



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021

Fakultet for Veterinær- og biovitenskap

Sammenlikning av metoder for DNA ekstraksjon fra bakterier dyrket og eksponert for ulike fysiologiske og naturlige betingelser.

Comparison of methods for DNA extraction cultivated and exposed for various physiological and natural conditions.

Kamil Fedorczyk

Kjemi

Forord

Det finnes på jorden massevis bakterier, de fleste er fremdeles ukjente. Det er interessant å tenke at det er mange områder som ikke er oppdaget. Det vekker spenning hos forskere og antenner dem til å jobbe mer og mer. Også når det gjelder selve bakterielliv og deres oppførsel i naturen finnes det sikkert en del hemmeligheter som ikke ble beskrevet ennå. Noen teorier er ganske populære og andre ikke i det hele tatt sikkert på grunn av at bevisene er ikke tilstrekkelige, men som forskere skal man holde hodet sitt åpen fordi naturen er umulig til å beskrive, fullstendig, og det blir alltid noe igjen heldigvis til å finne ut.

Dette forsøke begynte med å lære ulike metoder og på grunn av mangel av erfaring var det en utfordring. Det kom mange ting som ikke gikk bra dvs. resultater var ikke som det kunne forventes, etter hvert metoder begynte å fungere som de skulle i hvert fall kjemisk DNA ekstraksjon metoder. Det som ble mest feil var å hoppe fra en metode til en annen, på den måten ingenting fungerte bra. Heller burde det kjøres en metode mange ganger inntil ting blir bra. Det viste seg at bare gjentakelser gjorde at alt ble mer klart til slutt, mens i begynnelsen i dette forsøket ble det utført en rekke ulike metoder parallelt og ingen av dem funka veldig godt. Det kan gjentas sikkert et kjent ordtak etter romerne «Repetitio est mater studiorum.»

Den oppgaven hadde ikke vært uten støtte fra Previwo og Bellevacc som fordelte mellom seg alle utgiftene. Tusen hjertelig takk til Henning Sørum og Kira Salonijs som valgte å støtte dette prosjektet. Uten deres materielle hjelp hadde det ikke vært mulig å jobbe med disse ulike problemer.

Tusen takk til hovedveileder Simen Foyn Nørstebø, hans hjelp underveis hadde en stor betydning, uten ham og hans utholdenhet dette prosjektet hadde vært umulig. Hans rolle i dette forsøket var så betydelig fordi han forsøkte å heve ting opp til neste trinn. Han alltid oppfordret og inspirerte jobben på en bra måte og passet på alle viktige detaljene.

Tusen takk til Henning Sørum som var den andre veilederen for dette forsøket. Hans gode innstilling, stor erfaring og positiv tenkemåte trekket dette prosjektet fremover. Han også inspirerte med mange gode ideer og kritiske tanker og hjalp mye med å rette ting som gikk galt med stor hengivenhet.

Tusen takk til Yngve Stenstrøm som var en kjemi veileder som rettet teksten fra denne viktige vinkelen, det var veldig viktig fordi det er en masteroppgave i kjemi og det burde være et større fokus på kjemien her.

Mange takk til Aud Kari Fauske og Tatiana Ponton Tomaselli de ofte ofret sin tid og hjalp med mange viktige praktiske ting, Deres store erfaring og profesjonalitet er et godt eksempel for andre.

En stor takk til Mari Røken og Solveig Birkedal Wiig, Ingvild Berg Nyman, Mamata Khatri og Gabriella Paz Carril Leiva som også var meget vennlige og hjalp når det trengs. Tusen takk til min kone og mine foreldre som alltid støttet meg på veien.

Sammendrag

DNA-isolasjon er i dag et viktig verktøy i laboratoriet fordi DNA er nødvendig for å få sentrale teknikker som for eksempel PCR eller sekvensering av DNA. Disse teknikkene er svært vanlige i mikrobiologi og i laboratoriearbeid med bakterier, men resultater av DNA ekstraksjon fra bakterier er ikke alltid slik som forskere ønsker de kunne være fordi mange typer av bakterier har ganske tykke cellevegger og er vanskelige å lysere. Bakterier som er tatt fra miljøprøver kan også skape problemer ved DNA-ekstraksjon.

Hovedformål i dette prosjektet var å sammenlikne DNA-utbyttet etter å ha gjennomført ulike isolasjonsmetoder med bakterier dyrket med forskjellige betingelser. Det ble antatt at DNA-mengde som kan isoleres fra bakterier eksponert for en rekke fysiologiske løsninger vil variere avhengig av hvilken løsning de ble utsatt for. Hvis den antagelsen er sann kan årsaken til dette være enten at mengden av DNA etter ekstraksjonsprotokollene være et uttrykk for forandringer av den bakterielle cellevegg forårsaket av bakteriene selv eller det kan være en effekt av miljøpåvirkninger hvor bakteriene er passive. Problemet i denne studien er allikevel ikke hvorfor, men om i det hele tatt mengde av DNA som ekstraheres forandrer seg med hensyn til ulike betingelser bakteriene er utsatt for.

Bakterier eksponert for ulike betingelser kan forandre utseende, kan se mindre ut, være større, kan lage biofilm eller ikke, kan også ha ulike farger mer tydelige eller utydelige farger.

Ett viktig trinn i denne studien var å lære å etablere effektive DNA-teknikker som kan brukes til å isolere DNA fra bakterier som for eksempel tilhører slekten *Mycobacterium* eller fra andre bakterier som hadde tykke cellevegger som det er vanskelig å lysere. Etter å ha etablert og tilpasset de nødvendige teknikkene kunne de bli brukt til å ekstrahere DNA fra en bakterieart som er eksponert for ulike betingelser som kanskje ville gjøre DNA-ekstraksjon vanskeligere enn det som er vanlig. I fremtiden kan de teknikker som er brukt her utnyttes til å isolere DNA fra bakterier i ulike miljø og vev.

Ulike DNA-ekstraksjonsmetoder ble benyttet, men spesielt en type metoder med kjemisk ekstraksjon med kloroform og fenol. DNA ble ekstrahert fra bakterier som *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli* og noen andre.

I den andre delen av studien ble det laget ulike løsninger og bakterieceller fra arten *Aliivibrio wodanis* ble eksponert for dem og etterpå konserverte i etanol. Disse konserverte bakteriecellene ble så benyttet til å isolere bakterie-DNA vha. noen utvalgte metoder etablert i den første delen av oppgaven.

Detektert DNA-renhet var fluktuerende fra en metode til en annen avhengig også av hvilken bakterie-type DNA ble isolert fra. Etter en tid ble resultatene stadig mer stabile og med høyere utbytte etter hvert i forhold til de første utførte forsøkene.

Utseendet til *Aliivibrio wodanis* utsatt for ulike løsninger som ble undersøkt ved hjelp av mikroskop så ut til å være varierende fra en løsning til den andre. Resultater etter isolasjon av DNA fra bakterier utsatt for ulike betingelser var vanskelig å diskutere, likevel syntes det å være lett å observere forskjell i DNA mengden mellom en del bakterier dyrket på ulike måter. Noen av betingelsene gav lavt DNA-utbytte og noen andre gav relativt høyt utbytte. Bakterier fra løsning A utsatt for 0,9% fysiologisk vann og etterpå inkubert i 0,9 LB mediet gav relativt høyt utbytte uansett hvilken metode DNA var ekstrahert med (Marmur , modifisert van Helden og van Helden). DNA-isolasjon fra *A. wodanis* dyrket i løsning B (utsatt for 0,9% NaCl vann og inkubert i Leibowitz medium) ga relativt høyt utbytte bare etter Marmur-DNA-ekstraksjonsmetoden. Bakteriene som var i D løsning utsatt for serum fra hesteblood og etter det inkubert i BHI medium med glukose gav relativt lavt DNA-utbytte etter Marmur-DNA-ekstraksjonsmetoden. Bakterier fra løsningene D og H (serum fra hesteblood) hadde aldri relativt høyt DNA utbytte. Mengde DNA fra bakterier eksponert for andre løsninger varierte mye. Prøver av C (med bakterier eksponert for Leibowitz medium og etterpå inkubert i gelatin med glukose) viste forskjeller i mengde ekstrahert DNA etter Marmur-metoden kjørt i tre paralleller, mens utbytte av DNA etter den modifiserte van Helden- og van Helden-metoden var relativt høyt.

Stort standardavvik blant flere prøver gjorde det vanskelig å si noe definitivt om deres rangering i grupper. Til tross for det var den fluktuerende mengden av DNA til en viss grad i overbestemmelse med løsningene bakteriene var utsatt for, spesielt i noen prøver. Til og med hvis en av løsningene var kontaminert burde ikke slike store ulikheter i DNA-mengde fra ulike grupper forekomme.

Abstract

Isolation of DNA is an important tool nowadays critical in such techniques as for example PCR and sequencing of DNA. These techniques are very common in microbiology and in work with bacteria but results of DNA extraction from microorganisms are not always as scientist wish they should be because some bacteria types have different thick cell walls, bacteria from environmental samples may also cause problems.

The main concern of this project was to compare yield of different DNA extraction methods performed on bacteria cultivated with different conditions. It was assumed that extracted amount of DNA from bacteria exposed to different chemical and biological solutions will vary according to these conditions. If such assumption was true, the reason of this could be different: the amount of DNA extracted express changes in bacteria induced by bacteria itself or can be only the effect of environmental influence. In the first case bacteria would be active subject responding differently to different conditions. In the second case the bacteria would be only passive object of environmental circumstances. The problem of this project is not why the differences can occur. The question here is: Are there any differences in DNA extraction at all between samples with different solutions.

Bacteria exposed to different solutions can change appearance seen with the help of microscope, they can look bigger or smaller, can make biofilm or not at all, can have different colors of the cell, vivid or blurred and they can have halo around.

The important step in the beginning of this project was to learn effective DNA extracting methods from such bacteria as in the *Mycobacteria* genus because it is not easy to extract DNA from these types of bacteria having quite wide expanded cell wall, and after learning it the next step was as mentioned before, to use this kind of methods to isolate DNA from other bacteria which are exposed to different and sometimes stressful environments. In the future the methods tested here can also be used to isolate DNA from environmental samples such as different tissues.

Different DNA extracting methods have been used but especially the focus was on chemical extraction methods that is using chloroform or phenol DNA to extract DNA. DNA was extracted from such bacteria as *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli* and some others.

In the second part of this project there were made different solutions and bacteria from species *Aliivibrio wodanis* was exposed to them and was conserved in ethanol in the end. So, then selected methods were applied to isolate DNA from *A. wodanis* samples.

The purity of DNA was fluctuating from one method to another and also dependent on the type of bacteria the nucleic acid were isolated from. After some time, the results from repeating DNA extractions became more stable and with higher DNA yield compared to the very early extractions.

The cell form of *A. wodanis* seen in the microscope exposed to different solutions seemed to vary from each another. Results of extraction from bacteria exposed in different ways were difficult to discuss, although the difference between some of solutions in extracted DNA amount were clear, some of them were low and some others relatively high. Bacteria from the A solution (exposed to 0.9% NaCl water and then incubated in 0.9 % LB) gave relatively high DNA yield after all methods used (Marmur, modified van Helden, and van Helden method). DNA extracted from bacteria in B solution (confronted with 0.9% salt water and incubated in Leibowitz medium) shows the relatively largest amount of DNA after only the Marmur DNA isolation method. Bacteria from the D sample exposed to horse blood serum and incubated in BHI medium with glucose yielded relatively low DNA amount after the Marmur methods. Amount of DNA from bacteria exposed to other solutions was fluctuating without a clear pattern. D and H (bacteria confronted with serum from horse blood) were never relatively high. Samples C (incubated in Leibowitz medium and then incubated in gelatin with glucose) showed large fluctuation even after three parallel Marmur extraction methods, but both modified van Helden and van Helden gave relatively high DNA amount from C. Large standard deviation of many samples made it difficult to draw a clear conclusion. Despite this there was a fluctuating amount of DNA depending on solution the bacteria were exposed to especially in some samples. Even if one of solutions was contaminated such large differences should not occur among other sample groups.

Innholdsfortegnelse

Innledning.....	8
Bakteriearter som ble brukt i denne studien	12
<i>Utvalgte bakterier fra orden Mycobacteriales</i>	13
Staphylococcus psedintermedius som eksempel på grampositive bakterier	15
<i>Aliivibrio Wodanis</i>	15
Andre bakterier som ble brukt	15
Bakgrunn for DNA-ekstraksjonsmetoder benyttet i oppgaven.....	16
Isolasjon av DNA grunnleggende prinsipper, med spesielt vekt på kjemisk ekstraksjon.....	16
DNA kontaminanter.....	16
Marmur 1961 DNA isolasjons metode som grunnleggende metode for kjemisk DNA isolasjon..	17
Andre metoder som er tatt i bruk i oppgaven	17
Et utvalg av ulike komponenter til DNA isolasjons metoder.....	18
EDTA og Tris buffere.....	18
Reagenser for lysering.....	19
Reagenser brukt til purifisering/rensing av DNA.....	20
Nanodrop DNA målinger	22
Praktisk innledning til Qubit Broad Range kit, neon bemerkninger til bruk av fluorometer.	25
Metoder.....	26
Del en: forskning av ulike DNA isolering metoder	26
En generell innledning til metodeforskning	26
Qiagen DNA isolering fra bakterie metode som eksempel på en kit basert metode	29
Kjemisk ekstraksjons metoder	29
Siste del av DNA isolasjon etter alkohol utfelling.....	32
Andre metoder som ble brukt i dette forsøket.....	32
Del to: Isolasjon av DNA fra hypotetisk pleoforme bakterier	33
Innledning til del to	33
Hypotetisk pleoforme bakterier: et forsøk på å påvirke bakterier ved hjelp av ulike medier.	33
Marmur alle hypotetisk pleoforme bakterier	34
Modifisert van Helden et al. utført på hypotetisk pleoforme bakterier	34
Van Helden et al. utført på hypotetisk pleoforme bakterier	35

Resultater	35
Del 1 Resultater etter undersøkelse av effekt av ulike DNA -solasjonsmetoder.	36
Qiagen DNA -it isoleringsmetode utført på <i>S. pseudintermedius</i> og <i>M. phlei</i>	36
Marmur #1 utført på <i>E. coli</i> og <i>S. pseudintermedius</i>	40
Alkohol-utfelling vs sentrifugeringsfart.....	42
Marmur #2 utført på <i>E. coli</i> og <i>S. pseudintermedius</i>	44
van Helden DNA-ekstraksjonsmetode utført med <i>M. phlei</i>	46
Modifisert van Helden prosedyre utført på <i>M. phlei</i>	48
Andre metoder som er aktuelle, men ikke ble tatt med videre i forsøket: Chelax 100, Kotlowski et al. og Patel et al.....	50
Del 2 Utvalgte metoder blir brukt til å ekstrahere DNA fra hypotetisk pleoforme bakterier.....	54
Hypotetisk pleoforme bakterier, et forsøk på å differensiere <i>A. wodanis</i>	54
Modifisert van Helden et al.metoden brukt for å isolere DNA fra hypotetisk pleoforme H <i>A. wodanis</i>	58
Marmur-metoden som forsøk på å isolere DNA fra alle 8 hypotetisk pleoforme <i>A. wodanis</i> parallelt.....	61
Isolering av DNA vha. modifisert van Helden fra <i>A. wodanis</i> dyrket på åtte ulike måter.....	68
Isolering av DNA vha. van Helden-metoden fra <i>A. wodanis</i> dyrket på åtte ulike måter.	71
Diskusjon	73
Del en; undersøkelse av ulike DNA-isoleringsmetoder	73
Grunnleggende forskning av DNA isolasjon og dens utvikling vha. utvalgte prosedyrer.	73
Marmur #1.....	74
Diskusjondelen etter Alkoholutfelling vs. sentrifugerings fart.....	74
Marmur #2.....	75
van Helden et al som eksempel på mer avansert DNA ekstraksjon metode	75
Modifisert van Helden utført på <i>M. phlei</i>	76
Andre utvalgte metoder: Chelax 100, Kotlowski et al. og Patel et al.....	76
Del to DNA isolasjon av hypotetisk pleoforme <i>A. wodanis</i> bakterier	78
Mikroskopbilder av <i>A. wodanis</i> påvirket av ulike medier	78
Modifisert van Helden utført på hypotetisk pleoforme H	78
Marmur-metoden gjennomført på åtte hypotetisk pleoforme <i>A. wodanis</i> -kulturer.	79
Modifisert og ikke modifisert Van Helden et al. metoden utført på hypotetisk pleoforme <i>A. wodanis</i> bakterier.....	80
Sammenlikning av lave og høye mengder av ekstrahert DNA per gram våte celler, utbytte fra hypotetisk pleoforme	81
Konklusjon	82
Referanseliste.....	83

Innledning

I denne studien har det vært fokus på å teste ut hvor effektivt bakterier som er i ulike metabolske og fysiologiske omgivelser kan lyseres sånn at DNA kan isoleres og anrikes. Kjente bakterier med ulik oppbygning av celler har vært brukt for å tilpasse noen gamle DNA isolasjonsmetoder. En av bakteriene benyttet på slutten av studien har vært utsatt for ulike stress og næringsmessige forandringer som endrer hvordan bakterien er metabolsk aktiv og kan gjøre at de er i beskyttelsemodus for eksempel i biofilmmodus.

Målet med denne studien er å ekstrahere DNA fra bakterier utsatt for ulike betingelser og se om mengde DNA ekstrahert fra den samme bakteriearten avhenger av betingelsen den ble konfrontert med.

Det er en stor aktivitet når det gjelder mikrobiologisk forskning tilknyttet sekvensering av nukleinsyrer DNA og RNA fra bakterier (1, 2). En rivende utvikling av DNA sekvensering har funnet sted de siste tiårene og som det er mulig å dra nytte av med hensyn til ulike utfordringer i biologi fordi alt kjent liv på jorden avhenger av lagring av genetisk materiale i nukleinsyrene (3).

Den vanligste måten for å identifisere bakterier har vært å dyrke nærmest mulig renkulturer på agarmedier (4). En viktig rolle spiller fremdeles farging av bakterier og en rekke biokjemiske reaksjoner som enzymatisk nedbrytning av ulike stoffer vanligvis aminosyrer og sukker. På grunn av forskjellig evne til å bryte ned stoffene ble bakterier klassifisert (5). Disse teknikker har vært brukt til å systematisere spesielt på bakterier som er patogene (6).

DNA sekvensering metoder som bygger seg på å sekvensere PCR amplifisert DNA vha. DNA primere som knytter seg til 16S rRNA genet har vært utnyttet til å lage oversikt hvilke bakterier finnes i prøven, dette har vært i bruk i de siste tiårene i økende grad. Slike sekvenseringer blir lagret i søkbare databaser som for eksempel GenBank(7). 16S rRNA er

konservert hos bakterier, men det finnes noen mutasjoner, takket være dem kan det skilles mellom ulike bakterier. Sekvensering av dette genet kan ganne seg til å gjenkjenne renkulturer dyrket på agarmedier og dette kan være en erstatning for fysiologiske og biokjemiske identifiseringsmetoder av den fylogenetiske tilhørigheten til analyserte bakterien.

Prøvematerialet som det isoleres DNA fra til PCR for å amplifisere 16S rRNA-genet kan komme fra ulike miljøer eller organismer, fra tarminnhold eller avføring. Mange studier tok seg til å analysere bakteriesammensetning av ulike prøver som kommer fra ulike miljøer ved bruk av tilgjengelige 16S rRNA gener fra ulike bakterier fra miljøprøver(8, 9). Bioinformatisk analyse av de store grupper til alle sekvenser som kommer fra ulike 16S rRNA gener kan gi en oversikt over forskjellige bakterier som lever i dette bestemte miljøet helt ned til artsnivå(10). Det er også mulig å bestemme relativt antall av ulike bakterier i prøven vha. bioinformatiske analysen av sekvenser til 16S rRNA.

En lignende teknologi som har kommet stadig mer i bruk i de siste årene på grunn av at den mer og mer billigere kostanden til å sekvensere DNA er basert på å sekvensere alt DNA uten å bruke PCR til amplifisering av nukleinsyrer. Bioinformatisk analyse av sekvensene fra prøvematerialet kan da skille sekvenser fra bakterier og andre mikroorganismer, fra verten sin eget DNA som ofte blir tatt med i prøven (11). En videre utvikling av nukleinsyrer sekvensering vil bare gjøre forskning fra ulike miljøprøver mer attraktiv.

Den teknologiske utviklingen av sekvenseringsmetoder gjorde at mikrobiota analyser har eksplodert, vokst opp veldig mye i ulike felter som miljøarbeid eller næringsmiddel produksjon(12, 13). Sånn ser det ut til å være i dag, interesse for mikrobiota analyser er lang større i mange fagfelter enn for biologien selv(7).

Forskning arbeid knyttet til analyse av prøvemateriale som gjelder innhold av bakterier avhenger av det i hvor stor grad metodene som brukes kan frigjøre og isolere nukleinsyrer fra disse mikroorganismer som finnes i ulike steder enten det er miljø eller menneske, ulike dyr og planter. I den tidligste perioden etter at nukleinsyrenes betydning som arvestoff ble funnet ut(14) og også etterpå etter at genetisk koding ble kjent(15) og helt fram til 1990 tallet brukte forskerne kjemiske manuelle metoder for å isolere nukleinsyrer fra rene bakterie kulturer og litt etter litt også fra mer kompleks materialet(16, 17). Fra 1990 tallet stadig mer og mer overtok kommersielle selskaper det meste av utviklingen av nukleinsyrenes isolering fra biologisk materialet inkludert bakterier og andre mikrober. Det har blitt utviklet såkalte kit baserte metoder med ferdig laget løsninger som ble levert til kundene med ganske godt utestede protokoller. Det som trengs av utprøving og testing av metoden er gjort av produsenten og for forskere gjenstår bare i prinsippet å følge protokollen som produsenten har slittet med å utvikle selv.

De kommersielle kit som vanligvis er gode til raskt voksende bakterier som lar seg dyrke godt, ble etter markedets ønske utviklet og modifisert sånn at de kitene kan også ha bedre effekt på andre bakterier som ikke vokser så raskt og kanskje som det kan være vanskeligere å ekstrahere DNA fra som for eksempel bakterier fra ulike materielaer, vann, vev, næringsmidler og blod(18). I stor del utviklingen fungerte godt slik at en antar at nukleinsyrer som er rensset representerer det virkelige innholdet av bakterier eller andre mikroorganismer fra prøven som analyseres. Det er allikevel mulig at ikke alle kommersielle kit-baserte protokoller er best mulig tilpasset til å rense DNA fra bakterieceller som

forekommer i de nevnte materialer som kan ha lavere innhold av næringsstoffer som bakteriene kan utnytte for vekst eller fra bakterier som har vanskelig å lysere cellevegg.

Bakteriene finnes i ulike miljøer på jordkloden, og siden mikrobiota analyser som bygger seg opp på nukleinsyrer har økt er det også slik at studier benytter ofte ulike kit baserte metoder til å isolere DNA også fra ikke så godt dyrkbare på vanlige næringsmedier bakterier eller bare som i liten grad er dyrkbare. Det kan stilles spørsmål om hvor effektivt nukleinsyrer kan isoleres fra bakterier som er metabolsk ikke aktive. Bakterier som er levende, men ikke aktive kalles ofte for VNBC (viable but nonculturable)(19) og har vært studert i for eksempel vann. Bakterier kan forekomme i biofilm i en tilstand som lav metabolsk aktive og disse viser seg vanligvis vanskelige å dyrke. Bakterier har svært ulike cellevegger avhengig av hvilken gruppe de tilhører: stafylokokker, tarmbakterier og mykobakterier eier ulike cellevegger som må åpnes eller brytes ned hvis DNA skal isoleres sånn at det kan renses og anrikes for DNA sekvensering(20, 21). De ulike kommersielle kit baserte metoder ble utviklet for å dekke flest mulige varianter av bakterier, men det er lett å tenke at effektiviteten av rensing DNA fra enkelte typer bakterier vil variere.

Grampositive bakterier som stafylokokker på grunn av tykkecellevegg trenger forlangt enzymvirkning for å lysere tykt lag av polipeptidoglykan i deres cellevegg. Mykobakterier på grunn av ganske kompliserte cellevegger bestående av lange voksaktige lipidsyrekjeder og andre strukturer trenger mer omfattende teknikker til at DNA innholdet kan bli frigjort. Ulike sporer kan også skape problemer med DNA isolering på grunn av den gode beskyttelsen som de lager.

Det er ofte en interesse å isolere bakteriell DNA fra mennesker og dyrs blod og andre typer vev i tillegg ikke bare fra tarmen. Målet med studien er å finne mer effektive angrepsmåter for isolering og anrikning av nukleinsyrer fra ulike mikrober som ikke er i metabolsk aktiv fase som ofte foregår i vev hos friske og syke ulike dyr. Utgangspunktet har vært godt etablerte gamle DNA isolasjons metoder som opprinnelig ble brukt til bakterier med ulik celle vegg. Ved å benytte slike tidlige DNA protokoller var det et ønske å finne mer effektive metoder til å isolere, og rens DNA fra bakterier som foreligger i vev med ulike metabolske virkemåter.

Noen eldre forskere nevner pleoforme eller pleomorfe bakterier av og til, de tror at bakterier forandrer sin form avhengig av ulike omgivelser. Petroff, Steenken(22) drev med å lage ulike former av *Mycobacterium phlei*. De skriver om «mulige ulike varianter av bakterien» som har forskjellige egenskaper. Slike bakterier som lever på gresset, blir spist av herbivore dyr, sier de og videre mener at ingen vil nekte dette at ulike omgivelser spiller en viktig rolle i bakterievariasjoner: «That the environmental conditions play an important part in their variability, no one today will deny.» De påpeker at *M phlei* dyrket på egg medium har ulik farge enn den grodd på glyserol oksekjøtt agar. Også videre beskriver de forskjeller som dukker opp når bakterier blir påvirket av ulike omstendigheter under dyrkingen. Det som ble notert som særlig irriterende var at noen av de varianter de oppnådde ikke alltid kunne gjentas. De produserte nemlig ulike varianter og prøvde å beskrive dem etterpå.

Philip Hadley nevner i 1927 «bacterial instability» og siterer flere andre forskere som skrev om bakterier som forandret sin utseende(23). Det skal ikke gås dypt inn på det hvor godt det er bevist. Det ser ut i hvert fall til at hypotesen om at det fantes ulike pleoforme

varianter av en bakterie var mer populær i begynnelsen av 19-hundretallet enn den er nå. Det ble brukt også uttrykk «bacterial dissociation».

Noen av de yngre forskere også kommer tilbake til lignende hypoteser. Det ble til og med bevist at bakterier kan miste sin cellevegg ved hjelp av for eksempel lysozyme og takket være det kan unngå å miste livet sitt, når cellevegg angripende antibiotika blir tatt i bruk. Samtidig etterpå er de i stand til å bygge cellevegg igjen(24). Sånne bakterier som klarer å leve uten cellevegg ble kalt lenge før L-organismer. (L ikke på grunn av at de ligner på bokstaven L, men etter Lister institutt i London der de ble oppdaget i 1935 av Emmy Klieneberger) (25). Sånne organismer kan fortsette å dele seg videre og dette skiller dem fra protoplaster eller sferoplaster som vanligvis ikke deler seg. De kan ikke dannes i hypotonisk løsning, hvor deres celler vil sprenges i stykker. Istedenfor celler forstørres sin form, danner mer membran og på den måten tilpasser seg til omgivelser(26).

Pleomorfe bakterier ble også beskrevet i andre sammenhenger, deres celle form varierer avhengig av miljø de befinner seg inni(27). Ofte slike pleoforme celler klarer man ikke å dyrke videre på skål.

Det er to hypoteser at bakterier generelt sett kan forandre og forandrer sin utseende, cellevegg og størrelse avhengig av miljø de befinner seg i. En annen hypotese er at bakterier er gjemt i friskevev og blod(28). Det er mulig de kan være gjemt i levende vev, til og med blod, og når verten for eksempel dør forandrer de seg til en annen form, eller når de havner plutselig i et annet miljø forandrer de seg. Det er en interessant hypotese som kan bli sant eller ikke samtidig meget nyttig fordi den kan skape en type utfordring og lyst til å søke et svar til tross for at slike undersøkelser blir ikke lette å gjennomføre. Sånne en hypotese skaper drivkraft, lyst til å jobbe med dette temaet. Hvis den hypotesen er sant kunne den ha en stor betydning for mikrobiologi, det kunne forandre måten man ser på bakterier og danne et unikt perspektiv som kan hjelpe å finne flere hemmeligheter i naturen.

Her i dette prosjektet forsøkes det selvfølgelig ikke til å lage et systematisk grunnlag som trenges til å danne teori, denne utfordringen vil bli etterlat til andre. Det prøves her heller å holde åpent metodologisk stilling til begge muligheter veldig enkelt: hypotesen er riktig eller ikke.

Kanskje litt mer utbredt er en oppfatning at bakterier etter å bytte miljø vil forandre sine metabolske reaksjoner etter hvert for eksempel bakterier som lever i jord er annerledes enn de samme bakterier som lever mange år i menneskevev når det gjelder biokjemiske og til en liten grad også fysiske egenskaper(29). Selve hypotesen om pleoforme bakterier går mye dypere. Det antas at bakterier kan tilpasse seg til nytt miljø ved å skifte celle utseende, men også forandre cellevegg, fra kokker til staver eller fra gramnegativ til grampositiv for eksempel.

Bare bruk av uttrykket «pleoforme bakterier» uansett kan bli anklaget som ubegrunnet og derfor ikke rett i denne vitenskapelige sammenhengen vi befinner oss i dag. Det er grunnen til at her blir de videre kalt «hypotetiske pleoforme bakterier» med håp for å danne mindre forvirring i alt dette.

Selve hypotesen synes å bli enkelt, men siden den ikke har blitt bevist så lenge inntil nå og finnes ikke i lærebøker, ser det ut er den ikke noe lett å bevise. Disse undersøkelser her vil ta utgangspunkt i sånn en antagelse, at bakterier kan forandre form dette skal bli lik som en

bakteppet. Denne hypotesen blir en type god anledning til å lære å ekstrahere DNA, den forskning kan videre kanskje hjelpe litt til å få mer lys i dette området.

