biotechnology. 1-61 s.

- Xie, G., Chain, P. S. G., Lo, C. C., Liu, K. L., Gans, J., Merritt, J. & Qi, F. (2010). Community and gene composition of a human dental plaque microbiota obtained by metagenomic sequencing. *Molecular Oral Microbiology*, 25 (6): 391-405.
- Xu, Z., Wu, Y., Shen, F., Chen, Q., Tan, M. & Yao, M. (2011). Bioaerosol Science, Technology, and Engineering: Past, Present and Future. *Aerosol Science and Technology*, 45 (11): 1337-49.
- Yang, F., Zeng, X., Ning, K., Liu, K.-L., Lo, C.-C., Wang, W., Chen, J., Wang, D., Huang, R., Chang, X., et al. (2012). Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J*, 6 (1): 1-10.
- Zhou, J., Bruns, M. A. & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 62 (2): 316-22.

Vedleggsliste

Vedlegg A: Næringsmedier og reagenser brukt til lufthøsting

Vedlegg B: Litteraturstudie

Vedlegg C: NucliSens Magnetic Extraction Reagents

Vedlegg D: CTAB kombinasjonsprotokoll, CTAB ekstraksjonsbuffer og NTNU protokoll

Vedlegg E: DNA standardkurve kvantitativ sanntids PCR (qPCR)

Vedlegg F: DNA standardkurve Quant-iT PicoGreen

Vedlegg G: DGGE protokoll og reagenser

Vedlegg A: Næringsmedier og reagenser brukt til lufthøsting

Brain-Heart Infusion (BHI)

Vei ut 37 gram Brain-Heart Infusion pulver (Oxoid, CM1135) til 1 liter dH₂O. Vent til pulveret er løst (kan plasseres i vannbad) og autoklaver ved 121 °C i 15 min, i en lukket flaske.

Trypto-Casein Soya Agar (TSA)

Vei ut 40 gram Trypto-Casein Soya Agar (TSA) pulver (Bio-Rad, 64554) i en 1000 ml flaske og tilsett deionisert H₂O til 1000 ml. Vent til pulveret er løst (kan plasseres i varmebad). Autoklaver ved 121 °C i 15 min, i en lukket flaske.

R2A

Vei ut 18 gram R2A pulver (Oxoid, CM0906) i en 1000 ml flaske og tilsett deionisert H₂O til 1000 ml. Vent til pulveret er løst (kan plasseres i vannbad). Autoklaver ved 121 °C i 15 min, i en lukket flaske.

Sopphekkende middel (Cycloheximid):

Forbered 25 mg/ml stokkløsning av Cycloheximid ved å mikse 1000 mg Cycloheximid (Sigma-Aldrich, C7698) med absolutt EtOH (40 ml). Filter-steriliser (0,22 µm, Sartorius AG, 17823) og lagre i sentrifugerør (50 ml) ved 4 °C.

Merk røret med Cycloheximid (25 mg/ml), dato, initialer og giftig.

Vekstmedium med Cycloheximid (100 µg/ml)

Tilsett Cycloheximid stokkløsning (4 ml) til autoklavert og avkjølt (~55 °C) vekstmedium (1000 ml) for å få en konsentrasjon på 100 µg/ml. Hell over i sterile skåler i avtrekkskap.

Pakk i plastposer og merk med navn på næringsmedium, dato, initialer og lagre ved romtemperatur inntil videre bruk.

Phosphate Buffered Saline (PBS):

Løs en PBS tablett (Sigma-Aldrich, P4417) i 200 ml deionisert vann. Kontroller pH med pH-papir og overfør innholdet til en flaske merket med steril PBS, dato, initialer og autoklaver i 30 minutter ved 121 °C.

Lagre ved romtemperatur inntil videre bruk.