Det som skal huskes videre kort sagt er at det ikke er altså bevist teori, men hypotese, en antagelse som blir en nyttig, god anledning til å forske bakterier og lære å ekstrahere DNA.

Derfor første steg blir å bli kjent med ekstraksjon metoder som virker på «vanskelige» bakterier dvs. slike bakterier som skaper problemer med DNA ekstraksjon. Hvis det er en metode som isolerer DNA fra sånne bakterier så det er et håp at de vil virke på hypotetisk pleoforme også.

Gamle metoder bruker ofte skadelige og farlige kjemikalier i enda større grad og volum enn kommersielle kit, samtidig tar det lengre tid å gjennomføre gamle metoder. Kommerielle DNA ekstraksjons kitene som er laget sånt at det blir ikke veldig vanskelig å ekstrahere DNA einer seg veldig godt til mange bakterier, kanskje de fleste kjente bakterier, det er vanskelig å dømme. De passer allikevel ikke like godt til alle bakterier. Derfor er det fint å bruke ulike andre metoder gamle og nye som tar ofte i bruk for eksempel fenol og kloroform og se om de skal virke med vanskelige bakterier.

Andre trinn blir å bruke bakterier utsatt for ulike miljø eller vev imiterende løsninger til å prøve ut disse metoder, sammenligne sånne bakterier med hverandre og se om det er noen forskjeller mellom hver av dem når det gjelder effektivitet av ulike metoder til å ekstrahere DNA fra dem. Hensikten for å utsette bakterier for en rekke slike løsninger er å skape ganske varierende betingelser som ligner på naturlige miljø særlig i vev. Disse løsninger ble laget nemlig av blod serum eller gelatin, Leibowitz medium, eller fysiologisk vann (0,9% NaCl). På den måten forsøkes det å påvirke bakteriene til å forandre seg.

Bakteriearter som ble brukt i denne studien

I første delen av oppgave var det plass å ekstrahere DNA fra bakterier som representerte ulike cellevegger, med ulik vanskelighetsgrad av å lysere dem.

Derfor her blir det utnyttet bakterier som *Mycobacterium phlei* og *Staphylococcus pseudintermedius* som kan være vanskelig å få mye DNA ut av. Disse bakterier eier tykke cellevegger som kan forsvare dem godt mot farlig miljø. De var godt egent til å teste hvor effektive ulike metoder egentlig var.

I den andre delen hvor det skulle teste hvor vanskelig det var å isolere DNA fra en bakterie eksponert for ulike naturlige betingelser, ble det brukt *Aliivibrio wodanis*, en gramnegativ bakterie. Det kunne ble brukt ifølge teorien hvilken som helst bakterie, men det ble valgt en som det ikke er så vanskelig å ekstrahere DNA med håp for å teste letter forandringer i DNA ekstraksjon utbytte hvis slike forandringer ville skje. Det ble forventet at generelt sånne vev imiterende løsninger vil gjøre bakteriene vanskeligere å åpne.

Utvalgte bakterier fra orden *Mycobacteriales*

Kanskje en av de mest undersøkte og kjente bakterier blant *Mycobacteriales* er *Mycobacterium tuberculosis* hvilken model eksempler av bakterievegg oppbygning ble foreslått av ulike forskere(30, 31). Generelt sett Vincent et al.(32) peker på fire lag i Mykobakterier sine cellevegg: 1 peptidoglykan, 2 arabinogalaktan, 3 mykoliske syrer, 4 eksterne lipider. Peptidoglykan er et vanlig stoff som bakteriene har i sine cellevegger bestående av sukker polymere knyttet til peptider vha. aminosyrer(33), mens arabinogalaktan er en annen sukkerpolimer, mykoliske syrer er lange fettsyrer. Bare ved å nevne de ulike komponenter kan det tenkes for seg at cellevegg til en mykobakterie ikke er noe vanlig cellevegg. (Typiske grampositive bakterier har lipidmembran og tykk peptidoglykan lag, mens gramnegative to lipidmembraner og en tynn peptidoglykan lag).

Det ble valgt *Mycobacterium phlei* for å ekstrahere DNA fra fordi den er ikke så veldig farlig bakterie. *M. phlei* er klassifisert som ikke patogen for mennesker eller som potensiell patogen, en som fører til infeksjoner ekstremt usedvanlig(34). Den ble dyrket på blod agar og i BHI flytende medie.

M. phlei var det vanskeligst å ekstrahere DNA fra blant alle bakterier som ble brukt her og derfor kan regnes som en ganske viktig bakterie som ble utnyttet til DNA ekstraksjon i det første trinnet dvs. der hvor det skulle gjennomføres utfordrende DNA ekstraksjoner, slike ekstraksjoner som kunne håndtere bakterier som ikke lar seg ekstrahere så lett DNA fra. Denne bakterien skapte en god mulighet til å teste gjennomføring av metoder, og var som en utfordring god nok til å lære ulike teknikker og kunne evaluere dem.



Figur 1 *M. phlei* dyrket på blodagar.

M. phlei ble isolert av Moeller på slutten av 19-hundretallet fra *Phelum protense*(22) og derfor ble den kalt også *Timothy grass bacillus* (35, 36). Det at den bakterien som også andre Mykobakterier er vanskelig å ekstrahere DNA fra kommer fra uvanlig kompliserte cellevegg som består bl.a. av lange fettsyrer i 30-40 vekt prosent(37) som også danner voks(38) (voks generelt sett er en lang fettsyre og alkohol bundet sammen vha av ester (39)). Selvfølgelig er det lett å tenke at ulike Mykobakterier kan ha til en viss grad ulike konvolutter, og på den måten for eksempel de patogene klarer å overleve immunrespons av verten(37) og de som ikke er patogene klarer seg godt i andre vanskelige forhold. For eksempel tegn på at *Mycobacteriu phlei* klarer å leve i ekstreme miljøer er at den ble brukt til avsvovling av lett gass olje (LGO) dvs. oljen brukt i diesel kjøretøy, i temperatur opp til 50°C(40). Dette kan tyde på at *M. phlei* sin bakterievegg kan være spesiell. Bildet av *M. phlei* ble vist på figur 1.

Det kan foreslås generelt sett litt forskjellige modeller av cellevegger(41). *M. phlei* konvolutt oppbygning ble ikke beskrevet spesifikt dog det ble isolert noen unike komponenter(42) og beskrevet for eksempel varierende sammensetning av fettsyrer som avhenger av temperatur bakterien er grodd ved(43).

Nocardia asteroides er en bakterie som ble brukt litt i dette forsøket. det er en opportunistisk patogen som angriper svake dyr og mennesker. Bakterien tilhører den samme orden som *M. phlei*: *Mycobacteriales*. Det ble ekstrahert DNA fra *Corynebacterium pseudotuberculosis* som også tilhører den samme orden som *M. phlei* og *N. asteroides* og er viktig dyr patogen som angriper for eksempel sauer og geit(44).

Staphylococcus pseudintermedius som eksempel på grampositive bakterier

Det ble valgt å bruke en grampositiv bakterie til denne undersøkelsen. Slike bakterier er mer utfordrende i DNA isolering enn grampositive på grunn av deres cellevegg oppbygning som består av tykk peptidoglykan lag, vanskelig, tidskrevende å lysere. Gramnegative bakterier har bare tynn polipeptidoglykan lag som er mye lettere å brette.

S. pseudintermedius fikk slikt navn fordi den er lett å forvirre med *Staphylococcus intermedius*(45) Det navnet kunne oversettes «*S. falskintermedius*». Det er ikke mye som vil skille dem, men for eksempel maltose metabolisme kan skille de to fra hverandre. Den ble kjent etter publikasjon i 2005, isolert fra kattelunge vev, hestehudlesjon, ørelesjon hos en hund og lever av en papegøye(45). Patogenisk virkning for dyr og mennesker ble også til en viss grad beskrevet og bakterien ble kalt opportunistisk patogen(46).

Aliivibrio Wodanis

A. wodanis er et hav og fiske gramnegativ bakterie som finnes også i fiske sår(47, 48) som hører til *Gammaproteobakterier* klassen. Den ble valgt til å utføre eksperimenter med ulike løsninger nevnt før som ble allerede brukt i laben vår og som kan skape ulike forhold for dyrkning av bakterier. Dette er gjort for å prøve å påvirke dem til å differensiere på ulike måter. Disse løsninger blir beskrevet enda nærmere i metode kapitalen.

Andre bakterier som ble brukt

Det var også andre bakterier som ble brukt som representanter for ulike cellevegger.

E. coli er en vanlig bakterie som er brukt ofte i laboratorier og er lett å isolere DNA fra. Det er en gramnegativ bakterie som forekommer i naturlig tarmflora av jevnvarme dyr(49). Når det gjelder gramnegative bakterier er det forventet at det er lettere å ekstrahere DNA fra dem fordi deres cellevegg er laget av bare en tynn polypeptidglykan lag og to lipid lag.

Bacillus cereus er en grampositiv stav, en bakterie som er i stand til å forgifte mat ofte ris. Den lager sporer, tilhører *Firmicutes* klassen slik som *S. pseudintermedius* mens *M. phlei*, *N. asteroides* og *C. pseudotuberculosis* som tilhører alle tre *Aktinobakteria* klassen(49). På grunn av den er grampositiv og har tykk polypeptidglykan lag kan det være relativt vanskeligere å lysere den enn for eksempel cellevegg til *E. coli*.

Bakgrunn for DNA-ekstraksjonsmetoder benyttet i oppgaven

Isolasjon av DNA grunnleggende prinsipper, med spesielt vekt på kjemisk ekstraksjon

Det ble utnyttet i denne oppgaven spesielt kjemiske metoder til å ekstrahere DNA fra bakterier med ulike cellevegger og i dyrket i ulike vekst betingelser. DNA isolasjon kan deles generelt sett i to steg. Den første er lysis av celleveggen og den andre rensing av DNA.

Det brukes i første trinnet ulike enzymer og detergenter og andre forbindelser som kan brette celleveggen i stykker. Enzymer er rettet til å kutte i stykker polypeptidglykan som lysozymet eller proteiner som proteinase K. Detergenter som SDS hjelper til å ødelegge lipidmembran laget i celleveggen. Det er viktig å ødelegge celleveggen for å få DNA ut ellers vil ikke ekstraksjon lykkes. Det kan også ødelegges cellevegg på en termisk måte eller mekanisk vha. kuler.

Neste steg er å isolere DNA fra andre forbindelser. Det trengs ekstraksjon metoder for å skille DNA fra andre stoffer etter at celleveggen ble ødelagt, fordi nukleinsyrer er blandet med ulike forbindelser som proteiner eller kjemikaler som kan inhibere PCR som SDS. For å skille de ulike stoffer ble det utnyttet for eksempel kloroform og fenol. Samtidig kan det brukes salter før kloroform ekstraksjon for at proteiner feller lettere ut og blir fjernet.

Alkohol utfelling blir brukt for å kaste vekk vannløselige stoffer, mens DNA felles ut og blir sittende i prøven som en pellet.

DNA kontaminanter

På grunn av ulike kontaminanter bør DNA renhet bli undersøkt denne undersøkelsen foregår vha. Nanodrop UV-Vis fotometri. DNA mengde blir detektert ved Qubit fluorescens måling.

Alt utenom vann og DNA buffer kan generelt sett regnes som kontaminanter i forbindelse med DNA ekstraksjon. Til og med EDTA kan inhibere Taq polymerasen hvis den fanger for mange Mg ioner under PCR.

Proteiner, polysakkarider, SDS, fenol, Triton X-100, proteinase K er disse kontaminanter som kanskje oftest kan dukke opp i prøven ved DNA isolering fra bakterier(50).

Marmur 1961 DNA isolasjons metode som grunnleggende metode for kjemisk DNA isolasjon.

Marmur metoden ble laget av Julius Marmur og publisert i 1961(51). Det er den første metoden som det oppnås «highly purified and high quality» nukleinsyre(52). Samtidig oppskriften hans er så godt laget at til og med uerfarne studenter klarte å utføre den(53). Den baserer seg på den første kloroform DNA ekstraksjons metoden utført av Sevag i 1938 (54), tar i bruk detergent sodium dodecyl sulfat og lysozyme, alkohol utfelling av DNA.

I introduksjon til denne metoden nevner Marmur at metoden hans skal være godt til forskjellige bakterietyper (han prøvde den på cirka 50 ulike mikroorganismer) og på den måten er metoden annerledes enn metoder som var laget før og som passet til spesifikke grupper av bakterier som for eksempel *pneumococcus* (55).

Den metoden samler disse klassiske elementene som er brukt inntil i dag og kan utnyttes som en viktig nøkkel til andre metoder til tross for at andre metoder ser ut til å være enda mer effektive med å ekstrahere DNA for eksempel sånne som bruker fenol ved siden av kloroform(56). Det ble brukt sodium perklorat som er et farlig sterkt oksiderende stoff utnyttet i nukleinsyrer isolasjons kit før, men ikke så mye nå pga. vanskeligheter med å frakte dette. Den fordampes ikke, men støv er helseskadelig og kan forårsaket astma symptomer.

Andre metoder som er tatt i bruk i oppgaven

I tillegg til Marmur ble det tatt i bruk andre metoder: van Helden et al. Qiagen kit basert metode, Chelax-100, Kotlowski et al, Patel et al.

Van Helden et al.(57) er en metode som ved siden av Marmur ble brukt her mest av alle andre metoder. Den er laget for å ekstrahere DNA fra *M. tuberculosis*. Den bruker proteinase K som hjelper å lysere celleveggen ved å angripe proteiner i den. Van Helden utnytter også fenol i DNA isolasjon som gjør ekstraksjon av proteiner fra DNA enda mer effektiv enn med bare kloroform. Når det gjelder alkohol utfelling utnytter van Helden kaldt isopropanol DNA utfelling på slutten av, disse elementer skiller den fra Marmur. Resten ligner på Marmur til en viss grad.

Qiagen kit metode er en kolonne basert DNA isolasjons metode som skal brukes for å ha referanse. Det er en slags grunnleggende metode som er mye brukt i laben vår i dag og som vi derfor ønsker å sammenlikne med. Gel silika kolonner virker på den måten at de binder

DNA med seg når salt som guanidine hydrochloride er til stede samtidig andre forbindelsen kan bli fjernet ut av kolonnen(58, 59). DNA kan bli eluert ved hjelp av vanlig TE buffer.

Kotlowski et al.(60) utnytter proteindenaturerende stoffer samt SDS, fenol og kloroform, og frysning i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ til å ødelegge cellvegg av en Mykobakterie. Han ekstraherer DNA fra urenheter vha. en kolonne og vasker ved bruk av EtOH. Denne metoden er laget for å isolere DNA fra små miljøprøver fra *Mycobacterium ulcerans*. Det kunne vært interessant å bruke den metoden med små miljø prøver denne sammenheng med ekstraksjon av hypotetisk pleoforme bakterier.

Patel et al.(61) metoden tar bruk i ulike enzymer samt kloroform og fenol, og ligner mye på van Helden metoden baserer seg også på kjemisk isolasjon av DNA, men bruker andre typer proteinaser enn van Halden. Den ble brukt fordi den så ut til å være kraftig metode med mye tid beregnet for enzym cellevegg lysering, mer en van Helden.

Chelax-100 metoden utnytter ikke farlig polymer Chelax som er styrene-divinylbenzen og bruker den til DNA ekstraksjon. Celler denatureres og utløses DNA ved høy temperatur ($95\text{-}100^{\circ}\text{C}$), og siden Chelax er et stoff som kan tiltrekke magnesium metal ioner inhiberer på den måten DNaser, enzymer som kan skade DNA(62). Etter oppvarming blir prøvene sentrifugert og DNA som er løst i vannfasen pipettert ut mens pellet dannet av bakterierester kastet vekk.

Et utvalg av ulike komponenter til DNA isolasjons metoder

Her følger en beskrivelse av viktigste kjemikalier/reagenser som er brukt i metodene i denne oppgaven, inklusiv hvilken rolle de har i DNA-ekstraksjonsprosessen.

EDTA og Tris buffere

DNA degraderes i rent vann og ternger å bli løst i en buffer eller i hvert fall vann med salt(14, 51), generelt sett DNA kan holde seg best i bestemt konsentrasjoner eller vil den brette ved omrøring. DNA er best å bli holdt i konsentrasjon mellom 200 og 800ng per ul(63).

EDTA danner ikke en pH buffer, men en metal ion buffer(64), EDTA tiltrekker og binder seg med metal ioner som Mg^{2+} og Ca^{2+} og på den måten gjør at mange enzymer ikke vil virke også sånne som kan skade DNA(65). Jo lavere pH desto svakere EDTA styrke til å binde med metal ioner, det finnes en konkurranse mellom H^{+} og M^{+} til å binde seg med EDTA. Innflytelse av pH er ulikt og varierer mht. ulike metal ioner(64).

Tris-HCl er en pH buffer som også kan inhibere enzymer ved å fange opp metal ioner. Buffer pH rekkevidde strekker seg fra 7 til 9(66).

Reagenser for lysering

Det ble utnyttet en rekke reagenser som bidrar til at bakteriell cellevegg blir lysert og på den måten kan (intracellulært) DNA bli frigjort fra en lukket celle.

Lysozyme

Lysozym, tilstedeværelse og virkning ble beskrevet av Alexander Fleming i 1922(67) som peker at dette enzyme finnes for eksempel i menneskets tårer, neseslim, sputum og mange andre steder, særlig mye i egghvite og i noen planter som nepe. Lysozym ifølge ham kan ha vekstinhiberende, bakteriedrepende og lyserende effekt og jo større konsentrasjon desto raskere ser den ut til å virke. Lysis gjør også at fargemetoder for mikroskopi av bakterieceller ikke fungerer. Salt mellom under 0,1 og 5% gjør at lysozyme virker raskest. Den mister litt av sin styrke i 60°C og mye mer i 75 grader. Enzymet generelt øker sin fart inntil 60°C, og senker etterpå. (67).

Virkemåten av lysozyme ble beskrevet av Kirby(68): enzymet hydrolyserer polysakkarider laget av NAM-NAG kjeder sannsynlig ved nukleofil substitusjonsreaksjon S_N2 . Asparaginsyre Asp-52 og Glutaminsyre Glu-35 til enzymet virker som saks og kutter i stykker peptidoglykan. Lysozyme er aktiv mellom 6 og 9 pH(69).

Proteinase K

Proteinase K ble isolert av sopp *Tritirachium album* i 1974 og bestemt at enzymet virket i pH området mellom 7,5 til 12.0(70). Den er mest aktiv i 37°C, men mer enn 80% av aktivitet styrken enzymet beholder i temperatur mellom 20 og 60°C.

Proteinase K er en serine protease dvs protease hvor viktig rolle spiller tre aminosyrer Asparaginsyre Histidin og Serin (Asp-39, His-69 og Ser-224) i å gjennomføre katalytisk reaksjon. I en mulig mekanism Ser og Asp danner hydrogen bindinger med vann og på Serin blir det laget såkalt oksyanion hull ($C-O^-$) Den anion angriper peptidebindinger til aminosyrekjeder av proteiner. Den foreslåtte mekanismen ble nøyaktig beskrevet av Betzel et al.(71).

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Sodium Dodecyl sulfat ble første gang brukt til å ekstrahere DNA i 1938(72). Det er en detergent som ødelegger lipidstruktur av cellemembraner. Temperatur den virker best i er 28°C , for membraner, men for eksempel vesikler ble lettere ødelagt ved høyere temperaturer som 56°C(73).

Reagenser brukt til purifisering/rensing av DNA

Etter at DNA er frigjort fra en bakteriecelle blir den i en blanding av ulike forbindelser som proteiner og kjemikaljer brukt til å lysere cellene, derfor trenges DNA å bli renset mest mulig ellers kan disse stoffene inhibere for eksempel PCR.

Kloroform

Kloroform er et stoff som hjelper å skille proteiner og nukleinsyrer fra hverandre. Nukleinsyrer blir renset fra såkalte hydrofobe forbindelser og det som gjenstår er bare vannløselige stoffer. Derfor er det et viktig trinn i DNA ekstraksjon. For å bli bedre kjent med dette stoffet kan det nevnes her noen generelle opplysninger.

Kloroform kan bli dannet ved at $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ blandes med klorkalk og på den måten ble det først laget av flere forskere rundt 1831(74).

Vann vil ikke blande seg med kloroform. Det kommer av at entropien av de to ville synke, noe som betyr at det ikke passer godt for begge to å holde sammen pga. mindre bevegelsesfrihet av molekyler. Når det brukes energi til å riste dem to føres det samtidig til en type entropisk straff og den trekker molekylene fra hverandre tilbake til utgangspunktet (dvs. til tydelig fase separasjon, til større bevegelsesfrihet). Alt dette forekommer fordi entropien vil føre molekylene til den best mulig bevegelsesfrihet (75, 76).

Denaturering av proteiner i kloroform skjer når ladede sidekjeder kan reagere mye sterkere med proteinets hovedkjede i kloroform mye sterkere enn i et polart løsemiddel som vann fordi i kloroform blir hydrogen bindingene inne i proteinet forstærket og denne forandringen vil føre til at proteinet forandrer sin form (77, 78). Dette hender som resultat av at dielektrisk konstant ϵ_r av kloroform er mye lavere enn av vann (hhv. 4.81 og 80.4) og etter Coulomb's lov blir det klart at ladninger vil påvirke hverandre mye sterkere med mye svakere ϵ_r (75). Styrken til ladet sidekjeder blir nesten 17 ganger sterkere i kloroform enn i vann bare på grunn av dielektrisk konstant, kloroform absorberer nesten 17 ganger mindre elektrisk ladning enn vann.

På grunn av alle forandringer som påvirker proteiner under blandingen av vann og -kloroform kan til og med sekundær og tertiær struktur av proteinene bli forandret. Alifatiske upolare sidekjeder kan bli trukket utenfor, altså omvendt enn av i vann hvor de blir gjemt inni i proteinet mens polære hovedkjeder, som forsterker sin innflytelse på hverandre i kloroform, kan bli trukket inn. Så kort sagt hovedkjeder og sidekjeder forsøker å omplassere seg når de fra vann havner i kloroform. Dette ødela for eksempel α -helix i proteinet beskrevet av H. Kovacs et al. dette skjer fordi kloroform er sånt løsningsmiddel at den ikke klarer å holde protein stabil på en vanlig måte som polære løsningsmidler. Helix er oppnådd ved van der Waals krefter som holder nær hverandre alifatiske, hydrofobe karbon sidekjeder(77). Konformasjonell ustabilitet blir nådd i kloroform og det kan tenkes at ved å blande kloroform med vann vil proteiner være i stadig forandring dette kan hjelpe til å frigjøre DNA fra histoner og andre proteiner som er knyttet til dem.

Fenol hjelper til å depoteinere DNA

Fenol er et stoff som kan bli produsert fra lignin(79). Det er en svak syre og etsende ambient nukleofil (dvs. som kan angripe fra ulike sider) sterk hvis angriper med oksygen og svakere hvis med karbon ion. Oksygen ion reagerer hovedsakelig med svake elektrofiler(80). Proteinstruktur kan bli ødelagt mer enn i kloroform takket være sånne kraftige angrep og proteiner blir tiltrukket til kloroform lettere ved at hydrofobe aminosyregrupper blir avdekket enda bedre under blandingen av vannfasen med fenolkloroform.

Ved hjelp av fenol er det mulig å ekstrahere DNA og RNA eller bare RNA. Hvis det er DNA som skal ekstraheres burde fenol bli mettet med en buffer som gjør løsningen nøytral og forandrer fenol fra en syre til fenolatanionet dvs. den korresponderende basen av fenol. Det burde bli gjort på den måten fordi syrlig løsning med fenol vil tiltrekke til seg ikke bare proteiner, men også DNA sånn at i det som gjenstår i vannfasen er RNA(81, 82). Det er sagt at ekstraksjon av DNA skal foregå i pH nøytral fra rund 7 frem til 9 (56), (samtidig for høy pH over 10 gjør DNA ustabil). RNA enkle kjeder kan danne flere hydrogen bindinger enn DNA når pH er lav på grunn av sine baser som stikker ut av kjeden og disse basene kan danne ekstra hydrogen bindinger.

Det viste seg at det ikke er til og med nødvendig å mette fenol med en buffer for å justere pH av fenol løsningen, men det kan være til og med bedre å prøve med sikre pH av prøver med DNA med bakterierester vha. pH buffer(83). Dvs. det kan mettes fenol bare med vanlig vann og etterpå kan brukes pH buffer med selve prøver som ekstraheres DNA fra.

Alkohol utfelling

Det er godt kjent at ulike stoffer kan løse seg i vann mer eller mindre, generelt sett med økende temperatur vil stoffene løse seg bedre. I DNA ekstraksjon utnyttet det alkoholer

(vanligvis etanol eller 2-propanol) til å felle ut DNA. DNA blir avkled og fratatt vann molekyler som vanligvis omringer tett og dekker DNA. Samtidig salt ioner som Na^+ eller NH_4^+ limer seg til ladet DNA fosfat grupper så det oppstår en type DNA salt som felles ut(84).

Det ofte gjerne samtidig senkes temperatur for å felle ut bedre DNA. Sånne ting som inkubasjon i etanol overnatt ved 0°C , sentrifugering 30 minutter ved rom temperatur kan styrke gjenvinning av DNA, også ammonium acetat kan virke litt bedre enn natrium acetat salt dvs. den kan gi litt bedre DNA gjenvinning etter etanol DNA utfelling (85).

Nanodrop DNA målinger

For mange anvendelsesområder er det viktig at DNAet er rent, og fotometriske målinger er en enkel måte å undersøke løsninger for stoffer som absorberer lys på andre bølgelengder enn hva enn forventer for DNA. For eksempel DNA blir brukt til PCR og her er det viktig hvor ren DNA er og om den ikke inneholder inhiberende stoffer som forhindrer Taq polymerase å jobbe. Polymerasen er et protein som kan bli skadet av fenol også kan bli inhibert av for eksempel SDS, proteinaser og etanol(50). Derfor er det viktig at DNA er rent nok og ikke inneholder for mange forurensninger. For å undersøke renhet er det vanlig å bruke Nanodrop spektrofotometer.

Nanodrop bruker Beer'lov for å måle lys absorpsjon av ulike stoffer. Lys absorpsjon avhenger av mengden av absorberende lys molekyler(86). Nanodrop er laget spesielt for å måle absorpsjon rundt 260nm dvs. lys bølgelengden som blir absorbert av DNA eller ulike DNA kontaminanter. Det er viktig å beskrive mer detaljert hvordan Nanodrop kan detektere ulike kontaminanter for å kunne evaluere kvalitet av DNA.

Til tross for at Nanodrop gir forhøyet DNA konsentrasjon(87), er det bra å bruke den fordi den viser renheten av DNA. Forurensninger som ble sagt kan forhindre PCR.

Pyrimidin og purin absorberer omtrentlig 260 nm lys(88) . Problemet oppstår hvis det finnes andre ting i prøven som også vil påvirke 260 signal, da blir målingene feilaktig høye (for eksempel guanidine thiocyanate, eller fenol(89)).

Ren DNA absorbans ratio A_{260}/A_{280} er vanligvis lik 1,8 mens ren RNA 2.2-2.3. Det kan ses omtrentlig på spektrum, høy topp ved 260nm, mens rundt 280nm finnes det midt på

toppsiden av nukleinsyre spektrum se figur 3. Proteinforurensning av DNA kan måles fordi proteiner absorberer lys ved 280 nm. Det er en viktig og vanlig måte å regne ut ratio A_{260}/A_{280} . Ikke bare proteiner, men også fenol øker lys absorpsjon ved 280(90). Parallell målinger av DNA under 20ng/ul viser mye variasjoner når det gjelder A_{260}/A_{280} ratioen, for eksempel prøven med 2,5ng/ul har 49,1 prosent standardavvik, når den er målt flere ganger(91). Det er litt usikkert hvorfor liten DNA mengde viser seg på spektrum på en ulik måte, det ser ut til at andre signaler dominerer i prøven på en varierende måte. I tillegg forskjell mellom blindprøven og prøven i pH kan påvirke også den ratio med 0,2-0,3 faktor(89, 92). Gode DNA resultater bør være innen 1.7-2.0(87).

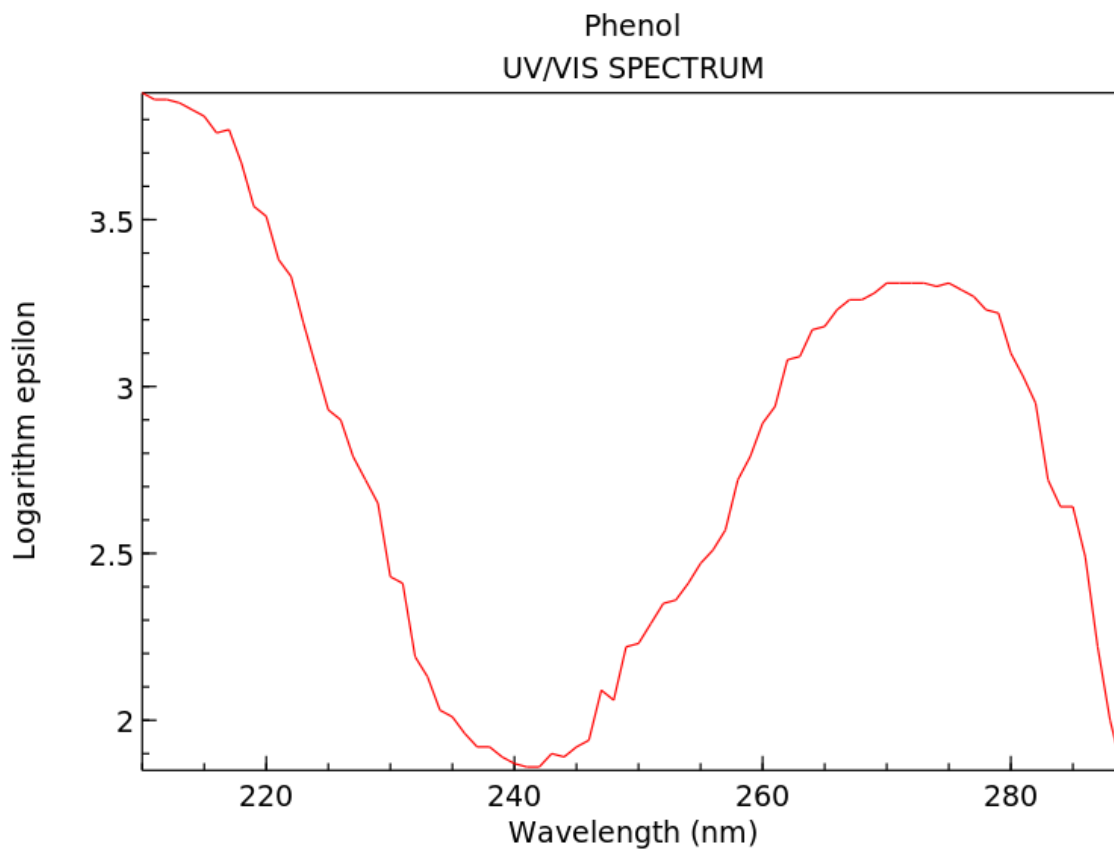
Proteiner absorberer egentlig ikke så mye lys som selve nukleinsyrer (derfor trenges det mye proteiner for å etterlate tydelig spor på spektrum). Enkelt trådet DNA absorberer mer lys enn dobbelt trådet(88).

Ren DNA har et spektrum som ikke absorberer mye lys ved 230 nm, dvs. det dukker opp som en slags grøft: linjen senker ned og absorpsjon av lys ved 230 nm er en bunn av grøften. Det brukes derfor de to verdier i en Nanodrop måling for å lage den andre ratioen (A_{260}/A_{230}) og ganske ren nukleinsyre burde ha verdi på 2.0-2.2. Det finnes en rekke substanser, som kan gjøre den verdien lavere enn 2: fenol, proteiner, urea, karbohydrater, glykogen(89, 90). Disse gjør at grøften ikke blir så dyp.

Det brukes ofte fenol i denne oppgaven. Det er godt å sammenligne DNA spektrum med spektrum av fenol. Den ligner nemlig til en viss grad som DNA eller RNA spektrum, og man kan bli narret på grunn av dette derfor er det godt å understreke ulikheter. Forskjellig er at ved 230 absorberer den mer lys så linjen ligger høyere enn DNA spektrum (derfor A_{260}/A_{230} kan bli lavere), samtidig toppen er forhøyet og forskjøvet litt mot høyre som kan gjøre A_{280}/A_{260} lavere også. Sammenligning av ulike spektra ble også vist på Technical note(89).

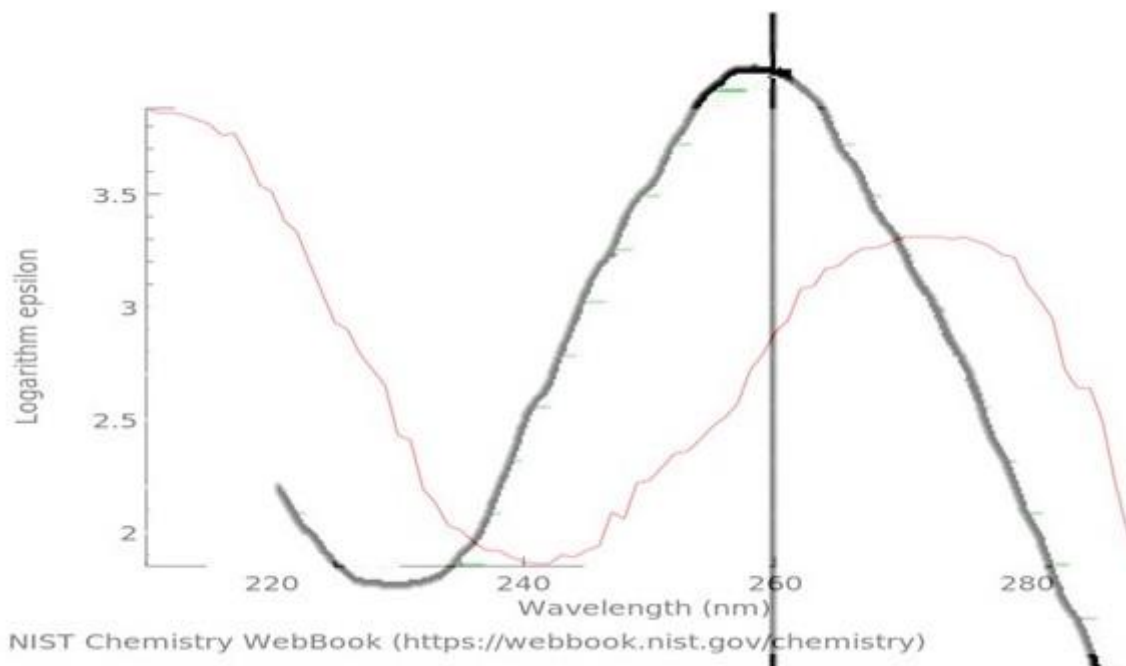
Fenol spektrum på figur 2 viser at begge ratioer kan bli påvirket, siden den absorberer mer lys ved både 280 og 230 enn ren DNA vil verdier av begge ratioene senke.

Fenol med DNA spektrum ble vist på figur 3. Der kan det ses enda mer tydelig hvordan de to stoffer sammen vil påvirke målingene ved 230 og 280nm. A_{260}/A_{230} ratio burde generelt sett være større enn 1,5(87).



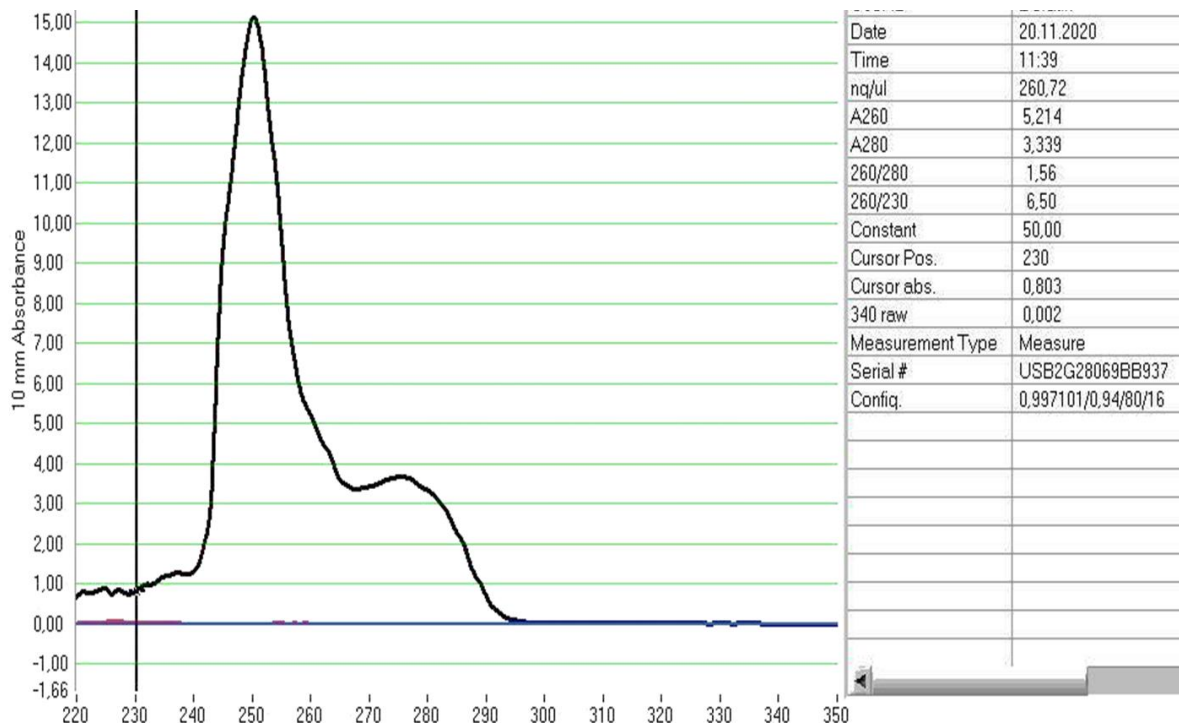
NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figur 2 spektrum av fenol oppdaget vha. UV-VIS spektrofotometri. Bunnen er ved 240nm og toppen er bred rund 270nm.



Figur 3 Fenol (rødt) og nukleinsyre (svart) spektra satt opp på hverandre. Hovedsakelig fenol absorberer mer lys under 235nm og over 270nm som vil påvirke begge to ratioene: A_{260}/A_{280}

og A_{260}/A_{280} , begge to vil gå ned hvis fenol er til stede. Spektrum av fenol ble tatt fra <https://webbook.nist.gov/chemistry> mens nukleinsyre spektrum kommer fra egne målinger.



Figur 4 Nanodrop spektrum av guanidine thiocyanate som viser at DNA ble feilaktig bestemt til å være 260ng/ul.

Eksempel på ett annet stoff som kan forårsake feilaktig måling av DNA er gaunidine thiocyanate som er brukt til å denaturere proteiner under RNA eller DNA ekstraksjoner. Et eksempel på feilaktig måling av DNA pga. gaunidine thiocyanate ble dokumentert på figur 4.

Generell oppsummering av noen utvalgte typiske kontaminanter ble presentert i tabell 1.

Tabell 1 Ulike kontaminanter som forandrer målinger av DNA spektrum i forhold til vanlig DNA 260/280 1,8 ratio og 260/230 2.0 ratio., samt DNA konsentrasjons forfalskning(87, 91).

Kontaminant	260/280	260/230	DNA kvantifisering
Proteiner	senker		Forhøyet
Fenol	senker	senker	
Lipopolysakkarider		senker	
EDTA med Mg ⁺ Ca ⁺		Forhøyer mer enn 3.0	
Silika fibre		senker	
RNA	2.2-2.3 (ren RNA)		Forhøyet

Praktisk innledning til Qubit Broad Range kit, neon bemerkninger til bruk av fluorometer.

Qubit er et instrument som kan brukes til å måle konsentrasjon av DNA. Et selektivt fargestoff binder seg bare til DNA og avgir lys som blir detektert av Qubit(93). På denne måten blir det målt DNA uten RNA. Den skal gi mer nøyaktige målinger av DNA konsentrasjon enn selve Nanodrop som detekterer DNA og RNA samtidig. Nanodrop målinger er også påvirket av kontaminanter som forhøyer DNA konsentrasjon.

Qubit er ganske sensitiv til temperatur. Jo høyere temperatur av løsningen desto lavere DNA konsentrasjon vil bli detektert. Oppvarming med hånd kan påvirke målingene. Derfor er det anbefalt å ikke holde rør i hendene eller la dem stå og romtemperere seg. Det er viktig at den blir brukt i 22-28°C. Ellers verdier blir enten lavere eller høyere. Prøvene med DNA skal stå minimum 2 minutter før måling. De kan stå slikt inntil 2 timer. På grunn av temperatur det å utføre gjentatte målinger i et rør vil heve rørets temperatur og detektert DNA konsentrasjon vil bli stadig lavere. Det er anbefalt å gjøre 30 sekund pause mellom sånne gjentatte målinger. Alle disse bemerkninger er dokumentert ved Qubit prosedyren(94).

Etter at bakgrunn til dette forsøket blir i metode kapittelet presentert ulike metoder og deres utførelse på en nærmere sikt. De blir delt opp i to deler, kjemiske metoder av DNA ekstraksjon og andre metoder som kolonner eller Chelax.

Metoder

Del en: forskning av ulike DNA isolering metoder

En generell innledning til metodeforskning

Det finnes mange protokoller som kan brukes til DNA isolering, det ble valg noen metoder som kunne vise seg nyttige og ble sett som unike.

Det ble gjennomført en rekke metoder, noen av dem blir bare litt oppsummert her siden til slutt spilte de ikke en viktig rolle på grunn av dårlige resultater.

Det ble forsøkt å finne metoder for DNA-isolasjon for å bruke med bakterier utsatt for ulike vev imiterende løsninger. Det antas at cellevegger til disse bakterier kan differensiere og noen kan bli lett å ekstrahere DNA fra, mens andre vanskelig.

Det ble valgt ut to modeller for å sammenlikne effektiviteten av de aktuelle metodene:

- a) Sammenlikne prøver med bakterier med ulik oppbygning av cellevegg (*M. phlei*, *S. pseudintermedius*, *E. coli*) siden vi antar at variasjon i celleveggen hos disse kan til en viss grad forekomme hos hypotetisk pleoforme bakterier.
- b) Sammenlikne prøver av *A. wadonis* dyrket med ulike betingelser som tidligere er vist å få frem ulike former av bakterien som kan minne om pleoforme bakterier. Siden det antas at disse formene hele tiden tilpasser seg

miljøet de befinner seg i ble prøvene etanol-fiksert før bruk (for å unngå at de skulle endre seg videre).

For å best mulig kunne sammenlikne effektivitet av forskjellige DNA ekstraksjonsmetoder ble det forsøkt i størst mulig grad å bruke like prøver til ulike metoder, for å slik kunne sammenlikne kvalitetsparametre på tvers av prøvene (konsentrasjon, 260/280, 260/230, osv.).

Ulike metoder er kort oppsummert i tabell 2 og bakterier som ble brukt med ulike metoder ble presentert i tabell 3.

Tabell 2 Kort oppsummering av ulike metoder som ble brukt i dette forsøket.

		Marmur	van Helde	Qiagen	Patel	Kotlowski	chelax-100
Lysis	høy temp. eller frys	nei	80°C drap	95°C	nei	-20°C	95°C
	lysozyme Rnase	ja	ja	ja	ja	nei	nei
	detergent	SDS	nei	ja	SDS	blanding	nei
	salt	NaClO4	Nei	nei	nei	nei	nei
	proteinase k	nei	ja (16 h)	ja	pronase B	nei	nei
Purification	kloroform	ja	ja	nei	ja	ja	nei
	fenol	nei	ja	nei	ja	ja	nei
	isopropanol/EtOH	ja	ja	ja	ja	ja	nei
	etanol vask	ja	ja	nei	nei	ja	nei
	silika kolonne	nei	nei	ja	nei	ja	nei

Tabell 3. Oversikt over prøver som ble brukt med ulike metoder i den første delen av forsøket som hensikt var å bli kjent med DNA ekstraksjon metoder som kunne isolere DNA fra bakterier med ulik cellevegg.

Marmur	Van Helden	Qiagen	Patel	Kotlowski	Chelax 100
<i>E. coli</i>	<i>M. phlei</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. phlei</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
<i>S. pseudintermedius</i>		<i>M. phlei</i>			<i>B. cereus</i>
					<i>N. asteroides</i>
					<i>C. psedotuberculosis</i>

Her litt midt imellom er det viktig å understreke at det ikke ble brukt RNase i det hele tatt under dette prosjektet. Dette kan kritiseres at kanskje RNA kan komme i veien for PCR til en viss grad ved at den knytter seg med DNA primere, men dette er alminnelig praksis ved DNA-ekstraksjoner utført i laben vår og har vist seg å fungere godt til diagnostiske PCR-reaksjoner. Fordelen med å ikke

fjerne RNA har vært at prosedyren blir enklere, at man mister litt mindre DNA på veien, og at det blir tidsbesparende.

Dyrkning av bakterier til DNA isolasjon.

M. phlei ble dyrket i BHI medium rundt 36 timer med 30°C for å ekstrahere DNA eller på blodagar.

S. psudintermedius ble dyrket i LB eller TSB medium cirka 5 timer i 37°C eller på blod agar.

E. coli ble dyrket 6 timer i LB medium ved 37°C eller på blod agar.

A. wodonis ble dyrket i 2,5 LB medium 37 timer ved 10°C eller på blod agar.

Prøveopparbeiding av bakterier

Det ble bestemt å veie våte bakterier som det isoleres DNA fra fordi i hvert rør var det ulike mengder av bakteriemassen og det ville påvirke DNA mengde til slutt. Så for å veie dem ble tomme rør veid på forhånd og etterpå ble det tilsatt medium med celler, sentrifugert, kastet vesken og veid på nytt og regnet ut vekten av celler. Dette ble en viktig og vanlig ting som ble gjentatt ved de viktigste prosedyrene.

Det er alltid slikt at metoder blir utført litt annerledes, tiden enzymer virker kan variere litt fra gang til gang og andre ting også. Sånne ulikheter kunne påvirke DNA isolasjon. På grunn av denne bekymringen ble det bestemt å kjøre alle bakterier eksponert for ulike betingelser sammen parallelt. Det ble tatt tre prøver av hver av åtte betingelser, til sammen 25 prøver med negativ kontroll.

Prøveopparbeiding ble gjort slikt at bakterier som ble drept og konserverte i 70-75% etanol ble alltid vasket i vann tre ganger før DNA isolasjon for å fjerne mest mulig etanol fra prøvene.

Hypotetisk pleoforme bakterier som var i gelatin var harde som stein og ble sentrifugert, kastet etanol, tilsatt vann, varmet til 55°C 5-10 min. og etterpå sentrifugert og kastet vesken også med 3 ganger vasking i vann. Sentrifugering var 3000g 10 minutter, men etter hvert ble det forandret til 4800g (maksimum av brukt sentrifuger) 5 minutter, det hjalp nemlig fordi pelleter flyttet ikke ut så mye når veskene ble kastet og tiden var kortere.

Merking av tabeller i resultat delen

Renheten til prøvene ble målt vha. Nanodrop og DNA-konsentrasjon vha. Qubit. Prøvene med mye urenheter dvs. hvor 260/280 og 260/230 var hhv. under 1,70 og 1,50(85) er merket med rødt i tabellene. Ren DNA og ren RNA har hhv. 1,8 og 2,2-2,3 260/280(85) mens nukleinsyre generelt har 260/230 ratio rundt 2.0-2,2(87).

Qiagen DNA isolering fra bakterie metode som eksempel på en kit basert metode

En kan spørre seg om hvorfor noen skal bruke ulike tidskrevende metoder som tar i bruk farlige kjemikalier når det allerede finnes kommersielle kit som nyter stor popularitet og som ikke er så tidskrevende å gjennomføre. For å sammenlikne resultatene av DNA-ekstraksjon utført ved eldre metoder mot dagens kit-baserte metodikk inkluderte vi Qiagen QIAamp DNA Mini Kit fordi det er ganske kjent og brukes i laben vår hele tiden. Prosedyren er publisert på Qiagen sine sider (18). Lab prosedyren ble også tatt med i vedlegg som heter P-BL70.

Prosedyren ble gjennomført med modifikasjoner som er laget spesielt for grampositive og vanskelige å lyse bakterier fra side 55 og side 56 av Qiagen pdf(18). Spesielt prosedyren for gram positive og vanskelige å lyse bakterier var at det ble brukt 20mg/ul lysozyme, prøver med bakterier etter tilsetning av proteinase K og buffer AL og varming 30 min med 56°C var i tillegg oppvarmet 15 min 95°C etter det. Det ble isolert DNA fra *S. pseudintermedius* og *M. phlei*. Det ble utnyttet QiaCube maskin som beskrevet i P-BL70 og som er i vedlegg.

Kjemisk ekstraksjons metoder

Kjemisk ekstraksjons metoder er metoder som bruker faseekstraksjon, ulike kjemikalier som kloroform eller fenol som lager en fase utenfor vannfasen.

Det ble brukt i dette prosjektet ulike kjemisk ekstraksjon metoder noen ble modifisert. Det var tre metoder som tilhørte den gruppen Marmur, van Helden et al. og Patel et al. Nå skal det beskrives fra den første til den siste.

Marmur som en grunnleggende metode.

Marmur(51) har beskrevet sin metode ganske godt, han har tatt i bruk SDS, men beskriver også bruk av lysozym som en mulig prosedyre for en del sensitive til lysozym bakterier. I denne oppgaven har metoden blitt utført med bruk av lysozym. Etter det tilsettes det sodium perklorate som hjelper å felle ut proteiner og denaturere proteiner så følger det risting med kloroform for 30 min, 5min sentrifugering med 5000-10000g styrke for at proteiner blir presset mot kloroform laget og danner pent protein lag i midten av fasene. Vannfasen ble pipettert ut og det ble gjennomført EtOH utfelling i rom temperatur med to ganger så mye volum av EtOH enn det er vannfasen. Rørene er kort sentrifugert (Marmur sier ikke hvor sterkt) og pellet løst i løsning og tilsatt kloroform andre gang, ristet 15 min sammen. Vannfasen blir pipettert ut og alkohol utfelling gjentatt andre gang og pellet er løst i en løsning så blir tredje utfelling av DNA denne gangen med tilsetning av sodium acetate og ved bruk av 0,54 volum isopropanol, rørene blir sentrifugert (usikkert med hvilken styrke) og isopropanol fjernet. DNA ble vasket med 70% alkohol og sentrifugert. Etter det blir DNA løst i en løsning.

På denne måten ble det gjennomført denne metoden i dette prosjektet. Første gang beskrevet her etter tre alkohol utfellinger, ble det brukt tre ulike sentrifugerings styrker. Etter at alkohol

utfellinger ble undersøkt nærmere ble det bestemt å sentrifugere 1500g 30 min etter hver utfelling og etter vasking sentrifugering med 1500g 15 minutter.

Den nøyaktige sentrifugeringsstyrken ved alkoholutfellingen var ikke spesifisert i Marmurs metodebeskrivelse, noe som skapte problemer ved den første gjennomføringen av metoden. Derfor ble det bestemt å undersøke nærmere.

Sentrifugeringshastighet ved utfelling av DNA vs. DNA mengde

For å undersøke hvordan DNA-mengden varierer med ulik sentrifugeringsstyrke i sentrifugeringstrinn for etanolutfelling ved 4°C og romtemperatur DNA ble følgende forsøk gjennomført. Det ble tatt i bruk sentrifugering med fart: 15000g, 13000g, 8000g, 5000g, 3500g og 1500g, alle i 30 min. Det ble tatt kaldt sentrifugering siden den er brukt i andre metoder, bare for å sammenlikne og undersøke bredere.

1500g er ikke så høy verdi, men siden Marmur skrev som om det ikke var særlig krevende, så ble det prøvd en slik lav hastighet. Samtidig skilte utførelsen seg fra Marmur, da vi valgte å øke lengden av det første sentrifugeringstrinnet til 30 min.

DNA ble alltid vasket med 70% EtOH og sentrifugert andre gang i 15 min med den samme styrken som første gang. Kald DNA-utfelling bestod av 15 min kjøling av prøver på is i tillegg før første sentrifugering. Det ble gjennomført som i prosedyren fra Seedinglabs(95) fordi den prosedyren ble funnet til å beskrive det grundigere enn andre kjente prosedyrer, med en forandring, pH av salt var 5.5 istedenfor 5.2 (dvs. til utfelling ble det brukt salt som i en annen metode: van Helden et al(57).

Van Helden et al. kloroform fenol DNA ekstraksjons metoden.

Den andre metoden som ble prøvd å bruke var van Helden et al metoden. Den ble utført med ulike varianter som blir beskrevet her.

Etter at rundt 100 ul pelleter med bakterier ble vasket i PBS ble bakterier drept ved 80°C oppvarming 1 time. Dette trinn ble ikke tatt med fordi van Helden ekstraherte DNA fra *M. tuberculosis* var det begrunnet å drepe dem, mens her *M. phlei* var ikke like farlig. Metal kuler ble brukt nå for å unngå at cellene holder seg i aggregater. Det ble tilsatt ganske mye fordi 400ul 50mg/ml med lysozym til hver rør, inkubert 2 timer i 37°C. Det ble tilsatt 10X proteinase K buffer og også ganske mye fordi 150ul av 10mg/ml proteinase K. Her er det viktig å nevne en feil kilde: proteinase K buffer burde ha 5% SDS, men det ble glemt å tilsette. Dette ble oppdaget ganske sent. Prøvene ble inkubert ved 45°C 16 timer. Det ble tilsatt fenolkloroform og prøvene ble snudd opp ned flere ganger i løpet av 30 min. Etter 20min sentrifugering med 3000g styrken ble vannfasen pipettert ut og det ble tilsatt kloroform blandet bare litt og på nytt sentrifugert 20 min 3000g. Vannfasen ble tatt videre og isopropanol utfelling ble gjort ved å tilsette først 0,1volum Natrium Acetat og 1:1 volum isopropanol. Prøvene ble blandet forsiktig og inkubert 30 min i -20°C. Derfor kan det kalles kaldt DNA alkohol utfelling. Prøver ble sentrifugert 30 min 3000g. Pellet skulle lufttørkes før tilsetning av TE buffer.

Denne metoden ble modifisert på ulike måter, det ble laget mod. Van Helden, og besparende van Helden. Ulikheter blir vist i tabell 4. Besparende versjon av van Helden likner på vanlig versjon, men rekkefølgen er ulikt: først er proteinase K og etter den lysozym dvs omvendt enn i vanlig. Glass kuler ble ikke brukt med van Helden på hypotetisk pleoforme *A. wodonis* fordi disse bakterier løste seg veldig godt i buffer med tilsatt lysozym sånn av alle så ut som blind prøver det var ikke synlige celle aggregater.

Tabell 4 sammenlikning av ulike varianter van Helden.

Deler fra prosedyren	Van Helden brukt her	Mod. Van Helden	Besparende van Helden
Drap av bakterier 80°C	Nei	Nei	Nei
Mekaniske kuler	Ja	Nei	Nei
Lysozym x 1	Ja	Ja	Ja
Proteinase K x 1	Ja	Ja	Ja
Lysozym x 2	Nei	Ja	Nei
Proteinase k x 2	Nei	Ja	Nei

Mod. van Helden og besparende versjon

Ved utføring av mod. van Helden ble det ikke brukt kuler som skulle splitte opp aggregater av celler, i stedet for ble virketiden for enzymer forlenget, noe som bidro til at celleaggregater løste seg av seg selv under stadige svake rotasjoner under den lange tiden med enzymatisk virkning.

Enzymer ble brukt som vanlig i begynnelsen, men etter proteinase k-trinnet ble løsningsene varmet opp til ca. 78°C i 30 min i forsøk på å deaktivere proteinase K slik at den ikke ødelegger så mye lysozym. Lysozym ble deretter brukt en gang til, og proteinase k på nytt til slutt. Prøvene ble liggende horisontalt i stadig bevegelse 90 rpm ca 16 h under proteinase K virkning. Kort sagt ble det brukt lysozyme, proteinase K, lysozyme og proteinase K (LPLP).

Den siste van Helden versjon som ble laget var besparende versjon hvor enzymer ble ikke gjentatt, men tilført omvendt dvs. først proteinase K, med deaktiverende oppvarming til 78°C etter den og så lysozem.

Modifisert van Helden ble utført på vanlig dyrket *M. phlei* men også for eksempel *A. wodonis* utsatt for hesteblood serum. Den sist nevnte utførelsen ikke sammenligner ulike betegnelser men bare tar seg av en type betegnelse og derfor kan bli godt plassert i første delen av prosjektet dvs der hvor ulike metoder av DNA ekstraksjon undersøkes.

Patel et al kjemisk ekstraksjon metode og en viktig feilkilde

Parallelt ble det gjennomført en tredje metode som ble laget av Patel et al.(61) En fenol-kloroform DNA ekstraksjonsmetode som utnyttet to andre typer lytiske enzymer enn proteinase K.

Den første delen (dvs. blanding av celler med eter og kloroform) ble ikke tatt med siden blandingen av fasene skulle gjentas inntil den organiske fasen var klar (blandet med *M phlei* var den hele tiden klar), i tillegg ble det sett på som en måte å drepe *M. tuberculosis* på i den opprinnelige protokollen. Celler ble inkubert 4 timer 37°C med Nagraze (til det utgjorde 10mg/ml i prøven) etter det lysozym (50 mg/ml) ble tilsatt og prøver ble inkubert 4 timer igjen ved 50°C. Det ble tilsatt SDS til 1% volum av prøven og pronase B (3mg/ml), inkubert 36timer 37°C med tilsetning av flere doser pronase B hver 12 timer. DNA var rensert vha hjelp av blanding med TEN mettet fenol og med kloroform. DNA var felt ut vha. tilsatt NaCl til 0,3M og 2,5 volum etanol. Etter overnatting i -20°C med etanol ble prøvene sentrifugert og pellet løst i TE buffer.

Patel et al. er en viktig metode i dette prosjektet fordi det ble oppdaget en betydelig feil. Ellers har den ikke stor betydning her videre. Det ble oppdaget fargerike små dråper i bunnen av rør som tydet på at kloroform med enzym var pipettert dit.

Siste del av DNA isolasjon etter alkohol utfelling

Det er fint å lage en bemerkning her fordi etter modifisert van Helden ble den siste delen etter alkohol utfellingen forandret og alkohol utfelling er en viktig del av kjemisk DNA ekstraksjon metode generelt.

Det er verd å nevne nemlig selve måten siste del av DNA isolasjon ble utført. Det var et problem med at alkohol ikke ville dampe så godt fra røret etter alkoholutfellingen, mens pelleten av DNA tørket. Noen ganger lenge var væsken inni uten at alkohol dampet helt. Etter hvert ble det lagt stående overnatt med rørene åpne og på den måten alt dampet ut. En gang, til og med, etter slikt var om morgenen væsken inni. Det syntes viktig som også er vist på video(95) at det er riktig å banke forsiktig røret mot en papir servet sånn at ikke for mye væske blir stående der.

Dette at pelleten tørket så lenge skapte i mange tilfeller problemer. DNA pelleten ville ikke løse seg godt til og med når den ble varmet opp, og sånn uløst DNA var vanskelig å måle med Nanodrop eller Qubit fordi det var lett at store stykker uløst DNA kunne suges inn til måling og de kanskje forhøyet DNA verdier.

På grunn av disse uløste DNA klumper ble det bestemt å slutte å tørke DNA overnatt. Hypotetisk Pleoforme H var den siste metoden utført med overnatt tørking.

Ny måte å gjøre det på var at til slutt ble rørene banket forsiktig mot papir etterpå ble de lagt på skrå mot papir opp ned ca. 5 minutter og banket forsiktig på slutten av mot papiret sånn at dråpen som var ved åpningen kunne fjernes. Løsning av DNA ble også beskrevet av Sambrook & Russell(84) i del A8.13.

Det er viktig å nevne til slutt at også vasking i 70% EtOH er det bra å utføre forsiktig slik at pelleten ikke blir vasket ut, her det ble utført sånt at rører var holdt nesten horisontalt mens væsken ble pipettert inni langsomt og versomt.