Ekstraksjons/vaskebuffer for SASS 3010 (PBS m/ 0,05 % Triton X-100):

Forbered 1000 ml PBS (Sigma-Aldrich, P4417) og tilsett 0,5 ml Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T9284). Filter-steriliser (0,22 µm, Corning, 431098) og lagre 50 ml allikvoter i sentrifugerør (50 ml) ved 4 °C.

Merk rørene med PBS (0,05 % Triton X-100), dato og initialer.

Vedlegg B: Litteraturstudie

Tabell F.1. Artikler som omhandler isolering av total-DNA fra luftprøver til bruk i PCR baserte analysemetoder som DGGE og amplikon-basert pyrosekvensering

Referanse	(Bowers et al. 2011)	(Nonnenmann et al. 2010)	(Tringe et al. 2008)
Lokalitet	Mayville (småby), Chicago, Cleveland & Detroit (storbyer)	Produksjonslokale fjørkre. Austin State University, Nacogdoches, Texas	2 shoppingssentre, Singapore
Lufthøster type	High-volume aerosol samplers ¹ .(Kvarts fiberfilter)	(IOM) ² inhalable samplers	AHU filtreringstrategi (air handling units)
DNA-isolering	PowerSoil DNA isolation Kit	QIAamp DNA Mini Kit	Pure Gene DNA [®] Purification Kit
Analysemetode	PCR/Pyrosekvensering	PCR/Pyrosekvensering	PCR/ 16S rDNA kloningsbibliotek

¹. Navn på lufthøster ikke nevnt

². Institute of Occupational Medicine inhalable samplers

Tabell F.2. Artikler som omhandler isolering av total-DNA fra luftprøver til bruk i PCR baserte analysemetoder som DGGE og amplikon-basert pyrosekvensering

Referanse	(Just et al. 2011)	(Urbano et al. 2011)	(Polymenakou et al. 2008)
Lokalitet	Fjørkre burhus og hønsesus	Scripps Institution of Oceanography, brygge	Heraklion, kystby øst i middelhavet
Lufthøster type	Constant air flow pump (Universal 224- PCXR4: SKC)	10-stage micro-orifice, uniform-deposit impactor (MOUDI)model 110	5-stage Sierra-Anderson high-volume cascade impactor
DNA-isolering	QIAamp DNA Mini Kit	fenol-kloroform ekstrahering, etanol utfelling.	UltraClean Soil DNA Kit
Analysemetode	PCR/DGGE	PCR/ TOPO TA kloningskit	PCR/ TOPO TA kloningskit/ RFLP

Tabell F.3. Artikler som omhandler isolering av total-DNA fra diverse matrikser

Referanse	(Belda-Ferre et al. 2012)	(Ghai et al. 2010)	(Abbai et al. 2011)	(Liles et al. 2008)
Matriks	Munnhulen	Vann	Vann	Jord
DNA-isolering	MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE, WI, USA)	Fenol/kloroform/isoamyl alkohol.	UltraClean Soil Kit	Kjemisk og enzymatisk cellelysis i agarose plugg.
Analysemetode	Direkte 454 pyrosequencing	Direkte 454 pyrosekvensering / 454 pyrosekvensering for fosmid bibliotek.	Roche GS FLX Titanium Pyrosequencing av uamplifisert DNA / GenomiPhi helgenomamplifisert DNA.	Fosmid / BAC bibliotek

Tabell F.4. Artikler som omhandler isolering av total-DNA fra diverse matrikser

Referanse:	(Ghai et al. 2011)	(Schluter et al. 2008)	(Vaishampayan et al. 2010)	(Xie et al. 2010)
Matriks	Vann	Biogassproduserende mikrobielt samfunn	Avføring	Tannplakk
DNA-isolering	Environmental Water Samples Kit (EPICENTRE, WI, USA)	CTAB	Agarose plug	Wizard Genomic DNA Purification Kit
Analysemetode	Direkte 454 pyrosekvensering	Roche Genome Sekvenserer FLX System.	Fosmid bibliotek/ Sanger dideoxy sekvensering	454 pyrosekvensering

Vedlegg C: NucliSens Magnetic Extraction Reagents (BioMerieux SA, Marcy-l'Etoile, France).

Materialer: NucliSens Magnetic Extraction Reagents Kit, pipetter, sterile pipettespisser, varmeblokk, vortekser, magnetstativ, sentrifuge, 1,5 ml eppendorfrør

Alle reagenser skal være romtemperert før bruk. Lysisbuffer og vaskebuffer 1 skal varmes ved 37°C i 30 minutter og deretter avkjøles dersom det er utfelt krystaller.

1. Prøven varmeinaktiveres på varmeblokk i 10 min ved 95 °C. (Kun DNA-isolering)
2. Tilsett 900 µl lysisbuffer. Vorteks.
3. Inkuber 10 min i romtemperatur.
4. Vortex Silica løsning og tilsett 50 µl til prøven, miks forsiktig og inkuber i 10 min uten miksing.
5. Sentrifuger i 2 min ved 1500 × g (4500 rpm). Fjern supernatant.
6. Vaskeprosedyre:
 - a) Tilsett 400 µl vaskebuffer 1. Bland med pipettespissen.
 - b) Sett røret på magnet. La stå i 30 sek.
 - c) Pipetter av supernatanten
 - d) Gjenta vaskeprosedyren en gang til
 - e) Vaskebuffer 2: 500 µl, gjør som trinn a-d.
 - f) Tilsett 500 µl vaskebuffer 3, bland med pipetten. La stå 15 sek på magnet, fjern supernatant.
7. Ta stativ av magnet og tilsett 100 µl elueringsbuffer. Knips på røret.
8. Inkuber i 5 min på 60°C i termoshaker (1400 rpm)
9. Sett rørene på magnet, overfør supernatanten til rent rør for oppbevaring. Merk med navn_dato_prøvenummer. Fryselagre ved -20°C.

Vedlegg D: CTAB kombinasjonsprotokoll, reagenser til CTAB ekstraksjonsbuffer og NTNU protokoll

CTAB kombinasjonsprotokoll

1. 1350 μ l DNA ekstraksjonsbuffer og 10 μ l Proteinase K (20 mg/ml) tilsettes. 1 μ l RNase (0,05 mg/ml) Ready-Lyze Lysozyme (250U/ μ l) tilsettes. Innkuberes ved 37°C i 1 time.
2. 135 μ l SDS (20 %) tilsettes.
3. Innkubering i vannbad ved 65 grader i 2 timer med forsiktig end-over-end invertering hvert 20 min.
4. Sentrifugering ved 6000 \times g i 15 min ved romtemperatur (RT).
5. Supernatanten overføres til 15 ml rør.
6. Pelletten ekstraheres en gang til med resuspending i 450 μ l DNA ekstraksjonsbuffer og 50 μ l SDS (20 %), etterfulgt av 10 sek vorteksing, innkubering ved 65 grader i 10 min og sentrifugering ved 6000 \times g i 15 min ved RT.
7. Supernatanten slås sammen med supernatanten fra punkt 8.
8. Den kombinerte løsningen fra punkt 10 ekstraheres to ganger med tilsvarende volum kloroform-isomylalkohol (24:1) i Phase-Lock Gel (Heavy) rør (15 ml) med sentrifugering ved 3000 \times g i 15 min ved RT.
9. Ekstraktet (vannfasen) fra andre gangs organisk ekstraksjon tilsettes isopropanol (0,6 volum), blandes godt med pipettering, innkuberes 1 time ved RT og sentrifugeres deretter ved 16000 \times g i 30 min ved RT.
10. Pelletten vaskes med 70 % etanol, sentrifugeres og tørkes.
11. Pelletten resuspenderes i 50 μ l TE buffer.

Kilder: (Henne et al. 1999; Zhou et al. 1996), NTNU protokoll.