Andre metoder som ble brukt i dette forsøket

Chelax-100

Det ble utført en veldig enkelt, kort og billig (og derfor ganske fin) metode, Chelax-100. Metoden ble gjennomført som beskrevet av Jenkins og Maddock (96). Det ble laget 10 vekt% Chelax-vann blanding. 200ul Chelax-vann ble pipettert til hver eppendorf rør og det ble tilsatt bakterieceller vha. podeøser. Blandingen ble varmet til 95°C 15 min og etter det sentrifugert 15000 rpm 5 min. Vannfasen ble tatt vare på mens pellet med gammel rør ble kastet vekk.

Når det pipetteres Chelax til nye eppendorfs rør er det viktig å blande den ellers vil kulene synke ned og ikke mange lar seg pipettere ut. Ved å blande dem det er lettere å ta dem inn i pipettespissen, dette nevner også Jenkins og Maddock. I dette forsøket ble det brukt Chelax 100 på *S. pseudintermedius*, *N. asteroides*, *C. pseudotuberculosis* og *B. cereus*.

Kotlowski et al.

En annen metode som ble brukt midt imellom var Kotlowski sin metode. Denne var viktig og verd å bruke videre fordi den var gjennomført på en vanskelig bakterie fra *Mycobacterium* slekten og fra miljøprøver som hadde lite volum.

Metoden ble gjennomført som beskrevet i artikkelen (60) med noen ulikheter: Det ble brukt fenol med pH 8, og silika-gel (Qiagen-kolonner) istedenfor silika cellulose-kolonner. Podeøse med *M. phlei* ble tilsatt til eppendorf rør med 150ul lyserings buffer (guanidinium thicyanate, sarcosyl, SDS, triton X 100), 200ul fenol mettet med Tris pH 6.9 og 200ul kloroform. Prøver ble inkubert -20°C 1time, sentrifugert 10000g 20 min ved 4°C og pipettert ut vannfasen som ble blandet med ¼ volum isopropanol og tilsatt til silika kolonne. Løsninger ville ikke komme seg gjennom kolonnemembranen bare ved å stå stille så de ble sentrifugert kort for å trekke tvers gjennom kolonnene ikke som hos Kotlowski et al. Membraner var vasket med 300ul etanol og igjen den ofte ville ikke komme seg gjennom membranen så ble sentrifugert kort. DNA var fjernet fra kolonnen med varm 75°C Te buffer felt ut ved to volumer etanol og løst i TE buffer.

Etter at en rekke metoder ble gjennomført valgte vi en bakterie *A. wodanis* og dyrket den i ulike betingelser for å se hvordan ekstrahert DNA mengde vil variere som kan bety at også bakteriell cellevegg differensierer.

Del to: Isolasjon av DNA fra hypotetisk pleoforme bakterier

Innledning til del to

Det ble prøvd å påvirke bakterier med ulike medier og undersøkt om de vil ha innflytelse på bakterier. Derfor ble det brukt en gramnegativ bakterie som ikke er særlig vanskelig å isolere DNA fra, *A. wodanis*. Det var den tanken bak at hvis noe påvirker den da blir prøvene fra ulike løsninger annerledes sammenlignet med hverandre og DNA blir ikke likt isolert, dvs. noen kan bli vanskeligere å isolere enn andre. *A. wodanis* ble dyrket i 2,5% LB og var i log fasen når de ble tatt ut noen timer før stasjonær fasen, dette ble bestemt ved hjelp av vekst kurvene publisert av Söderberg et al.(97).

Hypotetisk pleoforme bakterier: et forsøk på å påvirke bakterier ved hjelp av ulike medier.

Det ble laget en rekke med ulike medier som er allerede kjent og brukt i bakterielabene våre og som det prøves å påvirke bakterier med.

Såne medier skal lages slikt at de imiterer ulike miljøer for eksempel ulike celler, væsker i en organisme eller fysiologisk vann uten næring og medier som ligner død fisk. Noen ganger ble bakterier prøvd å stimulere ved å bruke to ulike medier på rad. Her ble det brukt *A. wodanis* bakterier.

Det ble laget 8 ulike medieforhold, A-H:

A) Bakterier ble lagt i 0,9% NaCl vann inkubert 1-2 timer og flyttet til 0,9% LB mediet med forhold 1:4 (vann:LB).

B) Bakterier ble lagt i 0,9% NaCl vann inkubert 1-2 timer og flyttet til Leibowitz medium med forhold 1:4 (vann:Leibowitz)

C) Bakterier ble lagt i Leibowitz, inkubert 1-2 timer og flyttet til gelatin løsning (gelatin inneholdte ¼del gelatin ¾deler vann med 1% glukose) med forhold 1:4 (Leibowitz:gelatin).

D) Bakterier ble lagt i hesteblood serum, inkubert 1-2 timer og flyttet til BHI+1% glukose medium med forhold 1:4 (hesteblood serum: BHI).

E) Bakterier ble lagt i vanlig mediet som er vanlig brukt til å dyrke dem (en type referanse).

Når alle betingelser A-E ble utført bakteriene ble inkubert i mikroklima boks med løs kork på. Lengden tilsvarte tiden *A. wadonis* pleide å være i log fasen dvs. her mindre enn 37 timer ved 10°C.

F) Bakterier ble lagt i 0,9NaCl vann.

G) Bakterier ble lagt i Leibowitz.

H) Bakterier ble lagt i hesteblood serum.

F, G, H ble ikke inkubert lenge, bare kanskje noen minutter sammen med sentrifugering var de i de veskene. Gelatin måtte bli varmet opp for å pipettere og blande, men det var vanskelig å oppnå 1:4 ratio når det gjaldt C.

For å bevare bakterier ble de sentrifugert, vesken kastet vekk og pelleter konserverte i 70% EtOH. Prøver med gelatin var stive og derfor måtte varmes før blanding med etanol, det gjerne ble brukt varm etanol. Denne prøven myknet litt under oppvarming, men på grunn av etanol, som gjør at proteiner feller ut, stivnet på nytt i kjøleskapet og ble harde.

Marmor alle hypotetisk pleoforme bakterier

Til tross for at det første forsøket ble utført bare på bakterier dyrket i hesteblood serum så oppstod det en tvil på at ved ulike forsøk vil ikke alle forholdene bli like. Det er alltid slikt at metoder blir utført litt annerledes, tiden enzymer virker kan variere litt fra gang til gang og andre ting også. Sånne ulikheter kunne påvirke DNA isolasjon.

De åtte prøvene ble kjørt i triplikater, i tillegg ble en negativ kontroll inkludert. Forsøket ble gjentatt tre ganger. Etter blanding i kloroform prøvene ble sentrifugert med rundt 4800g 10 min. Generelt sett alt ble gjennomført som beskrevet av Marmor. Etter utfelling av DNA i alkohol sentrifugering 1500g 30 min (to første gangene) eller 15 min (tredje gang) ble brukt som egentlig var mer logisk siden lang sentrifugering brukes ved kald utfelling og Marmor skrev om kort sentrifugering.

Det som viste seg mest betydelig i disse tre forsøk var ulikheten av mengden vannfase pipettert fra kloroform: første gang fra vannfasen ble det pipettert mest mulig på en grådig måte, men andre og tredje gang mer forsiktig sånn at det ble etterlatt mer vannfasen ved kloroform for å ikke la proteiner (kloroform) bli med. Andre og tredje gang ble det pipettert 1700ul fra rundt 2200ul og fra 1000ul rundt 700ul. Pipettering av vannfasen skaper tilfeldighet fordi ikke alltid er det mulig å pipettere likt fordi plutselig begynner proteiner å bli suget med og det avbrytes pipettering.

Modifisert van Helden et al. utført på hypotetisk pleoforme bakterier

På denne tiden ble det oppdaget en viktig feil kilde. Det ble kjøpt ny fenolkloroform isoamyl alkohol. Den nye hadde gjennomsiktig farge sammen med bufferen. Den gamle som ble brukt inntil nå og andre fenoler hadde rosa farger. De var ganske gamle noen ti år og oppbevart i romtemperatur istedenfor i kjøleskap. Fenol kan nemlig oksidere og miste delvis sin kraft. Inntil nå ble det feilaktig trodd at det var en pH buffer som hadde den rosa fargen. Gammel fenol ble brukt i van Helden et al. og Kotlowski et al. sine metoder. Patel et al. ble det brukt en ny kristallfenol som ble mettet med en buffer. Løsninger er ganske viktige og bør tas vare på. Chomczynski for eksempel blander kloroform rett før bruk med isoamyl alk.(82), men i dette forsøket ble det ikke særlig mye undersøkt hvor stor betydning har det at reagenter er gamle allikevel er det godt å nevne at dette ikke trenger å være en ubetydelig sak og særlig ikke var den rosa fenol ubetydelig, men tvert imot.

Det ble gjennomført modifisert van Helden på hypotetisk pleoforme bakterier. Prøveopparbeiding av bakterier i EtOH ble gjennomført lik før i Marmur forsøkene. Pelleter veide rundt 100-150 ug.

Det ble oppdaget en annen viktig feil kilde. Det ble glemt å tilsette SDS til en buffer. Det er betydelig feil fordi *Mycobacterier* er dekket av strukturer med lange fettsyrer så detergent er ikke noe man burde glemme. Den gangen ble det heller ikke brukt SDS, men ble det bestemt at det skal gjøres neste gang.

Under den andre 16 timer blandingen med proteinase K ble det en lekkasje: E1, og H3 hadde 6,5mL mens B3 5 mL væske samtidig alle andre hadde 7,5 mL. Det ble pipettert 7/10 del av vannfasen fra fenolkloroformisoamyl alk. og det samme fra kloroform isoamyl alk.etterpå. DNA pellet ble løst i 1000ul TE og var ikke synlig.

Van Helden et al. utført på hypotetisk pleoforme bakterier

Det ble utført van Helden et al. på hypotetisk pleomorfe bakterier, denne gangen med SDS i bufferen, men som før uten drap av bakterier og uten bruk av kuller siden det ikke var noen celle aggregater til å se. Cellene løste seg godt i væsken etter tilsetning av lyzosyme. Det ble etterlatt 1mL og 1,5 ml vannfasen sammen med hhv. fenolkloroform isoamyl alk. og kloroform isoamyl alk., resten ble pipettert ut og tatt videre. Etter alkohol utfelling av DNA ble DNA løst i 1000ul TE. Pelleter ble usynlige etter en liten blanding.

Resultater

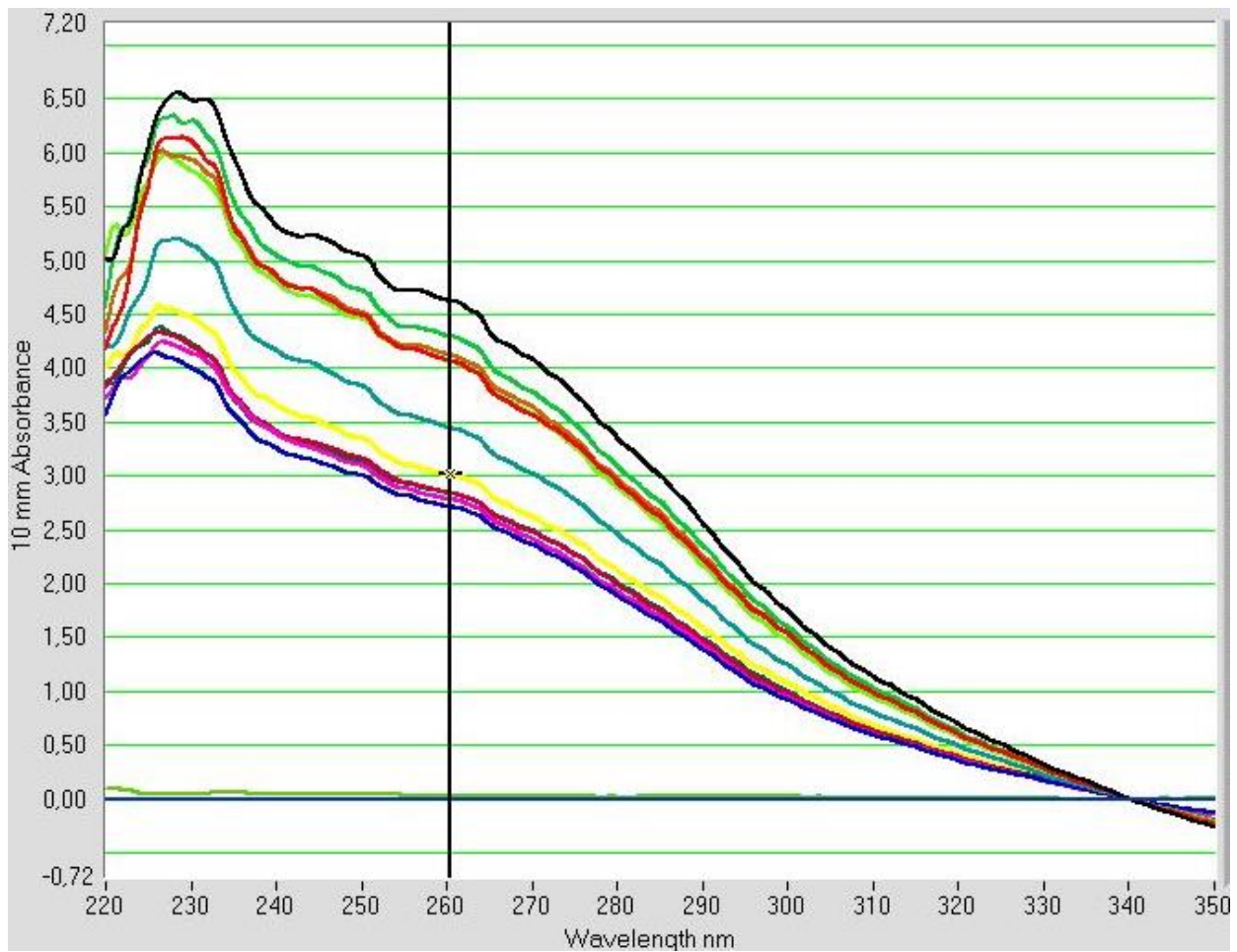
Del 1 Resultater etter undersøkelse av effekt av ulike DNA -solasjonsmetoder.

Qiagen DNA -it isoleringsmetode utført på *S. pseudintermedius* og *M. phlei*.

Nanodrop-målinger av nukleinsyre fra *S. pseudintermedius* viste ganske bra konsentrasjoner av nukleinsyrer. Likevel var det ikke troverdig på grunn av også ganske stor grad av forurensning, ingen av prøvene hadde 260/280 større enn 1,7 heller ingen 260/280 var større enn 1,5. Ganske like verdier her som om bare en prøve ble målt tyder på en systematisk forurensning liggende i prøvene. Forurensninger blir avspeilet på spektra som ikke ligner særlig mye på DNA spektrum som ble vist før på figur 3. Alt dette ble dokumentert i tabell 5 og på figur 5.

Tabell 5 Nanodrop-målinger av nukleinsyrer etter Qiagen-kit-isolasjon av DNA fra *S. pseudintermedius*.

Prøven	Nukleinsyre konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	231,34	1,38	0,71
2	203,72	1,38	0,67
3	214,72	1,39	0,68
4	206,44	1,39	0,70
5	203,22	1,40	0,70
6	172,56	1,40	0,67
7	135,75	1,44	0,68
8	139,09	1,44	0,67
9	142,00	1,42	0,68
10	142,02	1,41	0,67
11	150,88	1,42	0,67
Blind prøven	1,30	1,37	0,57



Figur 5 Spektra målt med Nanodrop etter bruk av Qiagen DNA-isolasjonskit på DNA isolert fra *S. pseudintermedius*.

Det ble undersøkt mengde DNA per gram tørre celler av *S. pseudintermedius* og det viste seg å være gjennomsnittlig lik $0,61 \pm 0,21$ mg DNA/g celler. Alt dette er oppsummert i tabellen 6. Det er verd å gjenta at det er tørre celler rett fra petriskål ikke fra buljongen.

Tabell 6 Qubit målinger av DNA ekstrahert fra *S. pseudintermedius* vha. Qiagen kit.

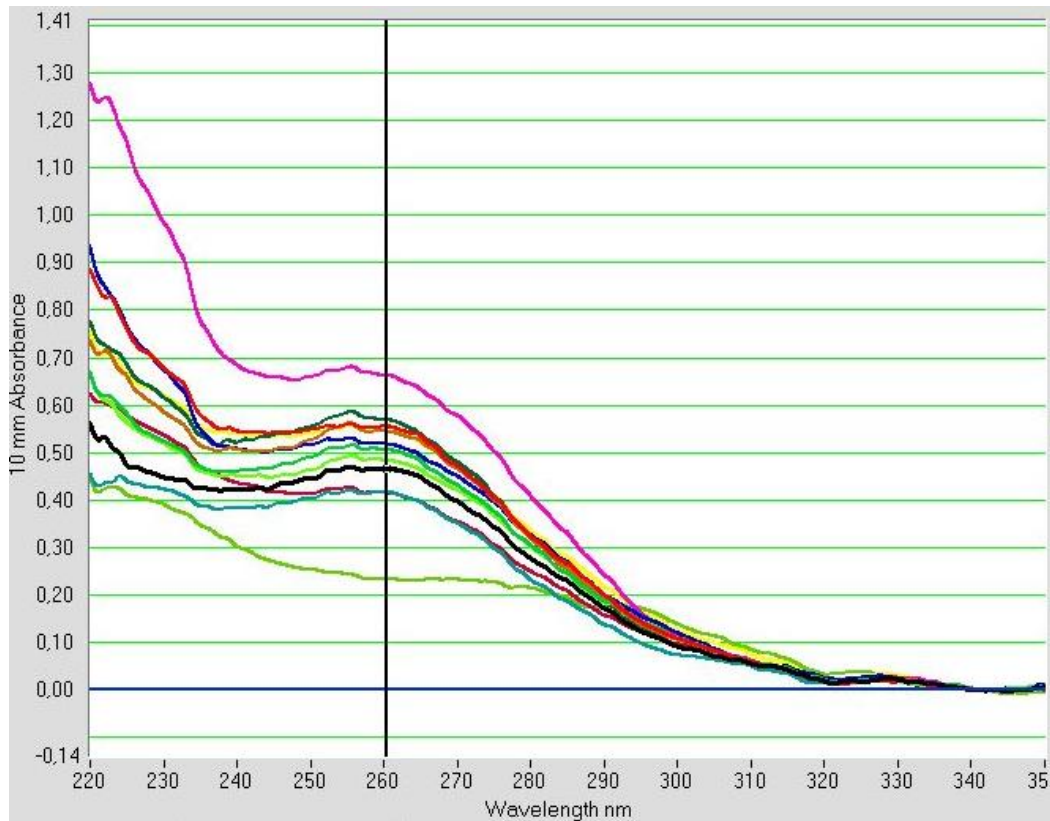
Prøve	Konsentrasjon(ng/ul)	DNA utbytte (mg DNA/g våte celler)	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g celler)
1	23,4	0,82	0,61±0,21
2	18,9	1,06	
3	19,3	0,79	
4	19,3	0,68	
5	16,0	0,45	
6	10,3	0,56	
7	11,9	0,49	
8	11,5	0,55	
9	14,4	0,44	
10	15,3	0,41	

11	16,9	0,45	
Blind prøven	Ute for rekkevidde (For lav)		

Det ble gjennomført Qiagen-kit-isoleringsmetode for andre gang, men nå med *M. phlei*. Det var ikke så mye nukleinsyre som ble detektert som under Qiagen-ekstraksjon av DNA fra *S. pseudintermedius*, men samtidig var det relativt mindre urenheter som om *M. phlei* ikke gikk i stykker så mye på den måten som *S. pseudintermedius* og sammensetningen av prøver var annerledes og mye mindre forurensning her. Allikevel var prøvene ganske urene her også; 4 av 11 prøver kan godkjennes som rene mht. 260/280 ratio og ingen av rørene hadde god 260/230 ratio dvs. over 1.5. Blindprøven viste ganske høy verdi dvs 11,61ng/ul. Alle disse data ble oppsummert i tabellen 7 og på figur 6.

Tabell 7 Nanodrop målinger av nukleinsyre etter Qiagen-kit DNA-ekstraksjon av *M. phlei*, rød farge betyr at prøvene er mye forurenset.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	23,23	1,68	1,04
2	27,68	1,72	0,81
3	25,25	1,66	0,97
4	27,18	1,71	0,93
5	24,17	1,60	0,93
6	20,72	1,80	0,98
7	25,83	1,59	0,76
8	33,07	1,62	0,67
9	20,69	1,67	0,77
10	28,44	1,78	0,92
11	27,33	1,63	0,88
Blind prøven	11,61	1,09	0,60



Figur 6 Nanodrop-spektra av prøver etter *Qiagen-kit* nukleidsyre ekstraksjon utført på *M. phlei*.

DNA fra *M. phlei* ble målt vha. Qubit og det viste seg at gjennomsnittlig var det $0,03 \pm 0,01$ mg DNA/g celler. Blindprøven hadde ikke en detekterbar DNA forurensning. Data ble oppsummert i tabellen 8.

Tabell 8 Qubit DNA-målinger etter ekstraksjon vha. *Qiagen kit* utført på *M. phlei* samt beregnet gjennomsnitt og standardavvik.

Prøve	DNA konsentrasjon (ng/ul)	DNA utbytte (mg DNA/g våte celler)	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g celler)
1	2,00	0,04	0,03±0,01
2	2,14	0,03	
3	2,42	0,05	
4	2,86	0,05	
5	2,08	0,04	
6	1,21	0,02	
7	1,46	0,02	
8	1,39	0,01	
9	1,79	0,02	
10	1,32	0,01	
11	2,50	0,04	
Blind prøven	Ute for rekkevidde (For lav)		

Marmur #1 utført på *E. coli* og *S. pseudintermedius*

Det som skapte problemer ved Marmur proseduren, var ikke spesifisert nøyaktig sentrifugering styrken ved alkohol utfelling. Marmur brukte ett galsstav og på den måten samlet DNA. Alternativ metode var å sentrifugere prøvene, men det ble bare skrevet at det kan gjøres «kort sentrifugering» og det ble litt usikkert hvor kort og med hvilken styrke. Denne usikkerhet uttrykket seg på en elendig måte når denne Marmur#1 tok sted ved at ulike styrker og tidslengder ved hver av de tre alkohol utfellingene som ble gjennomført ble gjort istedenfor å velge en bestemt.

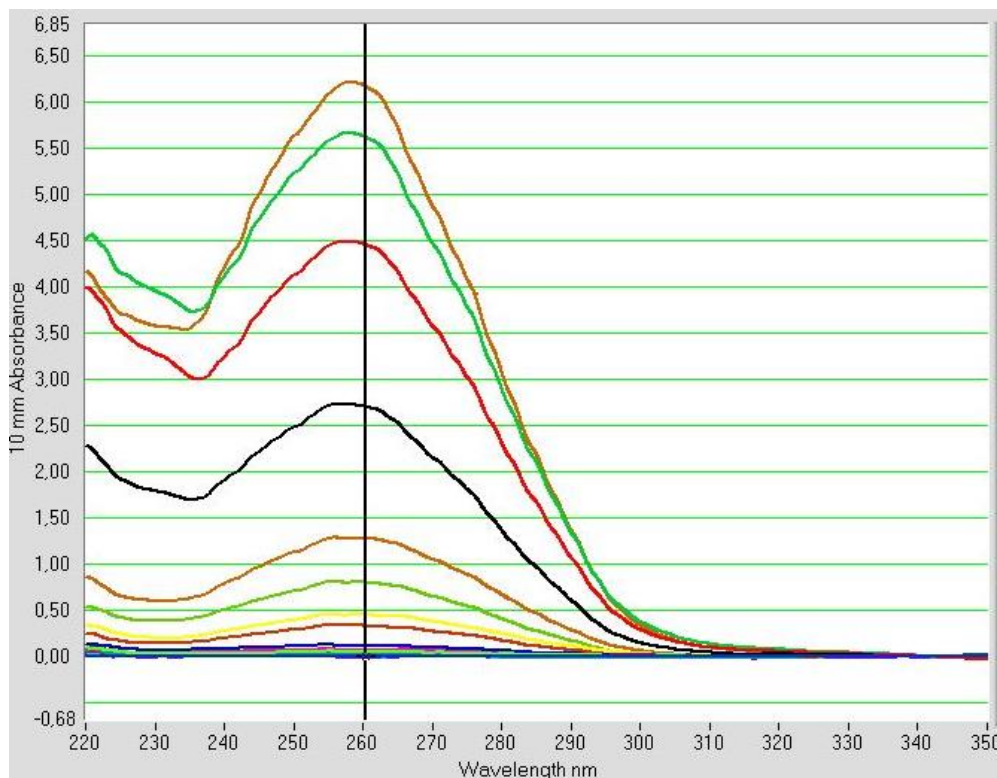
Prøver etter DNA-ekstraksjon fra *E. coli* (1-8) og *S. pseudintermedius* (9-14) viser seg ganske varierende når det gjelder DNA konsentrasjoner.

Nanodrop-målinger viser at nukleinsyrer generelt sett er proteinfri ved at 260/280-verdier er mellom 1,8 og 2 (tabell 9). Verdiene nærmere 2 tyder på mer RNA og de nærmere 1,8 tyder på at det forekommer mer DNA. Generelt sett er det mer RNA enn DNA i prøvene.

Tabell 9 Nanodrop-målinger av nukleinsyrer etter første Marmur-forsøket utført på *E. coli* (1-8) og *S. pseudintermedius* (9-14).

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	135,36	1,98	1,52
2	223,37	1,93	1,36
3	281,84	1,94	1,43
4	309,44	2,00	1,73
5	2,11	2,15	1,63
6	0,91	-1,34	-2,03
7	5,18	2,03	1,63
8	3,02	2,20	3,57
9	1,54	1,59	4,59
10	1,88	1,56	1,74
11	22,14	1,83	2,27
12	39,79	1,99	2,09
13	16,29	1,99	2,36
14	63,88	1,92	2,14
Blind prøven 1	-0,53	0,66	1,22
Blind prøven 2	-0,01	0,04	-0,11

Figur 7 viser spektra etter ekstraksjon av DNA fra *E. coli* og *S. pseudintermedius* vha. Marmur-metoden målt ved hjelp av Nanodrop. Kurvene ser ikke dårlige ut unntatt kanskje de laveste som ikke sees så godt.



Figur 7 Spektra detektert ved hjelp av Nanodrop etter Marmur-DNA-ekstraksjonsmetoden utført på *E. coli* og *S. pseudintermedius*.

Qubit-målingene viste at DNA varierte mellom 0,0006 og 0,1mg DNA per gram våte celler *E. coli* og mellom 0,0004 og 0,1 mg DNA per gram våte celler av *S. pseudintermedius*. Alle disse verdier ble samlet i tabell 10.

Tabell 10 Qubit-verdier av DNA målt etter DNA-ekstraksjon fra *E. coli* og *S. pseudintermedius* ved hjelp av Marmur-metoden.

prøve	Konsentrasjon av DNA (ng/ul)	DNA utbytte (mg DNA/g våte celler)	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g celler)
1 E. coli	34.0	0.04	0,038±0,041
2 E. coli	53.4	0.06	
3 E. coli	85.2	0.1	
4 E. coli	67.8	0.09	
5 E. coli	1.35	0.002	
6 E. coli	0.506	0.0006	
7 E. coli	2.62	0.003	
8 E. coli	3.58	0.005	
9 S. pseudintermedius	Out of range	-----	0,036±0,038
10 S. pseudintermedius	0.314	0.0004	
11 S. pseudintermedius	13.5	0.02	
12 S. pseudintermedius	124	0.1	
13 S. pseudintermedius	16.2	0.02	
14 S. pseudintermedius	34.4	0.04	

15 Neg. Kontr.	Out of range	-----	
16 Neg. Kontr.	Out of range	-----	

Det ble beregnet gjennomsnitt og standardavvik for DNA-utbytte fra begge bakterier målt ved Qubit. DNA-utbytte fra *E. coli* og *S. pseudintermedius* var gjennomsnittlig hhv. $0,038 \pm 0,041$ og $0,036 \pm 0,038$ mg DNA/g våte celler.

Alkohol-utfelling vs sentrifugeringsfart

Mange prøver fra alkoholutfellingsdelen i protokollen hadde lave verdier for DNA-utbytte. I tillegg varierte verdiene mye siden det var mange prøver som hadde lave verdier i tillegg til at noen hadde høye verdier. Dette tydet på tilfeldige feil og det ble bestemt å undersøke alkoholutfellingsdelen nærmere fordi det er lettest å gjøre tilfeldige feil under alkoholutfellingen. Derfor ble det valgt å undersøke hvordan sentrifugeringsfart påvirker alkoholutfelling av DNA ved romtemperatur og ved kald utfelling.

Etanolutfelling uten is gav størst utbytte ved sentrifugering ved 1500g, samtidig ga sentrifugering ved 3500g og 5000g akseptable verdier. Imidlertid forekom det verdier over 1 som dro opp gjennomsnittet. Dette er oppsummert i tabell 11.

Tabell 11. Etanol-utfelling uten is med varierende sentrifugering og dens innflytelse på DNA mengde. Verdier over 1 ble merket med rosa farge.

Fart (g)	Andel DNA etter/før utfelling	Gjennomsnitt	Standardavvik
1500	0.76	0.89	0,08
	0.96		
	0.88		
	0.93		
	0.92		
3500	0.64	0.78	0,19
	0.67		
	0.86		
	1.08		
	0.66		
5000	0.71	0.85	0,60
	0.77		
	0.45		
	0.44		
	1.90		
8000	0,26	0,20	0,07
	0,10		
	0,26		
	0,14		

	0,22		
13000	0,31	0,56	0,47
	1,25		
	0,51		
	0,74		
	0,00		
15000	0,04	0,17	0,14
	0,16		
	0,41		
	0,10		
	0,16		

Etanolutfelling uten bruk av is gav enda flere resultater med verdi over 1 særlig ved 13000 og 15000 g. Enkelte målinger viste stor variasjon. Alt dette ble oppsummert i Tabell 12.

Tabell 12 Etanolutfelling med is med varierende sentrifugering og dens påvirkning av DNA-utbytte. Verdier over 1 er merket med rosa farge.