CTAB ekstraksjonsbuffer (pH 8,0):

Stock	for 100 ml	
100 mM Tris-HCl	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 ml
100 mM EDTA	0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
100 mM sodium phosphate	0,5 M Na-phosphate buffer (pH 8,0)	20 ml
1% CTAB	pulver	1 g
1,5 M NaCl	NaCl salt/5 M NaCl	8,8 g/33,3ml
dH ₂ O	til	100 ml

Miks alt utenom NaCl og vent til CTAB er fullstendig løst. (Kan varmes i mikrobølgeovn for å fremskynde prosessen). Tilsett deretter NaCl til løsningen mens den røres forsiktig.

CTAB ekstraksjonsbuffer:

1 M Tris HCL pH8:

Molekylvekt: 157,6 g/mol (1M)

Til 100 ml: $157,6 / 10 = 15,76$ g/mol

Tilsett 80 ml H₂O, juster pH og tilfør H₂O til et totalvolum på 100 ml.

0,5 M EDTA pH8:

Molekylvekt: 374,3 g / mol (1M)

0,5 M: $374,3 / 2 = 187,15$ g/mol

Til 100 ml: $187,15 / 10 = 18,715$ g/mol

Tilsett 80 ml H₂O, juster pH og tilfør H₂O til et totalvolum på 100 ml.

0,5 M Na-fosfatbuffer:

Molekylvekt: 380,12 g/mol (1M)

0,5 M: $380,12 / 2 = 190,06$ g/mol

Til 100 ml: $190,06 / 10 = 19,006$ g/mol

Tilsett 80 ml H₂O, juster pH og tilfør H₂O til et totalvolum på 100 ml.

5 M NaCl:

Molekylvekt: 58,44 g/mol (1M)

5 M: $58,44 \text{ g/mol} \times 5 = 292,2$ g/mol

Til 100 ml: $292,2 \text{ g/mol} / 10 = 29,22$ g/mol

NTNU protokoll:

1) Isolering av DNA fra jord i oljebrønnprøver samlet ved sentrifugering

1. 2 gram jord ble mikset med 5 ml ekstraksjonsbuffer (EB) I sterile 50 ml rør.
2. Rørene ble ristet i risteinkubator (150 rpm, 15 min, 37 °C)
3. 20 µl proteinase K (20 mg/ml) ble tilsatt og prøven ristet i nye 30 min (150 rpm, 37 °C).
4. 0,5 ml SDS (20 %) ble tilsatt og løst forsiktig ved å virvle røret ca 5 ganger.
5. Prøven ble inkubert ved 65 °C I 2 timer (bland forsiktig ved å virvle rundt 5 ganger hvert 15.min, med unntak av de siste 15 min)
6. Dekanter supernatanten i 50 ml sentrifugerør og lagre ved romtemperatur.
7. Tilsett 5 ml EB and 0,5 ml SDS til jorden, virvle kraftig (ca 20 ganger) og innkuber I 10 min.
8. Overfør supernatanten til supernatanten i trinn 6.
9. Repeter trinn 7 og 8. (kast jorden etterpå)
10. Overfør supernatanten til Phase-Lock gel (heavy) rør og tilsett et likt volum med kloroform/Isoamylalkohol (24:1, v:v). Sentrifuger (3000 g, 10 min, RT).
11. Repeter trinn 10.
12. Fell ut DNA fra vannfasen ved bruk av isopropanol presipitering (tilsett 0,6 volum med isopropanol, bland godt og innkuber i 1 time ved RT.) Sentrifuger (8000 g, 40 min, RT), vask pelleten i kald 70 % EtOH, tørk pelletten.
13. Resuspender DNA pelletten i 50-200 µl TE buffer.

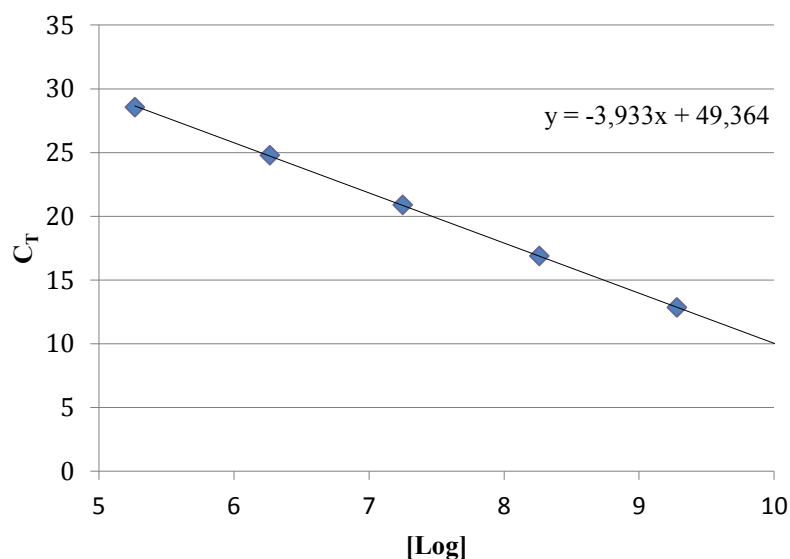
CTAB ekstraksjonsbuffer (pH 8,0):

Stock	for 100 ml	
100 mM Tris-HCl	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 ml
100 mM EDTA	0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
100 mM sodium phosphate	0,5 M Na-phosphate buffer (pH 8,0)	20 ml
1% CTAB	pulver	1 g
1,5 M NaCl	NaCl salt/5 M NaCl	8,8 g/33,3ml
dH ₂ O		til 100 ml

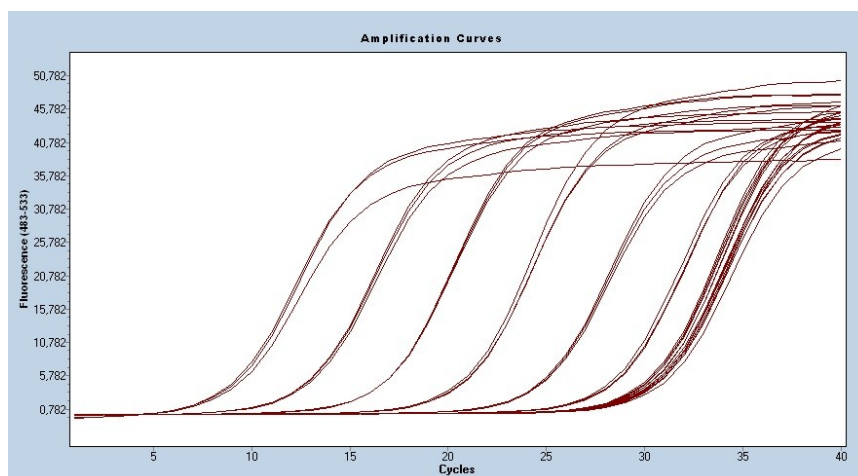
Miks alt utenom NaCl og vent til CTAB er fullstendig lost. (Kan varmes i mikrobølgeovn for å fremskynde prosessen). Tilsett deretter NaCl til løsningen mens den røres forsiktig.

Vedlegg E: DNA standardkurve kvantitativ sanntids PCR (qPCR)

Standardkurve basert på fortynningserie av *E. coli* ble laget i Light Cycler for beregning av konsentrasjon i celler/ml i prøver med DNA isolert med MasterPure Gram Positive DNA Isolation Kit. Feilledd for kurven=0,00441 og effektiviteten=1,789. (light Cycler Dataprogram). Laveste konsentrasjon målt i standardkurven var $1,8 \times 10^5$. Høyeste konsentrasjon målt var $1,8 \times 10^{10}$.