Fart (g)	Andel DNA etter/før utfelling	Gjennomsnitt	Standardavvik
1500	0.96	0,56	0,32
	0.22		
	0.46		
	0.33		
	0.82		
3500	0.87	0,44	0,27
	0.14		
	0.41		
	0.32		
	0.46		
5000	0.57	0,77	0,38
	0.22		
	0.89		
	1.22		
	0.94		
8000	1.2	0,88	0,64
	1.79		
	0.62		
	0.69		
	0.09		
13000	1.52	1,33	0,35
	1.31		
	1.26		
	0.80		
	1.74		

15000	1.77	1,49	0,86
	1.37		
	1.56		
	2.58		
	0.19		

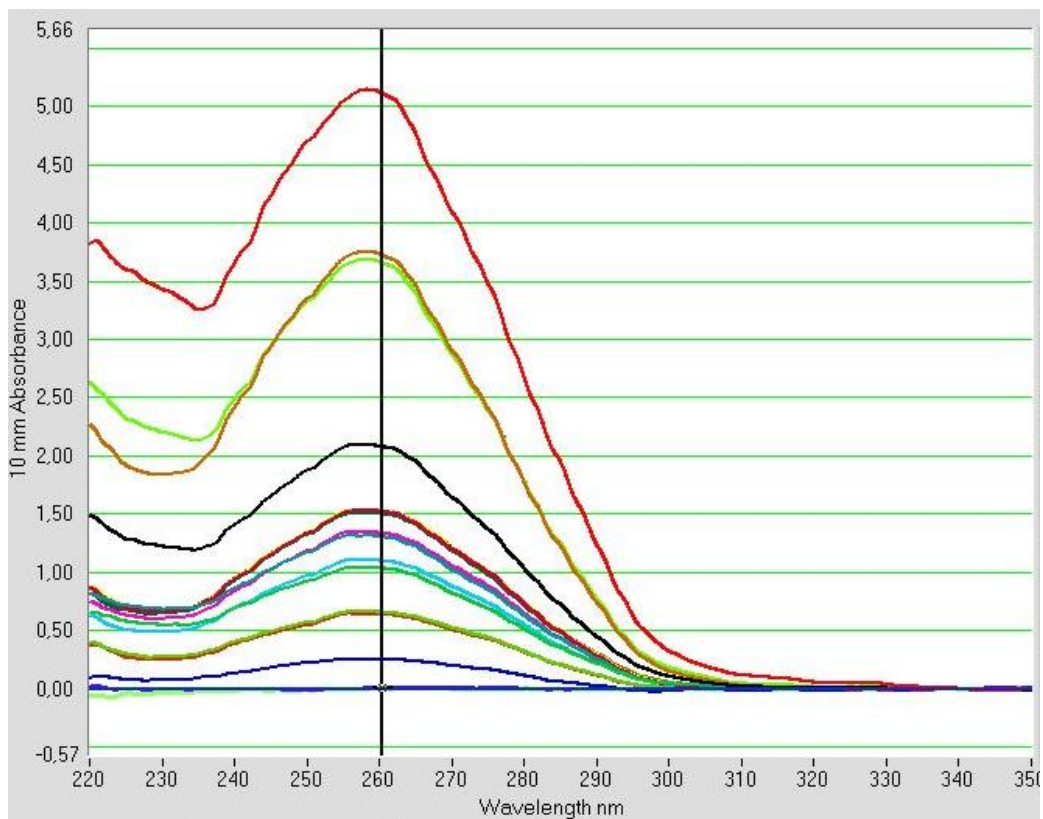
Marmor #2 utført på *E. coli* og *S. pseudintermedius*

Marmor-metoden ble gjennomført andre gang etter at alkoholutfelling var mer uttestet og det ble bestemt å bruke det minst varierende, trygge sentrifugeringsalternativ som ble sentrifugering ved 1500g og etanolutfelling ved romtemperatur.

DNA-utbytte ble målt med Nanodrop og forholdet 260/280 blesom oftestrundt 2.0. Forholdet 260/230 målt i DNA-prøver fra *E. coli* ble lavere enn tilsvarende fra *S. pseudintermedius*. Der hvor verdiene fra forholdet 260/230 var høyere enn 2.2 kan det være tegn på forekomst av EDTA med metalioner i prøven. Kurvene av spektra ser bra ut. Disse resultater ble oppsummert i tabell 13 og på figur 8.

Tabell 13. Nanodrop-målinger av DNA etter Marmor-metoden i andre forsøk som viser også renheten til DNA fra *E. coli* (1.1-4.3) og fra *S. pseudintermedius* (10.1-17(2)).

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1.1	104,07	2,01	1,71
1.2	256,15	1,91	1,49
1.3	51,81	2,02	1,90
4.1	186,58	2,10	2,03
4.2	183,29	2,06	1,67
4.3	65,32	2,07	1,91
10.1	12,43	2,23	3,50
10.2	66,82	2,06	2,22
13.1	76,08	2,08	2,31
13.2	75,17	2,08	2,33
16.1	76,20	2,06	2,29
16.2	64,73	2,04	2,52
17.1	76,30	2,01	2,31
17(2)	54,89	2,09	2,26
Blind prøven 1	0,06	-6,89	-0,10
Blind prøven 2	0,09	0,72	-0,05



Figur 8. Kurver av spektra for prøver etter DNA-isolasjon med andre forsøk med Marmur-metoden utført på *E. coli* og *S. pseudintermedius* og målt vha. Nanodrop.

DNA-konsentrasjonen ble også undersøkt ved hjelp av Qubit. Det ble regnet ut gjennomsnitt og standardavvik for DNA-utbytte fra både *E. coli* og *S. pseudintermedius*. DNA-utbyttet var gjennomsnittlig hhv. $0,19 \pm 0,14$ og $0,0375 \pm 0,0183$ mg DNA/g våte celler. Resultater er oppsummert i Tabell 14.

Tabell 14. Resultater for DNA-utbytte etter andre forsøk med Marmur-metoden målt med Qubit med beregnet ratio DNA mengde per våte celler.

Prøve nr og bakterieart	DNA ng/ul	DNA utbytte (mg DNA/g våte celler)	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g våte celler)
1.1 E. coli	80.8	0.3	0,19±0,14
1.2 E. coli	124	0.4	
1.3 E. coli	53.6	0.1	
4.1 E. coli	42.4	0.1	
4.2 E. coli	15.1	0.04	
4.3 E. coli	78.4	0.2	
10.1 S pseudintermedius	6.94	0.01	0,0376±0,0183
10.2 S pseudintermedius	16.6	0.04	

13.1 S pseudintermedius	18.7	0.04	
13.2 S pseudintermedius	14.8	0.04	
16.1 S pseudintermedius	19.8	0.05	
16.2* S pseudintermedius	19.5	0.07	
13.S pseudintermedius	9.56	0.03	
14. S pseudintermedius	7.78	0.02	
15. Negativ kontrol	0.426	-----	
16. Negativ kontrol	0.402	-----	

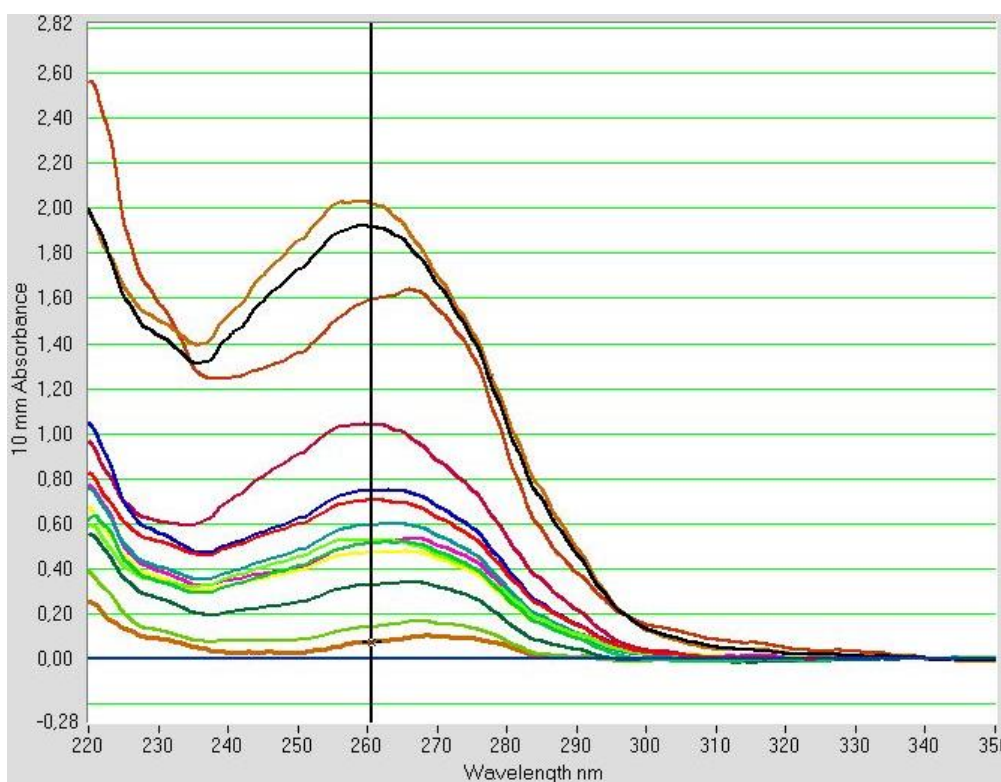
van Helden DNA-ekstraksjonsmetode utført med *M. phlei*

Etter Marmur-metoden ble van Helden et al.-metoden gjennomført på *M. phlei*. Nanodrop-målinger viste mengder av DNA mellom 6,9 til 101 ng/ul, forholdet 260/280 var rundt 1,8 som tyder på lite protein-forurensning av DNA'et. Hele 10 av 15 DNA-prøver viser 260/230 ratio under 1,5. Dette er for lavt og det betyr sannsynligvis forekomst av fenol-forurensninger. Alt dette er vist i Tabell 15. Spektra fra disse målingene ble vist i Figur 9. Prøven med den tredje største DNA-konsentrasjonen (15) ser ut til å være mye forurenset av fenol siden signalet til venstre ligger høyere enn det i midten og forholdet 260/230 for prøve 15 kun er 1,0, er det trolig den mest fenol-forurensete prøve av alle.

Tabell 15 Resultater fra DNA-isolasjon fra *M. phlei* med Van Helden et al.-prosedyren målt vha. Nanodrop.

Prøven	Nuklein syrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	96,02	1,84	1,34
2	35,03	1,86	1,35
3	25,44	1,90	1,50
4	101,40	1,87	1,35
5	26,31	1,83	1,54
6	29,58	1,88	1,46
7	37,23	1,85	1,34
8	25,53	1,69	1,32
10	52,00	1,92	1,71
11	16,25	2,01	1,23
12	23,47	1,82	1,31
13	6,91	1,83	1,12

15	79,43	1,70	1,00
Blind prøven	3,54	1,26	0,80



Figur 9 Spektrum fra nanodrop-DNA-målinger utført ved van Helden-metoden et al. på M. phlei.

Resultater fra Qubit målinger av DNA viste mindre mengder av DNA dvs mellom 0,67 og 27,2 ng/ul som utgjorde gjennomsnittlig $0,038 \pm 0,023$ mg DNA per gram våte celler. Alle disse verdier er presentert i Tabell 16.

Tabell 16 Qubit-målinger av DNA etter van Helden prosedyren gjennomført på M. phlei.

Prøve nr	ng/ul	DNA utbytte (mg DNA/g våte celler)	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g våte celler)
1	25,00	0,074	0,038±0,023
2	9,66	0,037	
3	8,46	0,045	
4	27,20	0,066	
5	7,66	0,038	
6	9,14	0,034	
7	8,98	0,032	
8	5,14	0,018	
10	18,30	0,080	
11	4,06	0,019	
12	5,56	0,021	

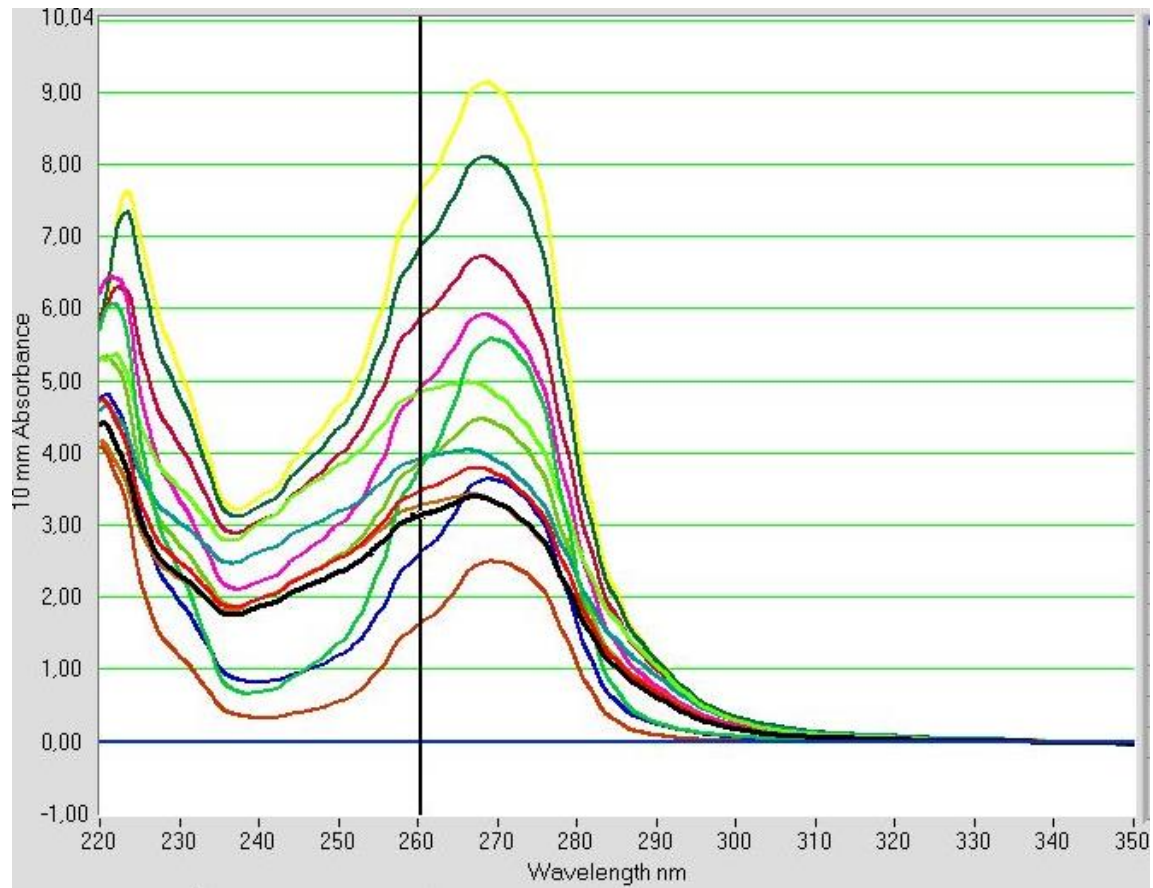
13	0,67	0,005	
15	7,50	0,025	
neg kont	0,29		

Modifisert van Helden prosedyre utført på *M. phlei*.

Siden van Helden-prosedyren gav et lavt DNA-utbytte ble det laget en mer komplisert versjon (mod. van Helden-prosedyre) av protokollen og det er resultater fra den som blir presentert her. Resultater fra den modifiserte van Helden et al. – protokollen inneholdt ganske store og samtidig urene utbytter av DNA. Signal fra blindprøven i Nanodrop viste 80 ng/ul DNA som er vist i Tabell 17. Det ble også vist Nanodrop-spektrum i Figur 10. Fenol er synlig i disse prøvene hvor venstre signal er høyere enn den midterste toppen i figuren for blant annet negativ kontroll. Prøvene viste nukleinsyrer fra rundt 129 til nesten 378 ng/ul. Forholdet 260/280 var i mange tilfeller ikke optimalt siden det burde være høyere enn 1,7 og det var mange verdier som var litt lavere enn 1,7. Det kan tyde på at ikke bare protein, men også fenol forurensrer prøvene. Forholdet 260/230 burde i hvert fall være større enn 1,5, men alle unntatt en prøve hadde lavere verdi som sannsynligvis betyr at det var fenol i prøvene.

Tabell 17. DNA prøver undersøkt med Nanodrop etter van Helden metode utført på *M. phlei*. Sterkt signal i blindprøven som tyder på ukjente forurensninger.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	156,23	1,68	1,36
1.1	172,83	1,68	1,39
2	186,58	1,55	1,58
2.1	162,97	1,71	1,44
3	241,15	1,73	1,38
3.1	195,95	1,70	1,29
4	128,88	1,55	1,33
4.2	242,79	1,66	1,45
5	291,15	1,69	1,42
5.2	339,18	1,69	1,42
7	376,99	1,72	1,46
7.1	192,16	1,66	1,41
Blind prøven	80,54	1,46	1,36



Figur 10. Spektrum av prøver med DNA fra *M. phlei* etter mod. Van Halden et al.-prosedyren.

Qubit-målingene viste i motsetning til Nanodrop-målingene at det ikke var mye DNA i blindprøven, bare ca. 1 ng/ul. Utbyttet var gjennomsnittlig 151 ng/ul, (avrundet $0,94 \pm 0,50$ mg DNA/g våte celler). Disse resultatene ble presentert i Tabell 18.

Tabell 18 DNA målt vha Qubit fra mod. van Halden et al.-protokollen ekstrahert fra *M. phlei* samt gjennomsnitt standardavvik for DNA-mengde per vekt av våte celler.

prøve	DNA konsentrasjon (ng/ul)	DNA utbytte (mg DNA/g våte celler)	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g våte celler)
1	148	1,41	0,935±0,496
1.1	154	1,54	
2	8,36	0,02	
2.1	156	1,49	
3	148	0,78	
3.1	134	0,84	
4	13,8	0,09	
4.2	126	0,84	

5	190	1,00	
5.2	200	0,95	
7	200	0,87	
7.1	160	1,39	
Blind prøven	1,24		

Andre metoder som er aktuelle, men ikke ble tatt med videre i forsøket: Chelax 100, Kotlowski et al. og Patel et al.

*Chelax 100-metoden brukt til å isolere DNA fra *S. pseudintermedius**

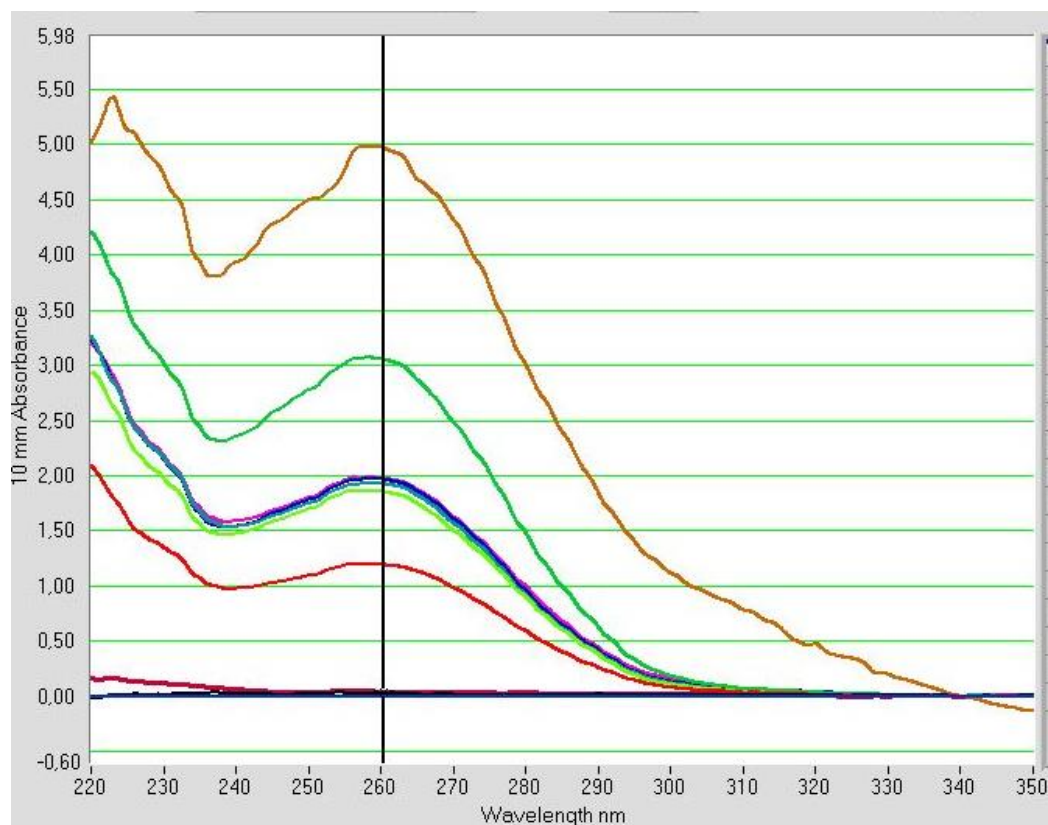
Imellomtiden ble det også prøvd å isolere DNA ved hjelp av Chelax 100-metoden. Det er en rask, billig metode.

Etter ekstraksjon av DNA fra *S. pseudintermedius* ved hjelp av Chelax 100 viste det seg at mengden målt DNA så ganske tilfredsstillende ut. DNA-mengden så ut til å være fra 59 til rundt 250 ug/ul. De fleste prøver inneholdt omkring 100 ug/ul. Det er etter forholdene et ganske bra utbytte. Renhetsmålinger viste to ting. For det første var det ikke så mye proteinkontaminasjon siden 260/280 ratio var rundt 2.0. Dette betyr også at det var mye RNA i prøven. For det andre var forholdet 260/230 ikke så optimalt. Dette forholdet viste seg nemlig å være ganske lavt; rundt 1, mens det burde vært 2.0-2.2. Det kan tenkes at mye polysakkarider ble degradert og løste seg i vannet under oppvarmingen. Det bør også nevnes at det i prøven med den største mengden målt DNA har det dårligste 260/280 ratio nemlig 1,65. Resultater etter DNA-ekstraksjon fra *Staphylococcus pseudintermedius* er presentert i Tabell 19 og på Figur 11. Figur 11 viser at kurvene ikke er optimale.

Tabell 19 Resultater etter DNA ekstraksjon fra *Staphylococcus pseudintermedius* vha. Chelax 100 målt med Nanodrop.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1s	59,43	2,00	0,88
2s	152,94	2,06	1,01
3s	248,86	1,65	1,05
4s	92,68	2,05	0,94
5s	96,37	2,09	0,89
6s	98,35	2,05	0,91
7s	98,72	1,98	0,90

Blind prøven	2,11	1,34	0,36
---------------------	------	------	------



Figur 11 Spektra målt ved Nanodrop etter ekstraksjon fra Staphylococcus pseudintermedius ved hjelp av Chelax 100-metoden.

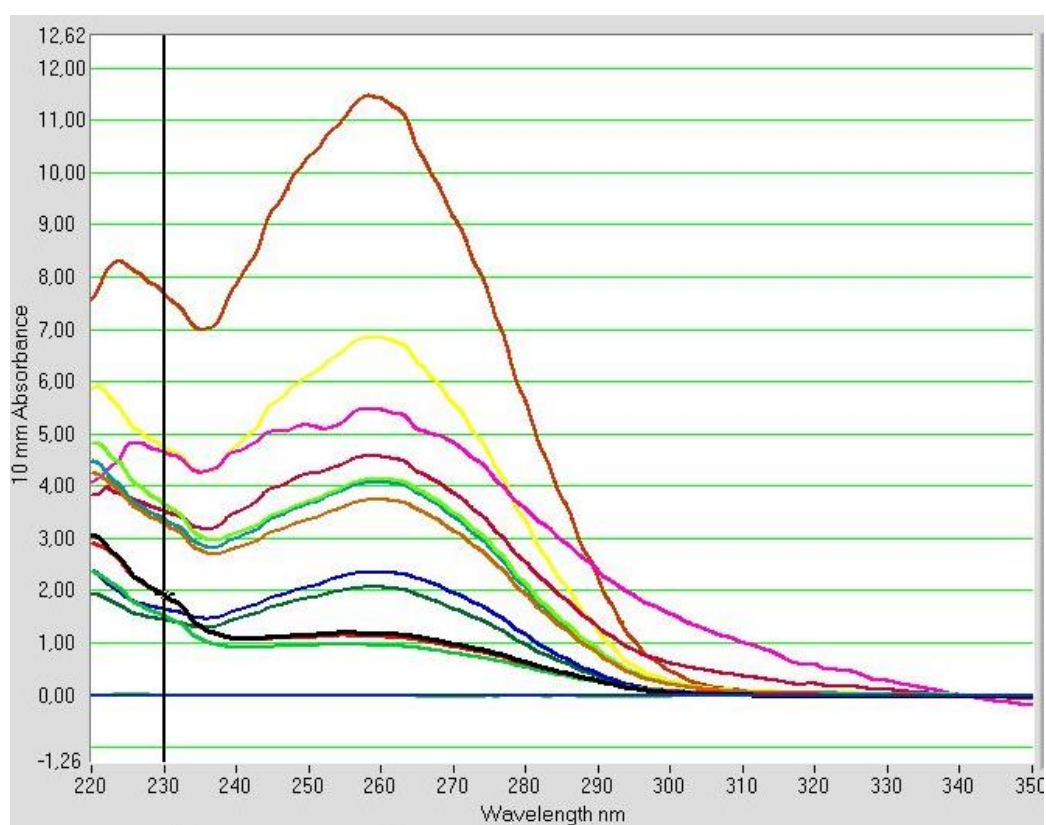
Chelax 100-metoden og andre bakterier: N. asteroides, C. pseudotuberculosis og B. cereus

N. asteroides, *C. pseudotuberculosis* og *B. cereus* ble brukt for å ekstrahere DNA vha. Chelax 100-metoden. Det ser ut til at det ble isolert mest DNA fra *B. cereus* (fra 103 til 341 ng/ul), og kanskje litt mindre fra *C. pseudotuberculosis* (rundt 200 ng/ul) og minst fra *N. asteroides* (rundt 50 ng/ul). Renheten når det gjelder ratio 260/280 var bra, men ratio 260/230 var ikke tilfredsstillende for *N. asteroides* var det rundt 0,60, for *C. pseudotuberculosis* rundt 1,15 og for *B. cereus* rundt 1,30.

Resultater ble oppsummert i Tabell 20, mens nukleinsyre-spektra er vist i Figur 12.

Tabell 20 Resultater etter DNAekstraksjon fra *N. asteroides*, *C. pseudotuberculosis* og *B. cereus* utført vha. Chelax 100-metoden og målt med Nanodrop.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1N	59,22	1,86	0,62
2N	55,45	1,85	0,58
3N	47,51	1,78	0,63
1C	186,66	1,92	1,14
2C	206,79	1,93	1,13
3C	203,65	1,96	1,21
1B	117,48	2,03	1,43
2B	272,84	1,53	1,17
3B	228,10	1,79	1,30
Negativ kontroll	-0,37	0,31	-2,97
Positiv kontroll <i>E. coli</i>	570,83	2,02	1,48



Figur 12 Spektra av DNA-prøver etter ekstraksjon fra *N. asteroides*, *C. pseudotuberculosis* og *B. cereus* ved hjelp av Chelax 100-metoden og målt med Nanodrop.

Modifisert metode etter Kotlowski et al.

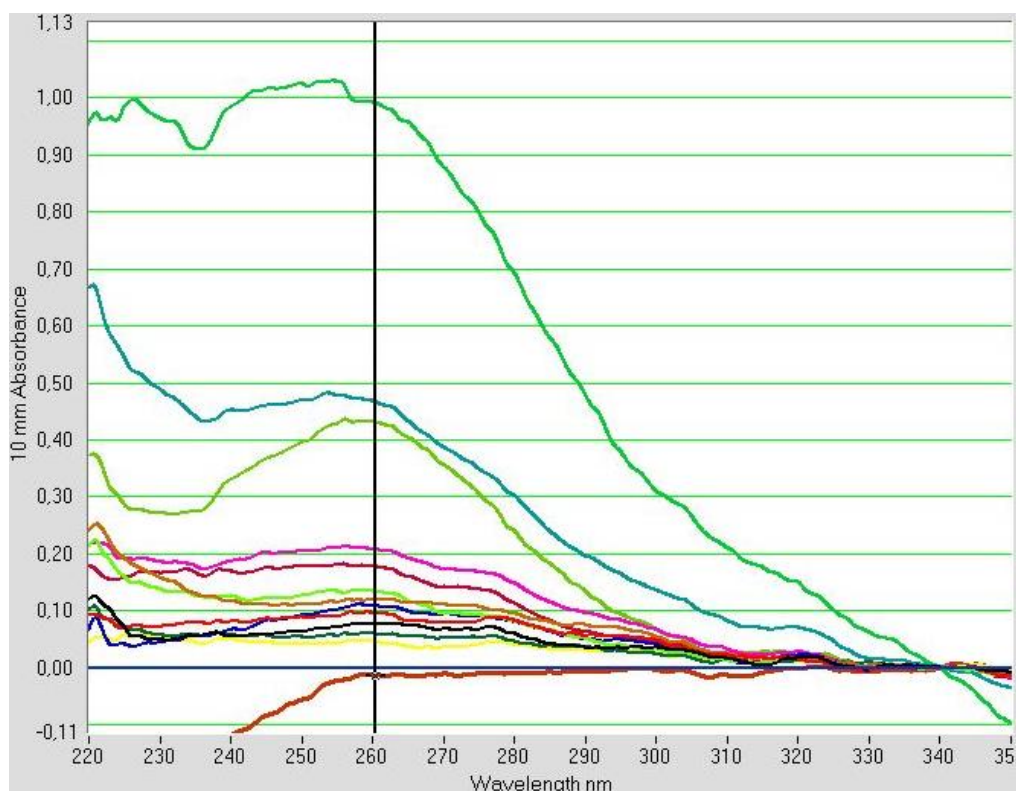
En annen metode som ble utprøvd var metoden etter Kotlowski et al. Den ble modifisert fordi ikke alle komponenter ble funnet på markedet.

Den største mengden av DNA fra *M. phlei* målt med Nanodrop ved bruk av den modifiserte metoden etter Kotlowski et al. var 49,6 ng/ul, det var bare to resultater rundt 20 og en rundt 10ng/ul. Resten av prøver viste enda mindre verdier.