Figur D.1: standardkurve i qPCR med fortynningserie av *E. coli*

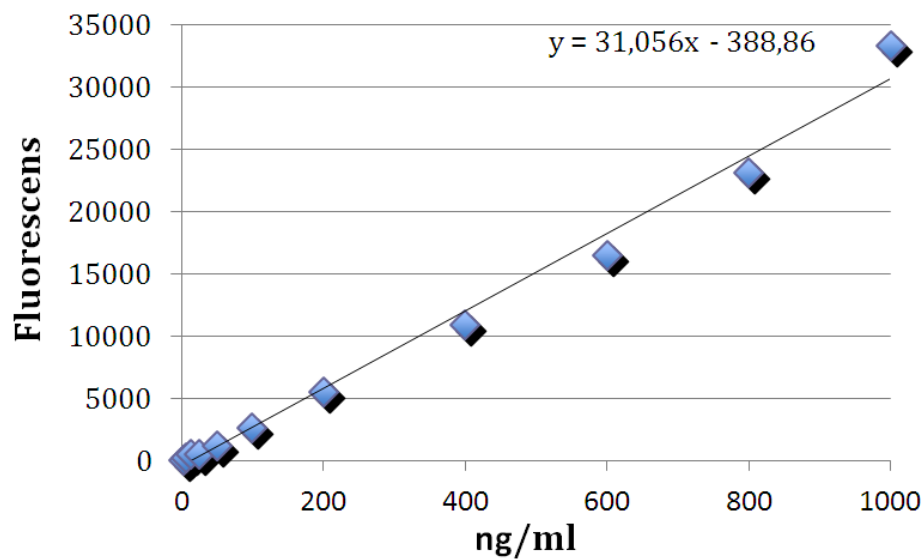


Figur D.2: Resultat amplifiseringskurver av fortynninger av *E. coli* for tillaging av standardkurve.

CFU/ml ble beregnet til $1,25 \times 10^8$.

Vedlegg F: Standardkurve Quant-iT PicoGreen

For beregning av DNA-konsentrasjon (ng/ml) i prøvene ble det laget standardkurve i Fluostar Optima, BMG av fortyningsserie av Lambda DNA. Høyeste konsentrasjon målt i standardkurven var 1000 ng/ml.



Figur D.3: Quant-iT PicoGreen Standardkurve fortyningsserie av Lambda DNA. Fluorescens vs $\mu\text{g/ml}$.

Vedlegg G: DGGE protokoll

DGGE ble utført i et Hoefer Scientific SE600 vertikal DGGE system med polyacrylamide gel (8 %) med en denaturerende gradient (urea/formamid).

1. Glassplatene ble vasket med Deconex, varmt vann og dH₂O til slutt.
2. Sidene som vendte inn mot gelen ble vasket med EtOH (96 %) og Repel-Silane I et avtrekkskap og lufttørket.
3. Geloppsettet ble skrudd sammen ved å sette de to glassplatene mot hverandre, separert med to 1mm stykker og skrudd fast. Vakkumfett ble tilsatt på i skjøtene mellom glassplatene og midtstykkene for å unngå lekkasje langs sidene. Det er viktig at glassplatene og midtstykkene er perfekt sammenstilt.
4. Geloppsettet ble deretter plassert i holderen og det ble tilsatt smeltet agarose (1 %) for å unngå lekkasje i bunn.
5. Det ble fylt på vann mellom glassplatene for å sjekke for lekkasje. Dersom det oppdages lekkasje må gelformen skrues sammen på nytt.
6. Gel løsningsene (A og B) ble mikset (Lav: A=23,2 ml + B=5,8 ml. Høy: A=11,6 ml + B=17,4 ml) for å forberede løsninger med henholdsvis 20 % og 60 % denaturant konsentrasjon. Luft ble fjernet ved bruk av vann-sug.
7. Ammonium persulfat (APS) (10 %) (290 µl) og N'N'N'N-tetrametylendiamin (TEMED) (14,6 µl) ble tilsatt til hver løsning for å starte polymerisering.
8. Lav og høy denaturant løsninger ble overført til gradientmikser med brønnen lukket (posisjonert opp) og magnetisk rister ble startet.
9. Det ble åpnet ca 1 cm for løsning Høy over i gelkammeret for dannelse av høy denaturant nederst i gelen. Åpningene i gradientmikseren ble justert til for en fyllingstid på ca 4 minutter for dannelse av en delvis denaturerende gradient.
10. Etter at all løsningen var overført til gelkammeret ble brønnformen satt forsiktig på plass. For polymerisering fikk gelen stå i 30-60 minutter.
11. Gradientmikseren og slangen ble vasket med dH₂O og EtOH for å unngå at det skulle tette seg. Det vannbaserte hete/kjølesystemet på bufferkammeret ble skrudd på 65 °C.
12. Brønnformen ble forsiktig fjernet når gelen hadde stivnet og brønnene ble vasket med 0,5×TAE buffer og rester av gel og denaturant ble fjernet med en pipette med hypoderm spiss.
13. Prøver ble deretter applisert på gel med pipette.