Prøvene ble forurenset og alle unntatt en hadde 260/280 ratio lavere enn 1,7. 260/230 ratio var omtrentlig rundt 1. Resultater fra Nanodrop ble vist i Tabell 21. Spektra for disse resultatene ble dokumentert i Figur 13.

Tabell 21 Resultater etter DNA-ekstraksjon fra *M. phlei* vha. den modifiserte Kotlowski-metoden registrert vha. Nanodrop.

Prøven	Nukleinsyrer onsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1m	3,87	1,30	1,55
2m	4,81	1,16	1,33
3m	49,60	1,43	1,03
4m	5,97	1,25	0,75
5m	6,72	1,66	0,98
6m	23,40	1,55	0,96
7m	5,44	1,36	2,46
8m	10,38	1,40	1,12
9m	9,81	1,57	1,08
10m	2,30	1,14	0,91
11m	21,54	1,8	1,59
Blind prøven	3,01	1,30	1,03



Figur 13 Nanodrop spektra av DNA fra *M. phlei* isolert ved hjelp av den modifiserte Kotlowski-metoden.

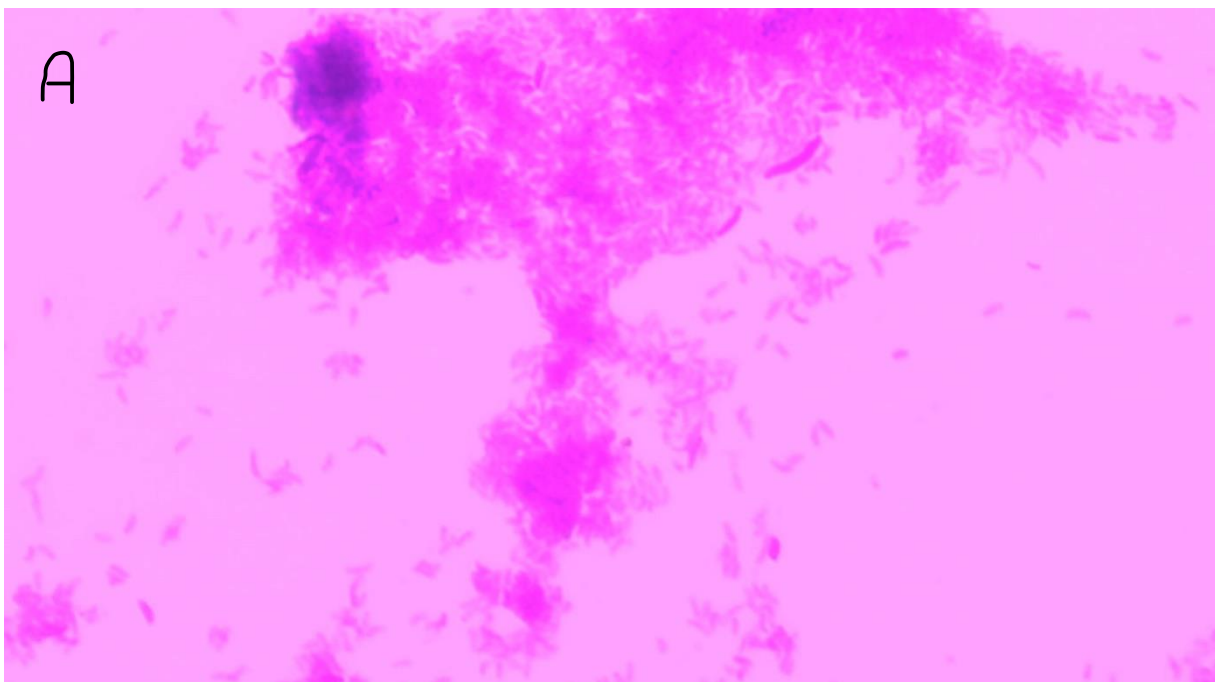
DNA-isoleringsmetode etter Patel et al. (1986)

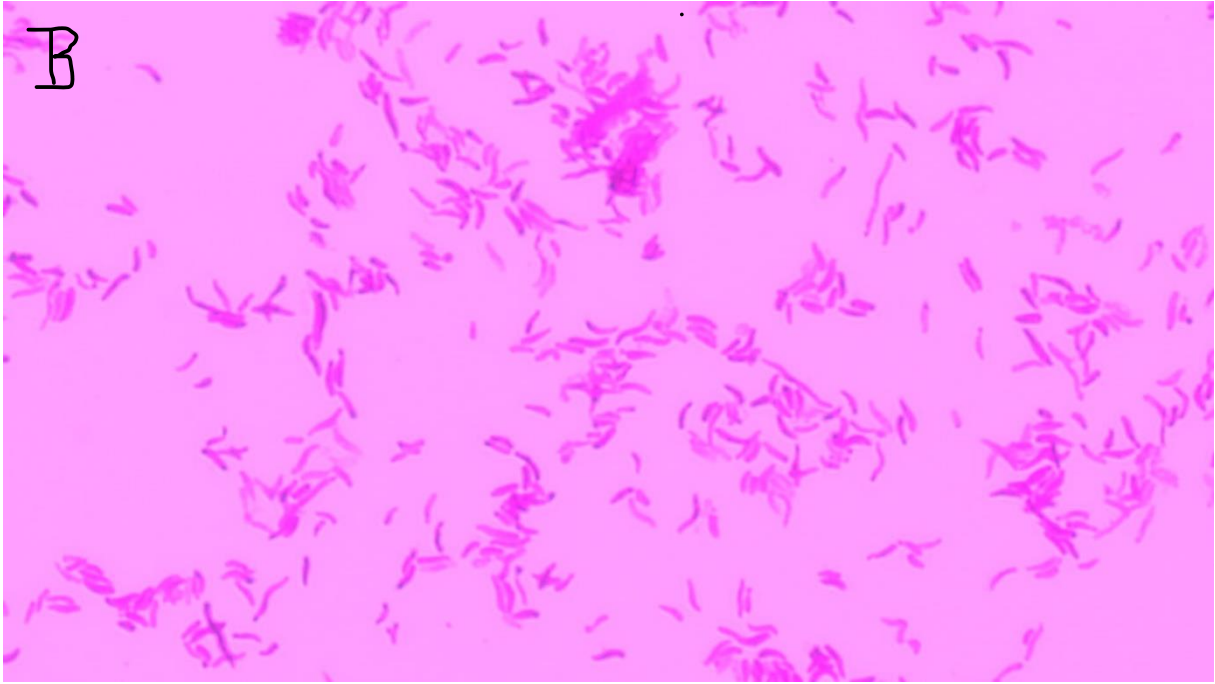
Bruk av den modifiserte metoden etter Patel et al. (1986) gav ikke tilfredsstillende resultater for DNA-utbytte. DNA-verdiene var bare litt større enn for den negative kontrollen (måleresultater mellom 0,832 og 0,384 mens resultatene for den negative kontrollen var 0,316 ng/ul). Allikevel ble det notert at det er veldig viktig ikke å pipettere ut for mye av væsken fra kloroform-fenol-vann fasene for ikke å få med kloroform eller fenol.

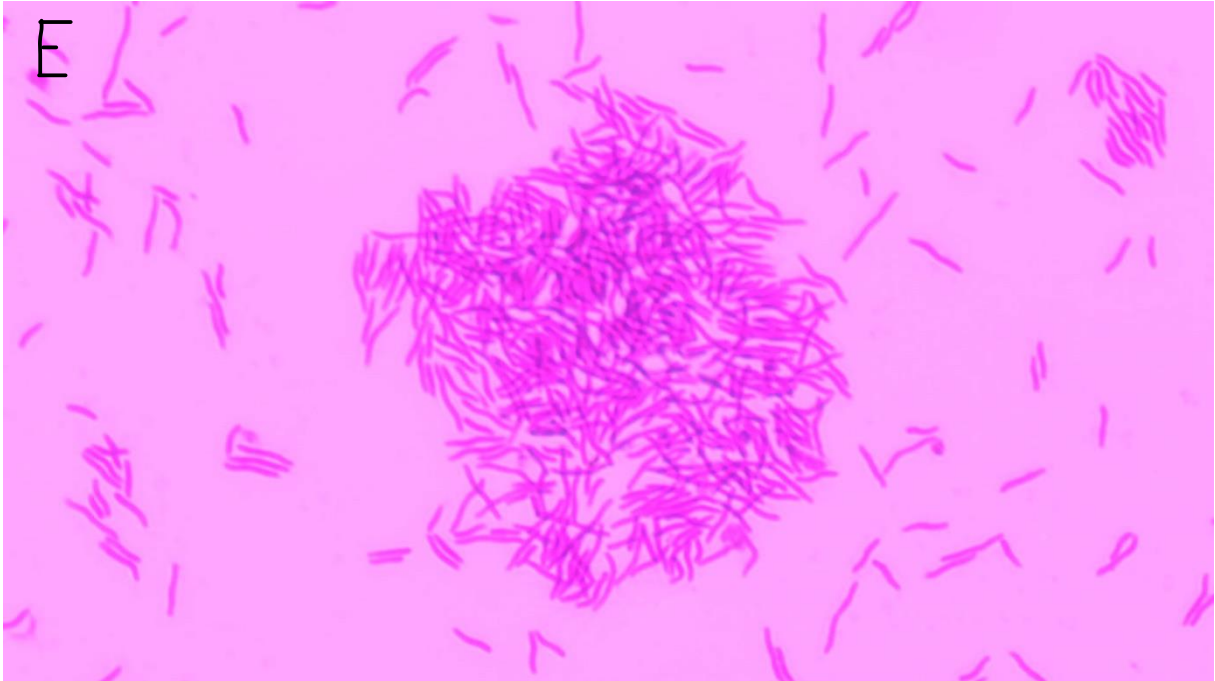
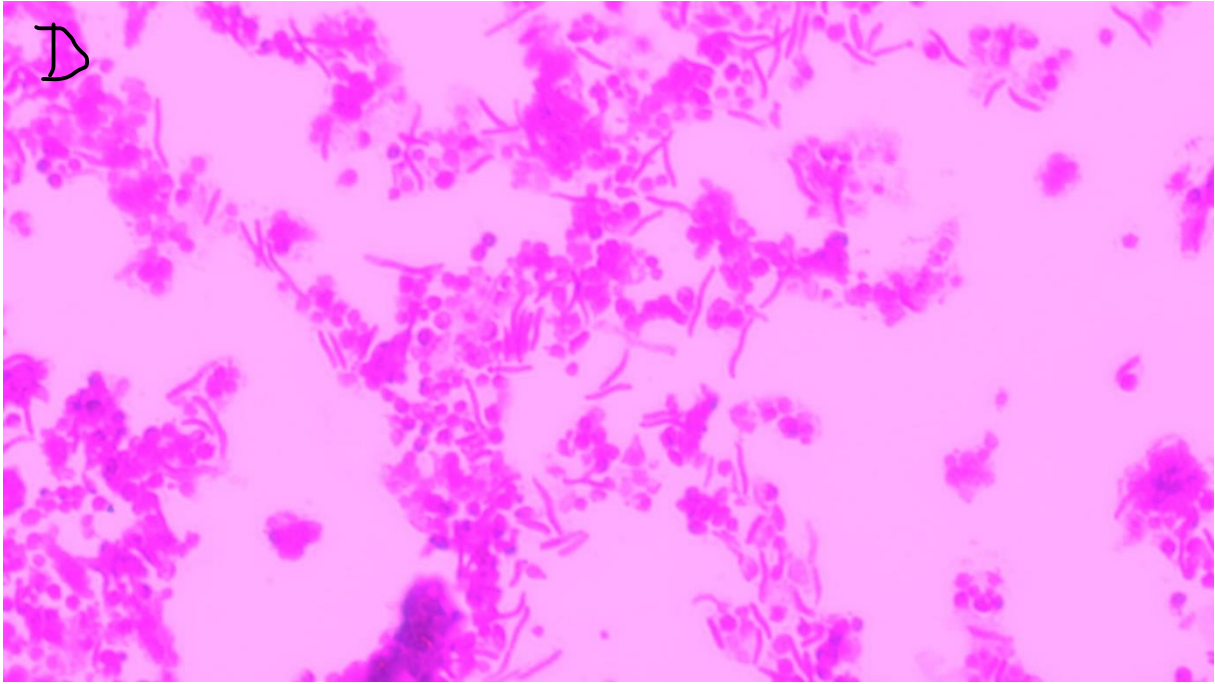
Del 2 Utvalgte metoder blir brukt til å ekstrahere DNA fra hypotetisk pleoforme bakterier

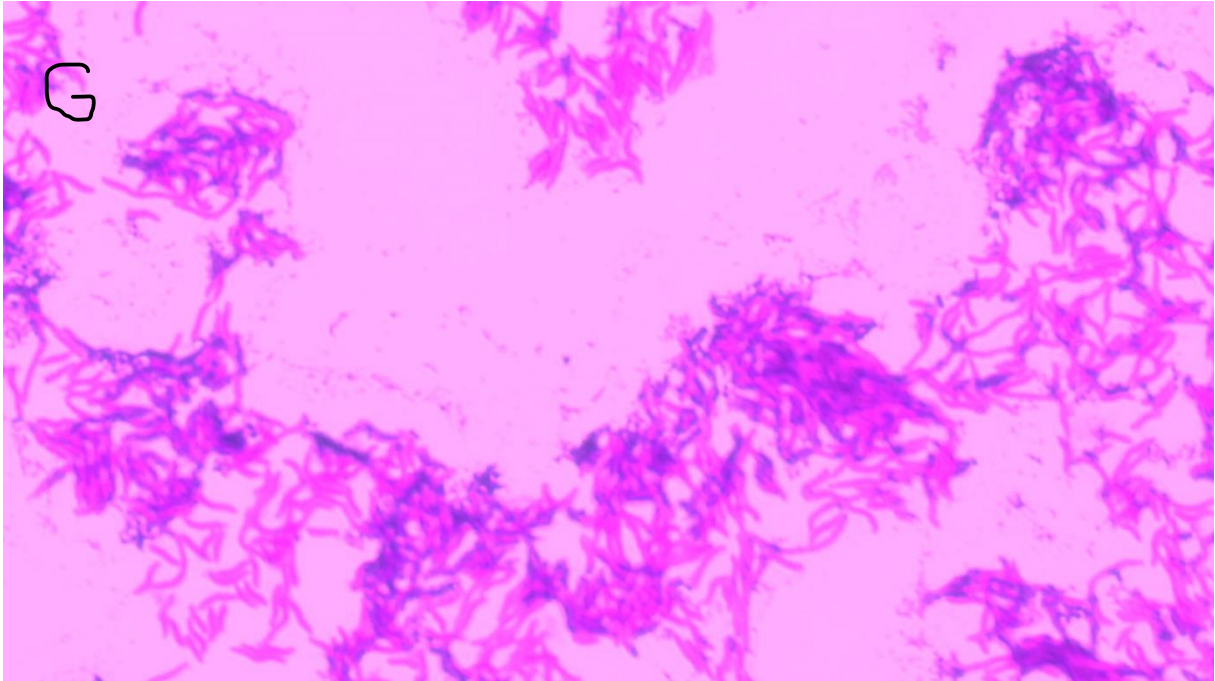
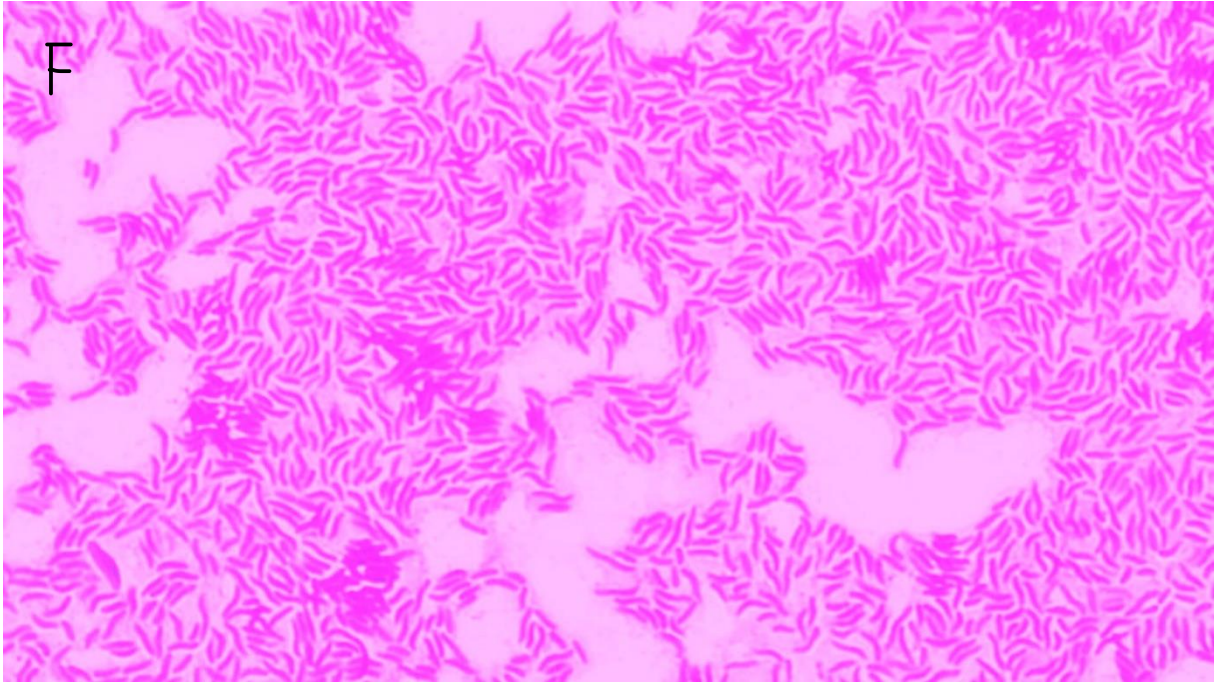
Hypotetisk pleoforme bakterier, et forsøk på å differensiere *A. wodanis*

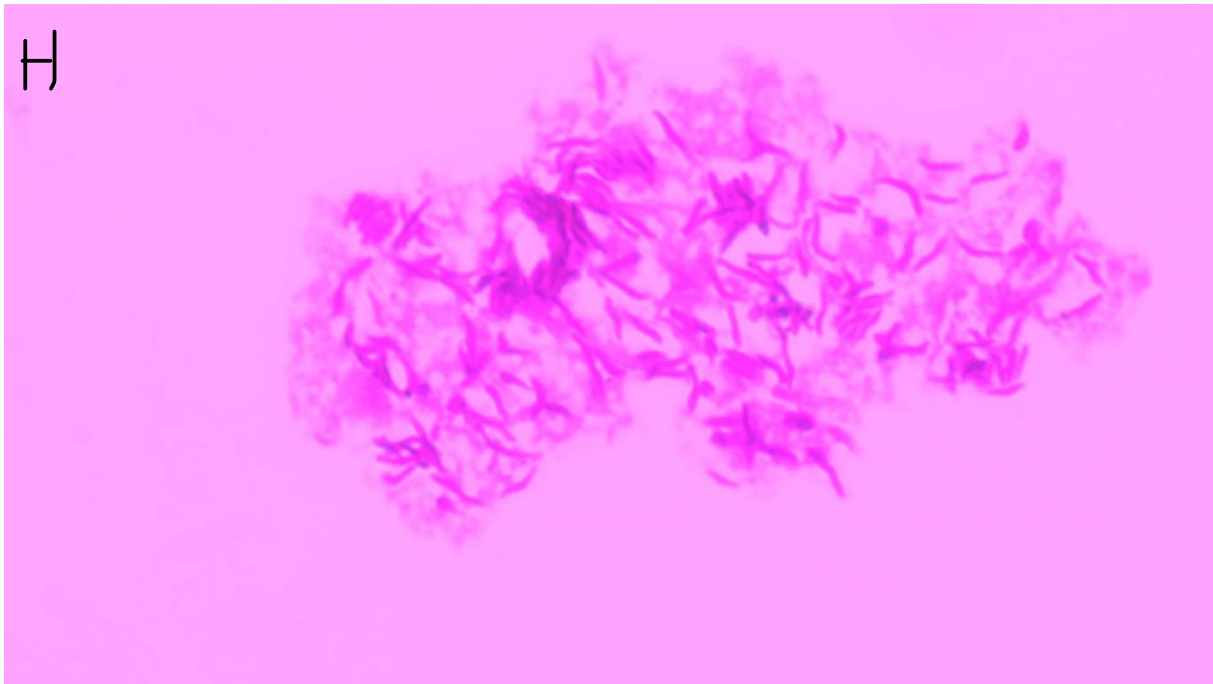
Etter en utført dyrkning av bakterien *A. wodanis* når cellene fremdeles var i log-fasen ble de blandet med andre løsninger A-H og dyrket i disse løsninger slik som beskrevet i metodedelen. Etter konservering i rundt 75% EtOH ble de mikroskopert. Særlig D ligner på kontaminert siden det dukker opp kokker. Disse bilder fra mikroskopering ble dokumentert på Figur 14.











Figur 14 Bilder laget etter konservering av A. wodanis i EtOH, dyrket i ulike løsninger A-H hvor A er den øverste og H den nederste.

Modifisert van Helden et al.metoden brukt for å isolere DNA fra hypotetisk pleoforme H A. *wodanis*.

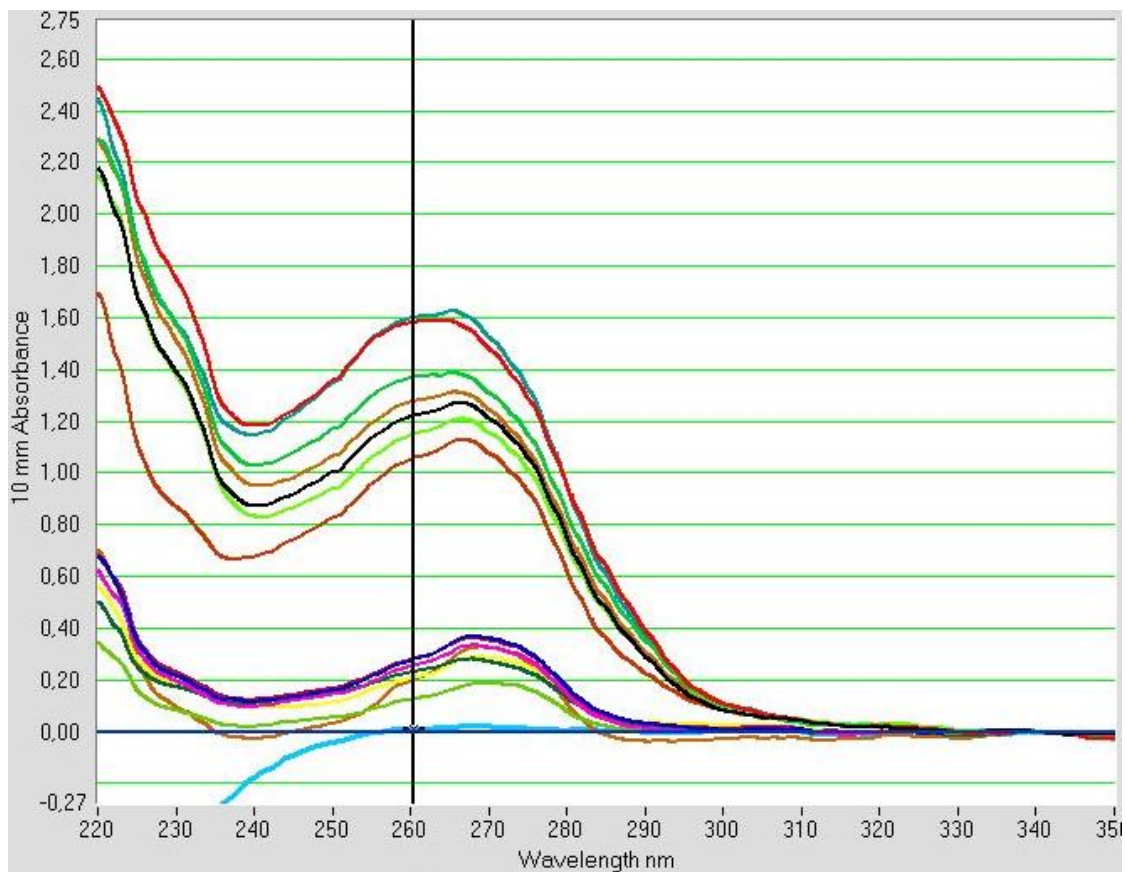
Det ble ekstrahert DNA fra *A. wodanis*-bakterier dyrket i hesteserum. Det ble kun forsøkt en type medium og ekstrahert vha. mod. van Helden et al.-metoden og vha. en arbeidsbesparende versjon av den.

Tabell 22 viser renheten til DNA som ble isolert ved hjelp av modifisert van Helden et al.-metoden og dens kortversjon. Målinger av DNA etter bruk av metoden viser et 260/280 forhold med verdier mellom 1,45 og 1,72, bare to prøver over 1,7 mens forholdet 260/230 var mellom 0,83 og 1,50. Det er lett å tenke at det var fenol-forurensninger fordi bare en liten mengde av fenol påvirker spektra. Figur 15 viser signaler fra Nanodrop-målingene som

utrykker at DNA til en viss grad er forurenset. Bunnen av kurven ligger mellom 230 og 240 nm istedenfor ved 230 nm, egentlig nærmere 240nm. Dette ligner på fenol spektrum (figur 2). Det ser ut til at en resultatet etter bruk av kortversjonen van Helden-metoden er mindre fenol-forurenset enn produktet etter den modifiserte van Helden et al.-metoden fordi kurvene har sine bunner nærmere 230 nm enn for de andreproduktene. Det kan tenkes at fenol forhøyer de avleste DNA verdier.

Tabell 22 Verdier av DNA- renhet målt vha. Nanodrop etter DNA-ekstraksjon med den modifiserte van Helden-metoden (1-6) og dens kortversjon (7-12) utført på hypotetisk pleoforme *A. wodanis*.

Prøven	Konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	60,91	1,61	0,87
2	79,04	1,65	0,90
3	68,46	1,61	0,87
4	63,76	1,62	0,84
5	57,30	1,58	0,83
6	79,89	1,67	1,01
7	13,74	1,57	1,28
8	12,66	1,72	1,30
9	13,92	1,66	1,22
10	11,48	1,72	1,33
11	10,30	1,45	1,13
12	6,20	1,58	1,50
Positiv kontroll	52,64	1,68	1,21
Blind Prøven	9,83	1,79	2,07



Figur 15 Spektra av DNA målt etter modifisert van Helden (øverste) og dens besparende versjon (nederste) gjennomført på hypotetisk pleoforme A. wodanis. Det finnes tydelig mellomrom som skiller de to fra hverandre.

Resultater ble også undersøkt ved hjelp av Qubit som viste at blindprøven hadde mindre DNA enn det kunne tyde på fra Nanodrop og besparende metode ga mye mindre DNA enn vanlig modifisert van Helden. Dette ble presentert i tabellen 23.

Tabell 23 Qubit målinger av DNA mengde etter mod. van Helden (1-6) og dens mer besparende versjon (7-12, lilla fargen) utført på hypotetisk pleoforme A. wodanis.

Prøve nr	ng/ul	mg DNA/g våte celler	Gjennomsnitt og Standard avvik (mg DNA/g våte celler)
1	17,6	0,210	0,187±0,058
2	25,4	0,273	
3	18,2	0,140	
4	16,4	0,158	
5	14,9	0,120	
6	21,2	0,223	
7	1,73	0,016	0,011±0,004
8	1,4	0,013	
9	1,3	0,012	
10	0,532	0,007	
11	0,8	0,011	
12	0,476	0,005	

13 positiv kontroll	5,94	0,112	
14 negativ kontroll	0,204		

Det ble regnet ut at gjennomsnitt av den modifisert van Helden et al.-metoden og kortversjonen var hhv. $0,187 \pm 0,058$ og $0,011 \pm 0,004$ mg DNA/g våte celler.

Marmur-metoden som forsøk på å isolere DNA fra alle 8 hypotetisk pleoforme *A. wodanis* parallelt

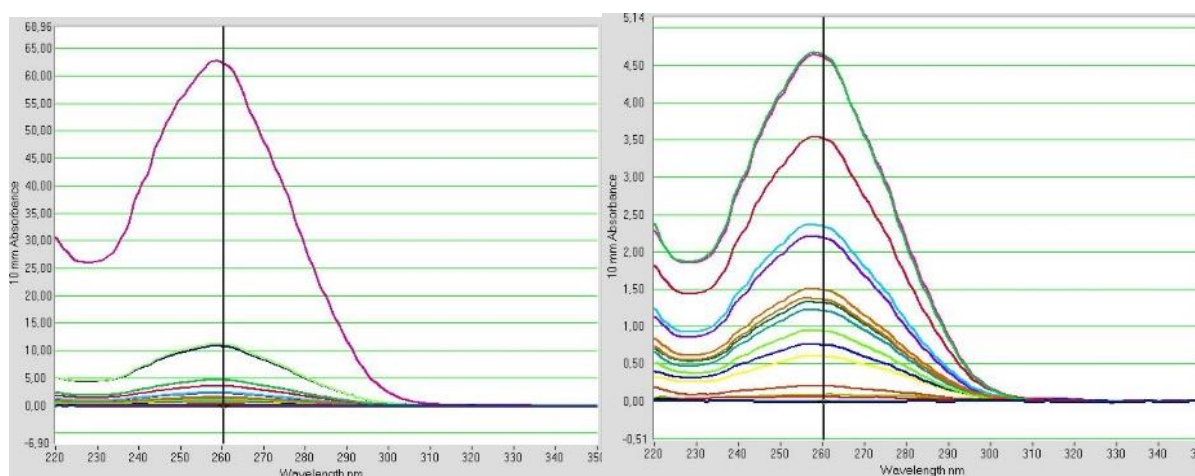
Det ble bestemt å kjøre *A. wodanis* fra åtte ulike medier samtidig, ikke en etter en for at betegnelser forblir de samme når det ekstraheres DNA fra dem.

Nanodrop-målinger viste at DNA-prøvene etter bruk av Marmur-metoden var relativt rene. Forholdet 260/280 var rundt 2 og kun tre prøver kom under 1,7. Ingen av prøvene hadde 260/230-verdi lavere enn 1,5. De hadde forhøyet verdi som kan tyde på at EDTA med metal ioner forekom i prøvene fordi den gir lavere verdier ved målinger ved 230 nm (91). Spektra ser fine ut. Nanodrop-målinger og spektra ble dokumentert i Tabell 24 og på Figur 16.