14. Vakuumfett ble tilsatt på toppen av gelkammeret og langs siden for å sikre at det ble tett.
15. Toppkammeret ble deretter satt på toppen av gelformen og festet godt.
16. 0,5×TAE buffer ble deretter helt oppi toppen av kammeret og det ble sjekket for lekkasjer.
17. Gelformen og toppkammeret ble deretter overført til det nedre bufferkammeret som ble fylt med 0,5×TAE buffer, og magnetrørerern ble slått på.
18. Gelen ble kjørt i 10 minutter ved 40 Volt og deretter i 17 timer ved 85 Volt.
19. Gelen ble deretter forsiktig fjernet fra formen ved å forsiktig splitte de to glassplatene og la gelen bli liggende på den ene.
20. Farging av gelen ble utført ved å dekke den med 50 ml 5×SYBR Gold i 1×TAE buffer (1 ml 50×TAE + 49 ml dH₂O + 5µl SYBR Gold (10000X) i 30 minutter, i mørket.
21. Gelen ble deretter vasket med dH₂O og fotografert på et UV-bord med bruk av Canon G12 kamera.
22. Alle deler til gelen og kammeret ble vasket med vann og deconex og lufttørket.

Reagenser til DGGE:

EDTA (0,5 M, pH 8.0)

186,1 g disodium EDTA

800 ml dH₂O

~20 g NaOH

Juster til pH 8 med NaOH og autoklaver

50×TAE buffer

242 g Tris-base

51,1 ml glacial acetic acid

100 ml EDTA

dH₂O

Løs Tris i glacial acetic acid og EDTA. Tilsett litt vann og varm forsiktig på en magnetisk rører. Tilpass volumet til 1 l med dH₂O og autoklaver.

De-ionisert formamid

200 ml formamid

7,5 g Dowex Resin 501X8 (20-50 mesh)

Miks i avtrekkskap og rør rolig på en magnetisk rører i 60 min. Lagres i en mørk flaske i kjøleskap.

DGGE A (0 % dednaturant)

50 ml Acrylamid (40 %)

2,5 ml 50×TAE buffer

dH₂O

Miks og juster til 250 ml med dH₂O. Lagres i mørk flaske i kjøleskap. Maks 1-2 mnd.

DGGE B (100 %)

50 ml Acrylamid (40 %)

2,5 ml 50×TAE buffer

105 g Urea

100 ml deionisert formamid

dH₂O

Miks på en magnetisk rører ved svak varme. Juster til 250 ml med dH₂O etter at alt er løst.
Filtrer med vannsug (0,45µm porestørrelse) Nuclepore filter. Lagres i mørk flaske i kjøleskap.
Maks 1-2 mnd.

Ammonium persulfat (APS 10 %)

1g APS

10 ml dH₂O

Løs og allikvoter i 340 µl. Lagres ved -20°C.