Tabell 24. Nukleinsyrer fra 24 pleoforme bakterier som ble målt vha. Nanodrop-instrumentet etter det første forsøket på å sammenligne alle vha. Marmur-metoden.

Prøven	Konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
A1	46,80	2,05	2,50
A2	60,55	2,10	2,57
A3	37,59	1,97	2,41
B1	230,70	2,13	2,48
B2	176,24	2,11	2,44
B3	65,95	2,11	2,45
C1	29,86	1,80	2,31
C2	4,22	1,31	2,53
C3	9,92	1,85	2,31
D1	74,50	2,15	2,42
D2	117,20	2,18	2,52
D3	109,49	2,22	2,54
E1	2,76	1,49	1,99
E2	232,20	2,21	2,47
E3	68,05	2,16	2,46
F1	557,22	2,19	2,48
F2	6,06	1,35	2,85
F3	538,31	2,17	2,44

G1	3120,99	2,16	2,38
G2	989,40	2,19	2,38
G3	685,47	2,19	2,40
H1	281,35	2,17	2,45
H2	24,20	1,88	2,32
H3	21,48	2,00	2,34
Blind prøven	-0,29	-5,01	-1,49



Figur 16 Representativt utvalg av spektra som ble dokumentert med bruk av Marmur-metoden med hypotetisk pleoforme *A. wodanis*. Til venstre er alle prøver og til høyre ett utvalg som viser mer nøyaktig prøver med lavere konsentrasjon.

Qubit-målinger viste ikke så høye DNA-verdier, A, B og G var seks eller flere ganger høyere enn H, C, D, E, og F. Alt dette ble presentert i Tabell rev 25

Tabell rev 25 viser Qubit-målinger av DNA fra hypotetisk pleoforme bakterier etter det første forsøk med Marmur-DNA-isolasjonsprosedyren der alle åtte bokstaver var holdt sammen.

prøve	DNA ng/ul	mg DNA/g våte celler	Gjennomsnitt og standardavvik mgDNA/g våte celler
a1	6,94	0,026	0,203±0,305
a2	7,4	0,028	
a3	188	0,556	
b1	23,8	0,059	0,092±0,054
b2	13,6	0,062	
b3	7,08	0,154	

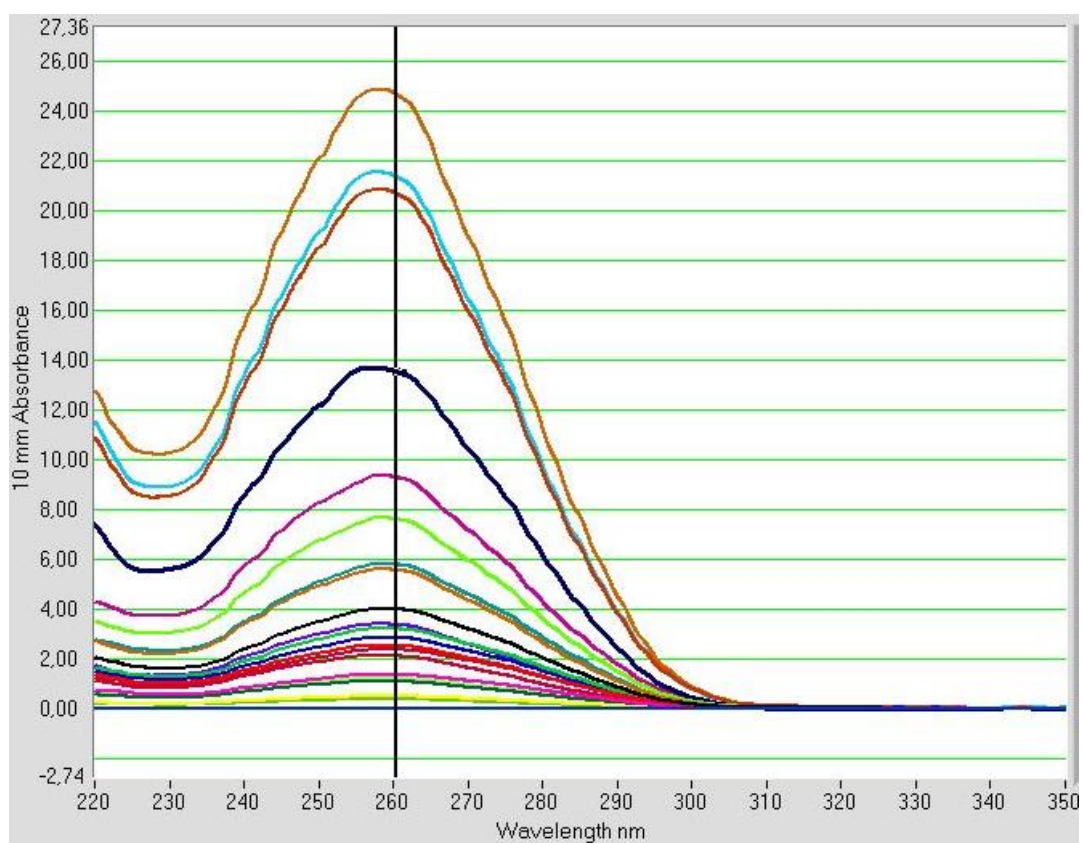
c1	2,8	0,009	0,007±0,003
c2	1,34	0,004	
c3	2,92	0,008	
d1	0,848	0,003	0,005±0,002
d2	0,94	0,006	
d3	1,07	0,006	
e1	too low		0,006±0,005
e2	4,68	0,009	
e3	1,06	0,002	
f1	2,16	0,007	0,009±0,003
f2	3,5	0,011	
f3	too low		
g1	33	0,109	0,085±0,025
g2	24,2	0,059	
g3	31,6	0,088	
h1	8,28	0,018	0,014±0,003
h2	5,62	0,012	
h3	5,66	0,012	
0	too low		

Marmor-prosedyren ble gjort andre gang med *A. wodanis* dyrket i åtte ulike medier. DNA-utbyttet ble målt vha. Nanodrop og Qubit. Denne gangen ble det pipettert mindre vannfase enn første gang fra kloroformfasen. Nukleinsyre-innholdet var ifølge Nanodrop-målingene lavest ved D og H; under 100ng/ul og høyest ved G og E hhv. over 500 og 1000ng/ul. Nanodrop-målingene viste at DNA var ganske rent. Forholdet 260/280 var over 1,7 i alle prøvene og det betyr at det ikke var mye proteiner der. Forholdet 260/230 var også bra, ingen lavere tallverdi enn 1,5, til og med ingen lavere enn 2. Tallverdiene var trolig forhøyet på grunn av metallioner knyttet til EDTA som gjør absorbans ved 230 nm lavere. Spektra var også ganske fine. Renheten til prøvene er presentert i Tabell 26 og på Figur 17.

Tabell 26. Nanodrop-målinger av nukleinsyrer fra *A. wodanis* hypotetisk pleoforme bakterier som ble ekstrahert vha. Marmor-metoden i andre gjennomkjøring.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
A1	199,09	1,97	2,48
A2	125,63	1,97	2,51
A3	159,65	1,93	2,49
B1	277,79	2,10	2,53
B2	380,63	2,11	2,51

B3	289,27	2,03	2,50
C1	141,56	1,98	2,46
C2	67,39	1,90	2,45
C4	117,75	1,89	2,51
D1	53,25	2,06	2,59
D2	23,89	1,97	2,91
D3	17,95	2,12	2,71
E1	1036,98	2,17	2,43
E2	1236,88	2,18	2,41
E3	1070,78	2,18	2,41
F1	167,88	2,22	2,56
F2	59,84	2,12	2,58
F3	104,76	2,18	2,58
G1	678,43	2,20	2,42
G2	464,79	2,16	2,51
G3	452,35	2,16	2,50
H1	77,63	1,91	2,34
H2	72,85	1,86	2,29
H3	54,37	1,84	2,33
Blind Prøven	1,06	0,47	-5,81



Figur 17 Spektra av prøver etter isolasjon fra hypotetisk pleoforme *A. wodanis* bakterier vha av Marmur-prosedyren andre gang.

Målt DNA vha. Qubit viste at minst DNA var i F og D og mest i A og B når det gjaldt mgDNA/g våte celler. Disse data ble presentert i Tabell 27.

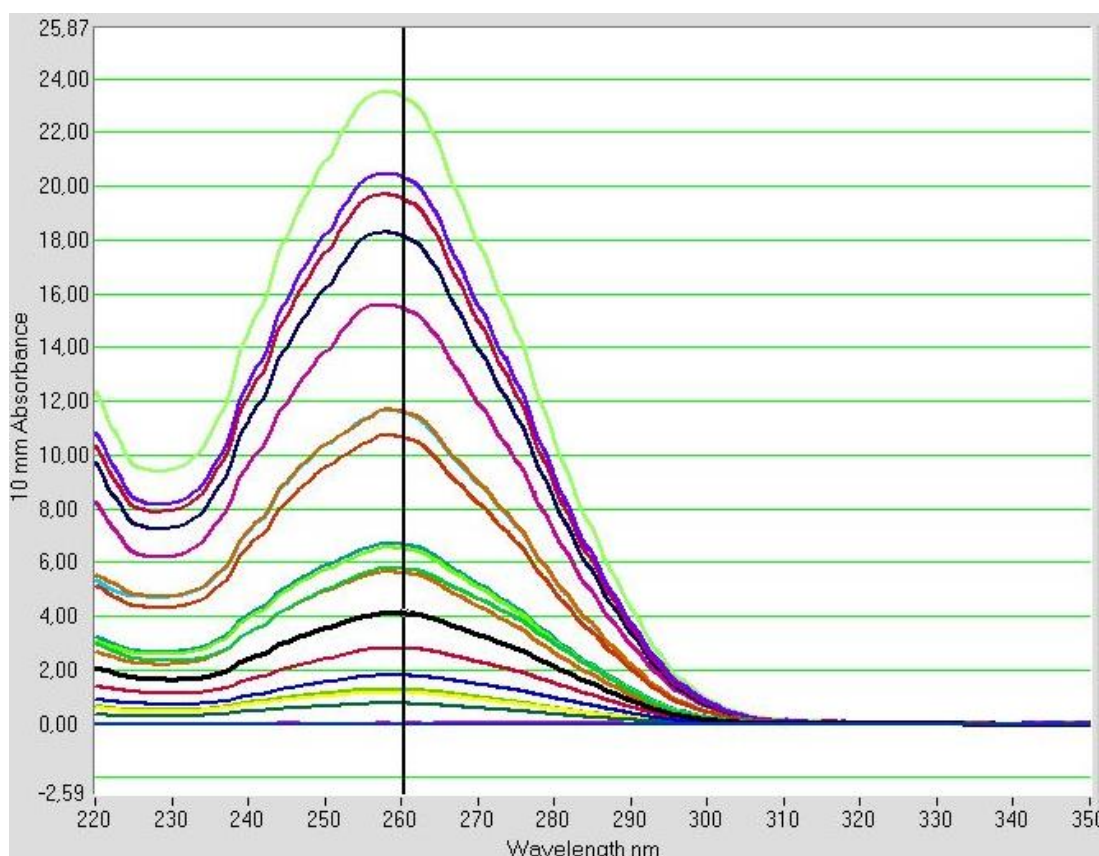
Tabell 27 Målinger vha. Qubit av DNA isolert fra hypotetisk pleoforme *A wodanis* bakterier vha. Marmur-prosedyren andre gang.

	ng/ul	mg DNA/g våte celler	Gjennomsnitt og standardavvik mgDNA/g våte celler
a1	198	0,846	0,962±0,204
a2	150	0,843	
a3	182	1,197	
b1	154	0,670	0,590±0,073
b2	90	0,529	
b3	122	0,570	
c1	61,4	0,139	0,134±0,122
c2	2,58	0,010	
c3	52,2	0,253	
d1	0,75	0,004	0,003±0,001
d2	0,232	0,002	
d3	For lav		
e1	196	0,438	0,235±0,177
e2	74,6	0,146	
e3	51	0,120	
f1	0,448	0,005	0,004±0,001
f2	0,212	0,003	
f3	0,374	0,003	
g1	21,8	0,104	0,097±0,016
g2	12,9	0,078	
g3	16,6	0,108	
h1	35,6	0,102	0,086±0,014
h2	24,6	0,075	
h3	25,2	0,079	
0	For lav		

Marmur-metoden ble gjennomført en tredje gang på samme måte som den andre gangen hvor det ble pipettert litt mindre vannfase fra kloroformfasen enn den første gangen. Nanodrop-målinger viste at nukleinsyrekonsentrasjoner var minst ved D og H, rundt 50 ng/ul og størst ved E, G og F hhv. over 500, 700 og rundt 1000ng/ul. Renheten til DNA var tilstrekkelig, ingen av prøvene hadde forholdstall for 260/280 under 1,7 og 260/230 under 1,5 unntatt C2 som var veldig lav. Forhøyet 260/230 ratio tyder på at metallioner ble knyttet til EDTA. Spektra så bra ut. Dette ble dokumentert i Tabell 28 og i spektrum i Figur 18.

Tabell 28 Nukleinsyrekonsentrasjoner og renhet etter isolasjon fra *A. wodanis* hypotetisk pleoforme bakterier, med Marmur sin metode i tredje forsøk.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
A1	205,44	1,92	2,49
A2	204,23	1,94	2,50
A3	288,10	1,93	2,47
B1	280,44	2,12	2,54
B2	325,84	2,12	2,52
B3	333,36	2,10	2,49
C1	89,34	1,87	2,47
C2	0,40	0,45	-0,44
C3	140,32	1,86	2,48
D1	37,29	2,14	2,54
D2	57,58	2,08	2,46
D3	63,44	2,17	2,53
E1	532,55	2,15	2,46
E2	581,23	2,15	2,45
E3	579,71	2,15	2,46
F1	1017,96	2,19	2,48
F2	1167,80	2,19	2,47
F3	977,98	2,19	2,47
G1	908,10	2,17	2,49
G2	773,50	2,15	2,49
G3	1216,24	2,17	2,49
H1	52,06	1,85	2,28
H2	55,07	1,93	2,41
H3	50,77	1,98	2,51
Blind prøven	0,77	1,55	-13,35



Figur 18 Spektra etter DNA ekstraksjon vha. Marmur sin metode som ble gjennomført på hypotetisk pleoforme bakterier tredje gang.

DNA ble undersøkt vha. Qubit som viste at laveste verdier av DNA per gram våte seller hadde D, H og F og høyeste B og A. Når det gjelder F så her vises det noe ganske annerledes enn hos Nanodrop. Kanskje det er bare RNA der nesten som tyder også høye 260/280 og 260/230 ratioene. Disse verdiene ble presentert i Tabell 29.

Tabell 29 Qubit DNA målinger av den tredje forsøk med hypotetisk pleoforme *A. wodanis* ved bruk av Marmur metode.

Prøve	DNA konsentrasjon ng/ul	mg DNA/g våte celler	Gjennomsnitt og standardavvik mgDNA/g våte celler
a1	220	0,846	0,792±0,070
a2	198	0,818	
a3	224	0,713	
b1	79,4	0,401	0,434±0,029
b2	97,8	0,457	

b3	97,6	0,444	
c1	98,4	0,313	0,257±0,233
c2	0,464	0,002	
c3	174	0,458	
d1	2,6	0,017	0,020±0,003
d2	3,88	0,020	
d3	4,58	0,022	
e1	36,2	0,129	0,141±0,018
e2	41	0,133	
e3	45	0,162	
f1	21,8	0,090	0,089±0,015
f2	26,2	0,103	
f3	20,4	0,073	
g1	63	0,263	0,268±0,018
g2	52,8	0,254	
g3	87,6	0,288	
h1	25	0,070	0,070±0,004
h2	26,6	0,073	
h3	24,6	0,066	
Blind prøven	Ute av rekkevidde (for lav)		

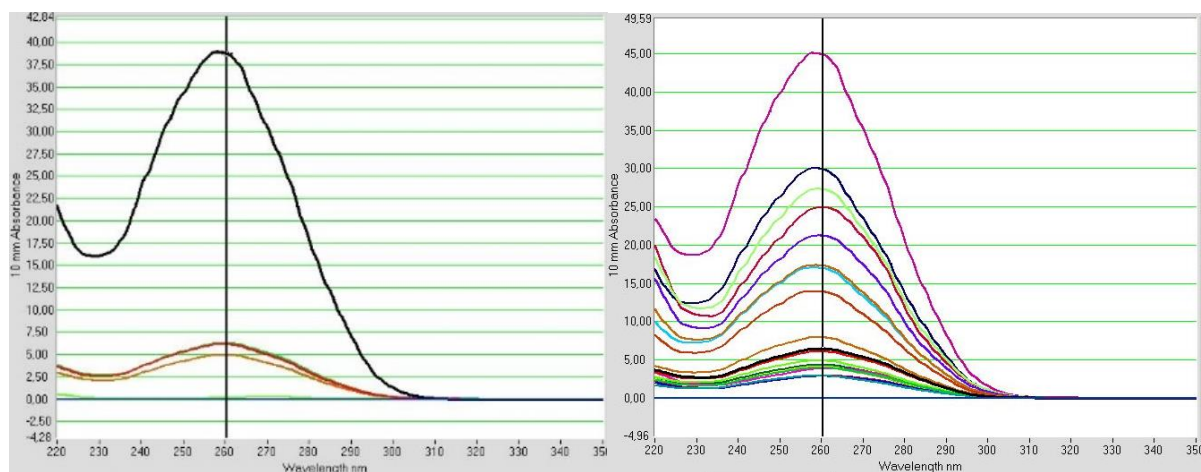
Isolering av DNA vha. modifisert van Helden fra *A. wodanis* dyrket på åtte ulike måter.

Etter at DNA fra hypotetisk pleoforme *A. wodanis* bakterier ble ekstrahert hva. Marmor, ble van Helden fenol-kloroform metoden utnyttet første gang med ny fenol:kloroform:isoamyl alkohol 25:24:1 utnyttet. Prøvene ble målt med Nanodrop og Qubit som vanlig.

Nanodrop viste ikke noen prøver med 260/280 under 1,7 heller ikke 260/230 under 1,5. Høye verdier på 260/280 som overstiger 2 tyder på RNA særlig B, F og G. Samtidig 260/230 som overstiger 2,2 kan skilles EDTA med metal ioner som senker 230 absorpsjon. Nanodrop målinger ble dokumentert i tabell 30 og på figur 19.

Tabell 30. Nanodrop målinger etter isolasjon av nukleinsyrer fra åtte hypotetisk pleoforme *A. wodanis* bakterier vha. mod. van Helden.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
A1	321,02	1,91	2,38
A2	301,61	1,91	2,41
A3	196,80	1,95	2,43
B1	395,80	2,10	2,40
B2	242,41	2,08	2,41
B3	143,62	2,12	2,39
C1	141,78	1,87	2,33
C2	190,76	1,82	2,13
C3	145,14	1,85	2,22
D1	215,71	2,05	2,38
D2	205,30	2,08	2,39
D3	195,00	2,08	2,39
E1	694,24	2,17	2,37
E2	864,97	2,19	2,28
E3	847,59	2,19	2,36
F1	1060,17	2,12	2,32
F2	1364,33	2,14	2,33
F3	1245,35	2,08	2,29
G1	1496,10	2,16	2,41
G2	2246,69	2,16	2,40
G3	1938,30	2,16	2,41
H1	306,09	2,05	2,35
H2	312,56	1,97	2,32
H3	247,14	2,00	2,34
Blind prøven	8,27	1,32	1,66



Figur 19 Spektra laget vha. Nanodrop av åtte hypotetiske pleoforme *A. wodanis* bakterier etter ekstraksjon med modifisert van Helden et al.-metoden.

DNA-konsentrasjon ble også målt vha. Qubit. Mest DNA gikk det å ekstrahere fra A, C og G, mens minst fra E og B, men standard avvik fra de to siste var relativt høy alt dette ble oppsummert i Tabell 31..

Tabell 31. Qubit-målinger av DNA med utregnet vekt til DNA per vekt av våte celler for åtte hypotetisk pleoforme *A. wodanis* etter mod. van Helden et al.-metoden.

Prøve	DNA konsentrasjon ng/ul	mg DNA/g våte celler	Gjennomsnitt og standardavvik av mgDNA/g våte celler
a1	220	2,62	2,46±0,42
a2	228	2,78	
a3	200	1,98	
b1	106	1,33	0,78±0,51
b2	60,6	0,70	
b3	35,6	0,32	
c1	336	2,33	2,27±0,24
c2	336	2,47	
c3	288	2,01	
d1	102	1,32	1,19±0,20
d2	88,4	0,96	
d3	104	1,28	
e1	164	1,20	0,69±0,51
e2	27,0	0,18	
e3	104	0,70	
f1	160	1,23	1,49±1,02
f2	95,2	0,62	
f3	400	2,61	
g1	316	2,93	2,03±0,80
g2	256	1,79	
g3	220	1,42	
h1	194	1,39	1,61±0,33
h2	292	1,99	
h3	191	1,46	
Blind prøven	0,208		

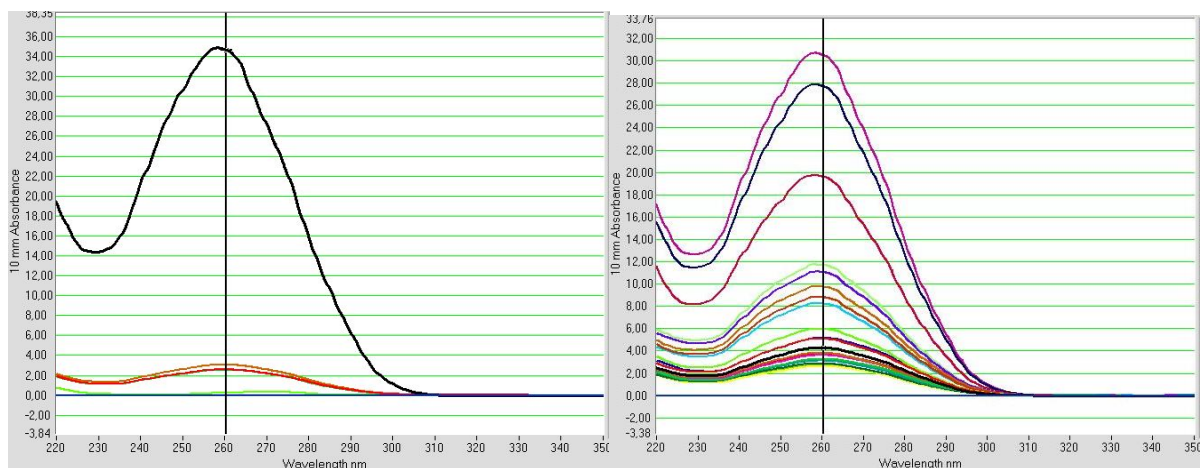
Isolering av DNA vha. van Helden-metoden fra *A. wodanis* dyrket på åtte ulike måter.

van Helden et al.-metoden ble benyttet andre gang, men da med SDS på åtte hypotetisk pleoforme *A.wodanis* bakterier. Det kan kanskje sees noen forskjeller sammenlignet med metoden når den ble brukt uten SDS.

Nanodrop-målinger viste at 260/280-forholdet ikke var lavere enn 1,70, men også særlig prøver med høyest konsentrasjon av nukleinsyre hadde forhøyet verdi over 2.0. Ratio 260/230 var kun forhøyet over 2.2 noe som sannsynligvis var på grunn av EDTA med Mg^{2+} og Ca^{2+} ioner (91). Det er sikkert at RNA også er i prøvene fordi RNA ikke ble fjernet. Disse data ble dokumentert i Tabell 32 og spektra i Figur 20.

Table 32 Resultater etter bruk av Nanodrop etter nukleinsyreekstraksjon fra åtte hypotetisk pleoforme *A. wodanis* vha. van Helden med SDS.

Prøven	Nukleinsyrer konsentrasjon (ng/ul)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
A1	214,09	1,89	2,40
A2	253,54	1,87	2,40
A3	163,58	1,83	2,36
B1	190,83	1,97	2,36
B2	297,90	2,00	2,38
B3	156,00	1,94	2,35
C1	257,44	1,85	2,37
C2	180,45	1,83	2,37
C3	186,99	1,85	2,36
D1	143,24	1,99	2,29
D2	131,16	1,97	2,29
D3	135,99	1,99	2,31
E1	439,86	2,09	2,39
E2	487,02	2,08	2,38
E3	411,57	2,07	2,37
F1	552,82	2,08	2,37
F2	585,21	2,08	2,37
F3	981,43	2,20	2,40
G1	1386,59	2,18	2,41
G2	1526,51	2,19	2,41
G3	1735,47	2,18	2,41
H1	128,18	1,92	2,25
H2	127,09	1,98	2,26
H3	152,67	1,97	2,28
Blind prøven	11,63	1,40	1,65



Figur 20. Spektra målt vha. Nanodrop etter isolasjon av nukleinsyre fra hypotetisk pleoforme bakterier *A. wodanis* ifølge van Helden et al. metoden med SDS.

Qubit målinger tydet på at mest DNA ble isolert fra A og C og minst fra H: hhv. $7,04 \pm 0,90$, $4,96 \pm 1,97$ og $0,43 \pm 0,03$. Den minste verdi er 16 ganger mindre enn den største. Alle verdier ble dokumentert i Tabell 33

Tabell 33 Qubit-målinger av DNA med DNA/vektenhet av våte celler av åtte hypotetisk pleoforme *A. wodanis* etter van Helden et al.-metoden med SDS.

Prøve	ng/ul	mg DNA/g våte celler	Gjennomsnitt og standardavvik av mgDNA/g våte celler
a1	441	7,88	7,04±0,90
a2	530	6,09	
a3	408	7,16	
b1	114	1,58	1,65±0,22
b2	174	1,91	
b3	98,4	1,47	
c1	780	7,22	4,96±1,97
c2	356	4,05	
c3	332	3,61	
d1	96,0	1,57	1,49±0,07
d2	91,6	1,43	
d3	92,0	1,48	
e1	260	2,86	2,30±0,50
e2	212	1,91	
e3	184	2,14	
f1	180	2,43	1,60±0,99
f2	142	1,87	

f3	56,2	0,50	
g1	166	2,05	2,14±0,14
g2	186	2,30	
g3	200	2,08	
h1	47,8	0,45	0,43±0,03
h2	47,4	0,43	
h3	46,0	0,40	
Blind prøven	Utenfor rekkevidde (for lav)		

Diskusjon

Del en; undersøkelse av ulike DNA-isoleringsmetoder

Grunnleggende forskning av DNA isolasjon og dens utvikling vha. utvalgte prosedyrer.

Når det gjelder grunnleggende teknikker så kort sagt ble det gjennomført mod. Marmor, Marmor, alkohol utfelling vs sentrifugering fart undersøkelse og Marmor andre gang. Gjentatte gjennomføringer av de manuelle metodene viste seg å gi nyttig erfaring for å etablere og optimalisere kjemiske DNA-isolasjonsmetoder som i begynnelsen gav sprikende resultater, noen få gode prøver, men også mange prøver med lave og forurensede DNA-verdier. Generelt sett tyder ganske varierende resultater på tilfeldige, heller enn mer systematiske feil.

Mangel av erfaring var årsak til flere feil, de to viktigste var som følger: for mye væske ble tatt ut fra kloroform- (eller fenol-kloroform-) fasen, og måten alkoholutfellingen

ble utført på. Den første feilen gjør at en tilfeldig mengde av proteiner, kloroform eller andre forbindelser kan komme seg videre i DNA-isolasjonsprosedyren. Prøver kan være urene blandinger av DNA med andre uønskede forbindelser som fenol, proteiner, eller det kan ødelegge hele ekstraksjonen hvis utfelt DNA blir sentrifugert mot en liten kloroform eller fenol dråpe som befinner seg helt på bunnen av røret. Da vil ikke pelleten med DNA feste seg til røret, men heller gå tapt med fraksjonen som fjernes.

Den andre feilen gjør at DNA-pelleten kan falle ut bare av uforsiktighet, særlig ved trinnene der væsken med alkoholer kastes, eller der 70% EtOH tilsettes kan pelleten bli væsket ut. Trinnet der prøvene tørkes er også viktig, fordi for tørt DNA er vanskelig å løse opp i buffer til slutt, og dermed er det heller ikke tilgjengelig for videre bruk. Heller ikke alkohol er ønskelig i prøven med DNA fordi den kan inhibere PCR eller andre anvendelsesområder.

Marmur #1

I prøvene fra denne kjøringen ble det sett en liten og varierende DNA-mengde som målt vha. Qubit. Den største utfordringen ved disse målingene, og et irriterende problem, var nemlig at DNA-mengden per vekt enhet av våte celler opptrådte på en så ulik måte. Merkelig nok var mengden av DNA isolert fra *E. coli*-prøvene ikke særlig større enn fra *S. pseudintermedius*. Det at det var mulig å få mye DNA fra den *S. pseudintermedius* (dog bare en av seks prøver) var imidlertid en god ting. Det kunne tyde på at under gode forhold, så kunne alle prøver bli like gode som nettopp den beste. Utfordringen er å skape sånne forhold. Ulike sentrifugeringsstyrker som ble valgt viste bare hvor vanskelig det er å vite hvilken styrke som var riktig å bruke.

Konklusjonen etter dette forsøket var å undersøke effekten av sentrifugeringshastigheten på alkoholutfelling av DNA litt nærmere. Dette ble gjort under både kald sentrifugering og vanlig sentrifugering. Denne delen av prosedyren kunne muligens lede til mulige feilkilder, og mens Marmur skrev om romtemperatur under DNA-utfelling fant jeg at mange andre forskere kjølte ned sine prøver.

Diskusjonsdelen etter Alkoholutfelling vs. sentrifugerings fart.

Det ser ut til at de mest stabile resultatene oppnås ved alkoholutfelling uten is ved 1500g, da noen resultater inneholder mer DNA etter utfelling enn før utfelling (særlig i prøvene der alkoholutfelling skjedde på is), noe som kan tyde på at klumper av DNA ble målt. Sånne klumper av ikke helt løst DNA kan gi falske målinger, og med så lavt antall prøver (som 5) klarer vi ikke å fastslå noe med særlig stor sikkerhet, men det som blir vist er derimot tendenser. Det ser ut til at jo sterkere sentrifugeringshastighet ved alkoholutfelling på is, desto mer sannsynlig er det at DNA klumper blir dannet. DNA-konsentrasjon ble også målt etter 4 dager i løsning, og disse klumpene var fremdeles tilstede, i særlig grad hvis sentrifugeringsstyrken var stor.

Uten is ble DNA-mengden lavere ved sterk sentrifugering, noe som kan bety at det var lett å miste pelletert DNA fra veggen under vasking. Kanskje den ble hardt klumpet sammen, og etterpå dermed lettere vasket vekk.

Det er mulig at selve tørketiden, sammen med isbehandlingen, bidro til at sånne klumper ble dannet. DNA ble satt til tørking i romtemperatur i ca. 10 timer (dvs. over natt) for å være sikker på at alt alkohol var borte. Dette kunne dessverre, sammen med inkubasjon på is, påvirke dannelsen av DNA-klumper. Den lange tørketiden ser ikke ut til å ha skapt slike problemer ved DNA-utfelling uten bruk av is.

Konklusjon er at resultater fra alkoholutfelling med is stort sett er varierende, der noen resultater er lave og noen høye, og derfor ikke kan stoles på i like høy grad. De beste resultatene ble oppnådd ved alkoholutfelling uten is, og ved sentrifugering ved 1500 g. Disse resultatene ble ganske like, og kan derfor ansees som pålitelige og troverdige.

Det kan vise seg viktig å passe på hvordan rørene blir plassert i sentrifuger ved lave hastigheter, siden pelleten vil plassere seg på en bestemt side. Dersom sidene blir snudd ved gjentatt sentrifugering vil pelleten lettere kunne falle ut.

Mest sannsynlig opplevde jeg, pga. for lang tørketid, at DNAet ble for tørt, og at det derfor ble dannet klumper ved kald EtOH-utfelling. Likevel kan sånne klumper tyde på at mer DNA ble samlet i en tykk pellet som var vanskelig å løse opp.

Marmur #2

Bruk av sentrifugeringsfart som bestemt vha. forrige undersøkelse var nyttig. Resultatene fra andre forsøk av Marmur-protokollen ga mye mindre variasjon enn det første forsøket. Dette var et tegn på at alkoholutfelling ved 1500g sentrifugeringstyrke var et bra valg. Sentrifugeringsfarten var forskjellen mellom første og andre gjennomføring av Marmur-metoden, men kanskje har stadig større forsiktighet spilt en rolle også.

Det var ikke mye proteinforurensning (260/280 nærmere 2 enn 1.8) som vist ved Nanodrop-målinger, men høy forekomst av RNA kan forhøye DNA-målinger, og derfor viste Nanodrop høyere DNA-konsentrasjoner enn hva Qubit-målingene gjorde. Ratio 260/230 var ganske varierende. Det var som regel prøver under 50ng/ul som viste slik variasjon, og det kan se ut som om en ikke burde stole noe særlig på slike prøver med konsentrasjon mindre enn 20ng/ul. Det er litt usikkert hvorfor det er slik. Kanskje vil mindre DNA gi mindre intens absorpsjon ved en gitt bølgelengde, slik at forurensninger som absorberer lys blir mer synlige og skaper en slags bakteppe effekt.

DNA-mengde fra *S. pseudintermedius* var fem ganger lavere enn for *E. coli*, noe som kan bety at den Gram negative *E. coli* er lettere å ekstrahere DNA fra enn den Gram positiv-*S. pseudintermedius*.

van Helden et al som eksempel på mer avansert DNA ekstraksjon metode

Resultater etter isolasjon av DNA fra *M. phlei* gav ikke så høyt DNA-utbytte, til tross for mye ressurser som ble brukt i ekstraksjonsprosessen (dvs. fenol og stor mengde proteinase K). Qubit viser mer nøyaktig mengde av DNA enn hva Nanodrop gjør, og målt DNA-konsentrasjon ved Qubit er ikke tilfredsstillende. Renheten til DNA som angitt i 260/280-ratio var rundt 1.8, noe som er et godt tegn.

Under ekstraksjonsprosessen ble det sannsynligvis gjort to feil som ble oppdaget senere: mangel av SDS i en av bufferne, og gammel fenol som hadde rosa istedenfor klar farge. Disse to feilene kunne svekke hele metoden betraktelig.

Ekstraksjonen med Qiagen-kit gav gjennomsnittlig $0,03 \pm 0,01$ mg DNA/g våte celler, mens van Helden gav gjennomsnittlig $0,038 \pm 0,023$ mg DNA per gram våte celler. Det er en litt større verdi, men samtidig er variasjonen nokså høy. Det store standardavviket skyldes at metoden var utført i en relativt tidlig fase, der jeg ikke hadde nok erfaring når det gjaldt alkohol-utfelling og det derfor oppstod mye tilfeldige feil. Jo mer erfaring med DNA-utfelling, desto lavere standardavvik. Kanskje det er verdt å notere at Qiagen-metoden kan ha litt forhøyet verdi fordi det ble brukt bakterieceller fra petriskål, mens de andre metodene tok utgangspunkt i bakterieceller som ble tatt ut fra ulike bakteriebuljonger. Større mengde gjenværende væske i de sistnevnte prøvene kan ha bidratt til å påvirke veiingen av utgangsmaterialet.

Uansett så jeg så lite forskjell mellom dem at det er vanskelig å argumentere for hvorfor en skal brukes fenolmetoden, da den er mye mer arbeidskrevende og krever mer og farlige ressurser. Allikevel ved bruk av den metoden kan det brukes mye mer celler enn ved Qiagen-metoden, dermed kan DNA-mengden bli blir mye større. Den kan dermed være god til dyrkbare bakterier. Til sist ble den også svekket av mangel av SDS og gammel fenol.

Modifisert van Helden utført på *M. phlei*.

Spektrum målt ved Nanodrop kan tyde på fenolforurensning, kanskje det ble pipetert for mye av vannfasen ut fra prøvene, slik at fenol også ble tatt med uten at det var synlig ved gjennomføringen av metoden. Selv lave mengder fenol kan forårsake sterke signaler, derfor er fenolforurensning en sannsynlig årsak til at Nanodrop viste blindprøvekonsentrasjon på rundt 80 ng/ul, mens Qubit kun målte 1,24 ng/ul. Det var mer urenheter i prøvene her enn vanlig for van Helden, noe som kan skyldes at større mengde fenol ble pipetert. Det kan derfor vise seg bedre å pipettere et mindre volum av vannfasen, heller enn å være for ivrig og pipettere for mye.

Det er mulig at å bare bruke proteinase K i begynnelsen og deretter bruke lysozym kunne gitt tilfredsstillende resultater, dvs. med motsatt rekkefølge av hva som er beskrevet i van Helden et al.. Bakgrunnen for dette er at den mykobakterielle celleveggen ganske tykk og inneholder mye spesielle proteiner som skal frakte viktige elementer for cellen gjennom den tykke veggen. De er derfor ikke vanlige proteiner, men unike og enda større enn hos andre bakterier(41). Det betyr at proteinase K kan lage store brudd i veggen siden proteinene er større. Det føles ikke riktig å bruke lysozym i begynnelsen fordi polypeptidoglykan ligger begravet inni i celleveggen og er beskyttet av mykologiske syrer.

Andre utvalgte metoder: Chelax 100, Kotlowski et al. og Patel et al.

Chelax 100

Det ble oppdaget ganske mye forurensninger vha. Nanodrop, og det så ut til at det kunne være vanskelig å estimere nøyaktig DNA-mengde i prøvene ekstrahert ved denne metoden. Kanskje det er lipopolysakkarider som ikke ble rensset godt nok. Disse kan påvirke målinger av DNA ved Nanodrop til en viss grad. Ratio 260/230 er sensitiv til alle slags stoffer og denne ble ganske lav i disse prøvene. Disse spektraene er et godt eksempel på hvordan renheten til DNA ikke bør se ut.

N. asteroides ga minst DNA, men samtidig var det vanskelig å få ut celler fra petriskål sammenlignet med *C. pseudotuberculosis* og *B. cereus*, der det var lett å skrape av materiale slik at mange celler ble tilsatt reagensrørene. Ulikt oppbygde cellevegger kan bety ulike kilder til forurensning i DNA-prøvene. Kanskje er det slik at korte polysakkarider og proteiner forblir løst i vannet og ikke lar seg konsentrere i pelleten som ble sentrifugert og fjernet.

DNA fra *S. pseudintermedius* er mer forurenset enn fra de andre bakteriene. Det er et mulig tegn på at celleveggen til *Staphylococcus* inneholder større mengder av polysakkarider som degraderes på grunn av varmen, mens de andre tre bakteriene kanskje har tykkere cellevegg med en annen sammensetning som ikke løser seg så godt under oppvarming. Det er vanskelig å vite den egentlige mengden av DNA ut fra disse målingene, og det er sannsynlig at den er lavere enn det som ble vist ved Nanodrop-målingene. En del av RNA blir tydelig særlig der hvor 260/280 ratio er nærmere 2.0 enn 1.8.

Denne metoden ble ikke tatt videre, men som ble sagt før er det likevel mulig å bruke Chelax-100 til å fjerne PCR-inhibitorer vha. lysis buffer(98) eller ved hjelp av ammoniumacetat og alkoholutfelling (62).

Modifisert Kotlowski et al.

Resultater fra modifisert Kotlowski var ikke tilfredsstillende. Det er to mulige feilkilder til dette: silika-kolonnene som ble brukt var annerledes enn de som ble brukt av Kotlowski, som brukte gel-silika istedenfor cellulose. Dessverre var det ingen silikacellulosekolonner tilgjengelige på markedet for bruk til denne oppgaven.

Den andre feilkilden var at fenolen som ble brukt til prosedyren var for gammel, og at den hadde pH på 8 som skiller seg fra den anbefalte pH på 6.9.

På grunn av lave DNA-konsentrasjoner slik det var her blir spektra lett påvirket av feilkilder, og renhetsmålinger blir dermed ikke pålitelige.

Patel et al.

DNA-konsentrasjonene i prøvene som målt ved Nanodrop var veldig lave. Det er likevel verdt å minne om og å understreke en grov feil som kan ødelegge mye.

Etter tilsetning av etanol og kjøling ved -20°C ble det oppdaget en gulaktig liten væskefraksjon helt på bunnen. Det kom sannsynligvis av at rester av kloroform fremdeles var

tilstede. Takket være pronase, som har rød farge, kunne det ses tydelig. Dette har forekommet før under tidligere forsøk og kunne være en betydelig feilkilde.

Det er ofte lett at for mye av vannfasen blir pipettert ut for å fange størst mulig mengde DNA, men det kan vise seg å bli en felle og en alvorlig feil som ødelegger hele jobben, siden DNAet ved sentrifugeringen blir presset mot den lille mengden av kloroform på bunnen i stedet for mot overflaten av røret, og slik lett kastet vekk sammen med væsken. (Det ville kanskje vært mulig å pipetterevekk også denne kloroformfraksjonen ved å føre pipetten helt ned til bunnen av røret før sentrifugeringen, men det ble ikke utført i dette forsøket).

Del to DNA isolasjon av hypotetisk pleoforme *A. wodanis* bakterier

Mikroskopbilder av *A. wodanis* påvirket av ulike medier

De ulike prøvene A-H ser litt ulike ut fra hverandre, noen ser ut som om de hadde en biofilm. Det er mulig at prøve D, som er full av staver og kokker, ble kontaminert underveis i forsøket. Bakteriekulturene ble sådd ut på blodskåler, og egentlig bør et så stort antall kokker burde være lett å se. Likevel kan kontaminasjon ikke utelukkes siden BHI med glukose og serum fra hest ble tilsatt etter dette. Dette er et næringsrikt medium, og det er lett å tenke at mange mikroorganismer vil kunne vokse godt der. Samtidig ser *A. wodanis* i de andre prøvene ikke likt ut. For eksempel kan A synes å ha en biofilm, der noen celler er større enn andre og fargene deres er ikke like. Det kan til en viss grad komme fra ulikt fokus, men ikke alt kan bli avklart på den måten.

Når det gjelder fiskesaus forsøk, kontaminasjon kan komme fra glyserol kanskje siden selve fiske saus ble filtrert med 0,22µl filter før bruk. Kontroll viste noen flekker. Fiske saus er laget av død rått fisk hvor bakterier gror på og blir drept ved å tilsette mye salt. Det betyr at den er full av rester fra ulike bakterie celler som etter hvert kunne gå i oppløsning. Disse kan bli farget. Det at det dukket opp mer intense og kompakte prikker på glass med *A. wodanis* i fiskesaus enn på kontroll er litt merkelig samt det at det ikke var noen staver å se der som om *A. wodanis* fantes ikke i denne prøven.

Modifisert van Helden utført på hypotetisk pleoforme H

A_{260}/A_{280} var rundt 1,6-1,7, noe som tyder på forurensning. I denne prosedyren er det mest sannsynlig fenol som bidrar til forurensning av prøver. Også blindprøven ble påvirket av

forurensning under ekstraksjonen og viste rundt 9 ng/ul DNA konsentrasjon etter måling med Nanodrop, mens Qubit bare 0,2ng/ul.

Besparende metode (P-L) ga rundt ti ganger mindre DNA enn den mod. Van Helden-metoden (L-P-L-P), men det kan fremdeles være verdt å gå videre med andre typer mer økonomiske metoder enn mod. Van Helden: L-P-L eller P-L-P.

Den besparende metoden burde funke siden tanken bak dette var at proteinase K lager hull i cellene, og etterpå kan lysozymet ødelegge polypeptidoglykan. Dersom bakterier må ha proteiner i veggen uansett, vil det ved å bruke proteinase K lages huller i veggen. Takket være dette blir andre deler av cellebeskyttelsen åpne for angrep. *Mycobacterium* har større proteiner enn vanlige bakterier(41) og derfor vil hullene kunne bli større enn hos andre bakterier.

Bakteriene så ikke ut til å holde seg i aggregater under prosedyren, prøvene så ut til å være som negativ kontroll uten tegn av celler etter tilsetning av lysozym. Dette var ulikt *Mycobacterium phlei*, som hadde en mer slimaktig konsistens ved samme trinn i prosedyren. Det kan tyde på at bakteriematerialet lettere gikk i oppløsning, og kanskje ble DNA også utsatt for skade, til tross for at EtOH trekker seg inn i celler og inhiberer DNaser(99).

Det var den siste prosedyren hvor DNA pellet ble vanskelig å løse, etter denne ble tørke tiden forkortet fra overnatt til rundt 10 minutter, og pelleter ble lettere å løse. Det var viktig fordi slike uløselige pelleter er vanskelig å måle vha. Nanodrop og Qubit.

Marmor-metoden gjennomført på åtte hypotetisk pleoforme *A. wodanis*-kulturer.

Det ser ut til at å pipettere mindre vannfase som befinner seg over protein- og kloroform-fasene kan lønne seg, siden andre og tredje gang tilbragte mye mer DNA enn første Marmor gjennomføring dvs der hvor det ble mindre volum av vannfasen tatt med. Det er mulig at kloroform blir pipettert med også uten at det blir sett, og at selve DNA-pelleten ikke vil bli presset mot bunnen når det utfelte DNAet er sentrifugert. Det er også mulig at protein blandet med DNA faller lettere ut fra rør enn hva renere DNA gjør, og at slike proteiner lettere suges inn i vannfasen når vannfasen nær kloroform pipetteres ut.

Som nevnt i diskusjonen om Patel et al.-metoden plasserte det seg da en liten dråpe farget væske på bunnen som ble synlig bare takket være fargede enzymer, derfor er det ikke umulig at sånne ting kan skje også her uten at det blir lagt merke til. Det ser ut til at jo mindre av vannfasen som ble pipettert, desto mer DNA var det igjen på slutten av prosedyren.

Det støtter hypotesen at pleoforme bakterier finnes siden DNA-mengdene i disse prøvene skiller seg tydelig fra hverandre. Dette kan ikke fullt og helt bli forklart av hvor lang tid prøvene ble oppbevart i etanol.

Prøvene ble dyrket ved ulike tidspunkter etter følgende rekkefølge (fra yngst til eldst): C, A og B samtidig, F og G samtidig, D og E samtidig, H. A og B tilbringer mye DNA, men C ikke så mye og D minst av alle til tross for at H er den eldste.

Resultater etter andre forsøk med Marmor viser at DNA mengde kom senkende fra A, B, E og etter det C, G, H, F, D. Altså F og D tilbragte minst DNA per gram våte celler. Det er store forskjeller mellom noen av disse bokstaver.

Resultater etter tredje DNA forsøk viser at DNA mengde kom senkende fra A, B, C, E, G, F, H, D.

Mellom de to forsøk er det forskjell i C vs E og H vs F som bytter plass med hverandre. Ellers er det likt. Det at C gav mer DNA den tredje gangen kan kanskje skyldes en oppvarming ekstra mellom sentrifugeringene under prøveopparbeidingen. Den ble gjort med tanken på å fjerne siste rester av gelatin altså vaske celler enda bedre.

Det er usikkert hvorfor F og H bytter plass.

Det kan alltid mistenkes at kolbene ble kontaminert av andre bakterier og sopp. Kanskje mediene var kontaminert, og at det derfor oppstår slike ulikheter. Det er umulig å utelukke dette fullstendig. Den verste mot argument kan stamme fra selve standardavvik. Det kan konkluderes at tre prøver av hver er for lite til å konkludere noe særlig når standardavvik er stor. Disse andre prøver som ikke ligner på hverandre med hensyn til DNA mengde per celle mengde kan skyldes på nettopp kontaminasjoner av prøver. For eksempel D som tilbringer mye mindre DNA kunne bli kontaminert med en annen bakterie eller sopp som er vanskelig å ekstrahere DNA fra og som har raskere vekst som *A. wodanis* og derfor kunne dominere mediet. Hvor sannsynlig det er blir det ikke lett å si, men mikroskop bildet viser kokker som ser ut på kontaminasjon.

Modifisert og ikke modifisert Van Helden et al. metoden utført på hypotetisk pleoforme *A. wodanis* bakterier.

Målingene av prøver vha. Nanodrop viser ganske ren nukleinsyre. Mange prøver ser ut til å ha mye RNA: B, F og G i mod. Van Helden, og bare F og G i Van Helden med SDS.

Den største mengden DNA per våte celler i mod. Van Helden har A, C, og G, mens de laveste verdiene ble sett hos E og B (med relativ stor spredning av de laveste som gjør at det ikke er sikkert). Van Helden med SDS hadde den høyeste verdien for DNA/våte celler i prøve A og C, mens den laveste ble sett i prøve H.

Det er mer DNA per vektenhet av våte celler generelt sett fra van Helden med SDS enn for modifisert van Helden for alle prøver unntatt H. Modifisert van Helden hadde omtrent dobbel så lang virketid for enzymene sammenliknet med van Helden. Kanskje den forlengede tiden hjalp til med å i større grad ødelegge celleveggen fra bakteriene i prøven H.

Sammenlikning av lave og høye mengder av ekstrahert DNA per gram våte celler, utbytte fra hypotetisk pleoforme

A. wodanis fra 0,9% fysiologisk vann og 0,9 LB mediet gav relativ høyt utbytte fra etter alle brukte metoder (Marmur , modifisert van Helden og van Helden). DNA-isolasjon fra *A. wodanis* dyrket i løsning B (0,9% NaCl vann og Leibowitz medium) ga relativ høyt DNA mengde bare etter Marmur-DNA-isolasjonsmetoden. Bakteriene som var i D løsning (serum fra hesteblood og BHI medium med glukose) gav relativt lavt DNA-utbytte etter Marmur-DNA-ekstraksjonsmetoden. Bakterier fra løsningene D og H (serum fra hesteblood) hadde aldri relativ høyt DNA utbytte.

Marmur 1 ble gjennomført ikke så godt som Marmur 2 og 3. Det kan være grunnen til at mange prøver hadde lav relativt utbytte i mange prøver og stor standard avvik.

Lave og høye resultater når det gjelder vekt av DNA per vekt celler fra alle metoder er sammenlignet i tabell 34.

Tabell 34 Lave (gul farge) og høye (grønn farge) verdier av DNA vekt per celle vekt fra alle ulike forsøk på å ekstrahere DNA fra hypotetisk pleomorfe bakterier *A. wodanis*.

	Marmur 1	Marmur 2	Marmur 3	Mod. Van Helden	SDS Van Helden
A	0,203±0,305	0,962±0,204	0,792±0,070	2,46±0,42	7,04±0,90
B	0,092±0,054	0,590±0,073	0,434±0,029		
C	0,007±0,003		0,257±0,233	2,27±0,24	4,96±1,97
D	0,005±0,002	0,003±0,001	0,020±0,003		
E	0,006±0,005				
F	0,009±0,003	0,004±0,001			
G	0,085±0,025		0,268±0,018	2,03±0,80	
H	0,014±0,003		0,070±0,004		0,43±0,03

Det er ikke vanskelig å tenke seg at forholdene lett kan bli påvirket av hva som helst. Ikke alt er mulig å holde fullstendig under kontroll, for eksempel faktorer som lysintensitet og trykk kan variere slik at ulike variabler til sammen kan utgjøre en kompleks miljømatriks der bakterier tilpasser seg ved å lage biofilm eller opptre på andre måter. Kanskje dette kan ha en betydning, men det er usikkert.

På den andre siden vil en uheldig blanding av kontaminasjoner og standardavvik kunne gjøre mengden DNA-utbytte per vekt av våte celler umulig å forutse. Selve de flytende mediene med rene kulturer av bakterier var undersøkt før de ble tilsatt til ulike A -H løsninger. Bakterier fra dem ble dyrket på blodagar, men kontaminasjoner kan ikke utelukkes.

Det er bra at etter hvert når prosedyrer blir gjentatt, ikke bare ved bruk av Marmur men også vha. Van Helden protokoller blir det isolert ganske rene nukleinsyrer. Det burde gjennomføres flere repetisjoner av van Helden metoden på hypotetisk pleoforme bakterier, på grunn av begrenset tid var det umulig.

Konklusjon

For å gjennomføre kjemisk ekstraksjon av DNA var det viktig å ikke pipettere ut for mye fra vannfasen fra fenol (eller kloroform). Alkoholutfelling var det best å utføre med stor forsiktighet sånn at pelleten ikke falt ut, og DNA-tørketiden burde bli ganske kort heller enn lang slik at DNA ikke blir for tørr. Van Helden- og Marmur-prosedyrene er, på grunn av god renhet av isolert DNA, trolig egnet til å bruke sammen med andre teknikker.

Tre av fem tilfeller av isolasjon av DNA fra prøvene H og D resulterte i lav mengde DNA mens prøvene A, B, C og G gav høy mengde DNA som målt i mg DNA per gram cellevekt. Likevel varierte det til en viss grad fra metode til metode.

Referanseliste

1. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 1999;2(3):299-305.
2. Pinto AC, Melo-Barbosa HP, Miyoshi A, Silva A, Azevedo V. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res*. 2011;10(3):1707-18.
3. Platt AR, Woodhall RW, Alfred L. George J. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*. 2007;43(1):58-62.
4. Tsang J. Identifying Bacteria Through Look, Growth, Stain and Strain2020 10.08.21]. Available from: <https://asm.org/Articles/2020/February/Identifying-Bacteria-Through-Look,-Growth,-Stain>.
5. Pepper IL, Gerba CP, Gentry TJ. *Environmental Microbiology*. Third ed: Elsevier; 2015.
6. Isenberg HD. *Clinical microbiology: past, present, and future*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):917-8.
7. Kämpfer P. Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012;101(1):3-11.
8. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the Intestinal Bacterial Composition in Hospitalized Preterm Infants in Comparison with Breast-Fed, Full-Term Infants. *Pediatric Research*. 2003;54(3):393-9.
9. Le MH, Wang D. Structure and membership of gut microbial communities in multiple fish cryptic species under potential migratory effects. *Scientific Reports*. 2020;10(1):7547.
10. Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(12):5368-82.
11. Cao Y, Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Front Microbiol*. 2017;8(1829).
12. Jagadeesan B, Gerner-Smidt P, Allard MW, Leuillet S, Winkler A, Xiao Y, et al. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology*. 2019;79:96-115.
13. Ekblom R, Galindo J. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*. 2011;107(1):1-15.
14. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med*. 1944;79(2):137-58.
15. Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*. 1961;192:1227-32.
16. Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*. 1984;224(4647):409-11.
17. Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol*. 1991;173(14):4371-8.
18. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook
2016 [updated Mai 2016. Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-kits/>.
19. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*. 2005;43 Spec No:93-100.

20. Preparation of Template for Automated DNA Sequencing: University of Michigan Medical School Biomedical Research Core Facilities; [updated 11.08.21. Available from: <https://brcf.medicine.umich.edu/cores/advanced-genomics/faqs/sanger-sequencing-faqs/how-to-prepare-dna/>].
21. Sample requirements The University of Edinburgh, Edinburgh Genomics; [Available from: <https://genomics.ed.ac.uk/resources/sample-requirements>].
22. Petroff SA, Steenken WJ. BIOLOGICAL STUDIES OF SAPROPHYTIC ACID-FAST ORGANISMS: I. Dissociation of *Mycobacterium phlei*. The Journal of Infectious Diseases. 1935;56 nr 3:277-87.
23. Hadley P. Microbic Dissociation: The Instability of Bacterial Species with Special Reference to Active Dissociation and Transmissible Autolysis Six Plates. The Journal of Infectious Diseases. 1927;40(1):1-312.
24. Mickiewicz KM, Kawai Y, Drage L, Gomes MC, Davison F, Pickard R, et al. Possible role of L-form switching in recurrent urinary tract infection. Nature Communications. 2019;10(1).
25. Errington J, Mickiewicz KM, Kawai Y, Wu LJ. L-form bacteria, chronic diseases and origins of life. Philosophical Transactions: Biological Sciences. 2016;371(1707):1-8.
26. Kawai Y, Mickiewicz K, Errington J. Lysozyme Counteracts β -Lactam Antibiotics by Promoting the Emergence of L-Form Bacteria. Cell. 2018;172(5):1038-49.e10.
27. Muthukumarasamy R, Revathi G, Loganathan P. Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Plant and soil. 2002;243(1):91-102.
28. Castillo DJ, Rifkin RF, Cowan DA, Potgieter M. The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2019;9(148).
29. Kubica PG, Beam RE, Palmer JW. A method for the isolation of unclassified acid-fast bacilli from soil and water. 1963 November 1963. Contract No.: 5.
30. Stokas H, Rhodes HL, Purdy GE. Modulation of the *M. tuberculosis* cell envelope between replicating and non-replicating persistent bacteria. Tuberculosis. 2020;125:102007.
31. Queiroz A, Riley LW. Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2017;50(1):9-18.
32. Vincent AT, Nyongesa S, Morneau I, Reed MB, Tocheva EI, Veyrier FJ. The *Mycobacterium* Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution? Front Microbiol. 2018;9:2341-.
33. Gram-negative bakterier [Internet]. UiO. 2011 [cited 26.07.21]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gramne.html>.
34. Tanaka S, Hoshino Y, Sakagami T, Fukano H, Matsui Y, Hiranuma O. Pathogenicity of *Mycobacterium phlei*, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies: a case report. BMC Infectious Diseases. 2019;19(1).
35. Stephenson M, Whetham MD. Studies in the fat metabolism of the timothy grass bacillus. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character. 1922;93(652):262-80.
36. Coghill RD. THE NUCLEIC ACID OF THE TIMOTHY BACILLUS. Journal of Biological Chemistry. 1931;90(1):57-63.
37. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev Sci Tech. 2001;20(1):21-54.
38. Batt SM, Minnikin DE, Besra GS. The thick waxy coat of mycobacteria, a protective layer against antibiotics and the host's immune system. Biochem J. 2020;477(10):1983-2006.
39. Bernatek ER. Voks [Available from: <https://snl.no/voks>].
40. Furuya T, Ishii Y, Noda K-i, Kino K, Kirimura K. Thermophilic biodesulfurization of hydrodesulfurized light gas oils by *Mycobacterium phlei* WU-F1. FEMS Microbiology Letters. 2003;221(1):137-42.
41. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. Trends in Microbiology. 2010;18(3):109-16.

42. PROMÉ J-C, LACAVE C, AHIBO-COFFY A, SAVAGNAC A. Séparation et étude structurale des espèces moléculaires de monomycolates et de dimycolates de α -D-tréhalose présents chez *Mycobacterium phlei*. *European Journal of Biochemistry*. 1976;63(2):543-52.
43. Suutari M, Laakso S. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. *Archives of Microbiology*. 1993;159(2):119-23.
44. Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res*. 2006;37(2):201-18.
45. Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vanechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55(4):1569-73.
46. Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P, Hodille E, Bes M, Vandenesch F, et al. Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;8(221).
47. Lunder T, Sørum H, Holstad G, Steigerwalt AG, Mowinckel P, Brenner DJ. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50 Pt 2:427-50.
48. Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(Pt 12):2823-9.
49. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. *Prescott's Microbiology*. Tenth ed. New York: McGraw Hill; 2017.
50. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113(5):1014-26.
51. Marmur J. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*. 1961;3(2):208-18.
52. About Dr. Julius Marmur New York: Albert Einstein College of Medicine; 2021 [Available from: <https://www.einsteinmed.org/education/phd/current-students/events/julius-marmur-symposium.aspx>].
53. Pederson T. Paul Doty and the Modern Era of DNA as a Molecule. *The FASEB Journal*. 2012;26(3):967-8.
54. Sevag MG, Lackman DB, Smolens J. THE ISOLATION OF THE COMPONENTS OF STREPTOCOCCAL NUCLEOPROTEINS IN SEROLOGICALLY ACTIVE FORM. *Journal of Biological Chemistry*. 1938;124(2):425-36.
55. Hotchkiss RD. [102] Isolation of sodium deoxyribonucleate in biologically active form from bacteria. *Methods in Enzymology*. 3: Academic Press; 1957. p. 692-6.
56. Saito H, Miura KI. PREPARATION OF TRANSFORMING DEOXYRIBONUCLEIC ACID BY PHENOL TREATMENT. *Biochim Biophys Acta*. 1963;72:619-29.
57. Van Helden DP, Victor CT, Warren MR, Van Helden GE. Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis*. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Mycobacterium tuberculosis* Protocols. *Methods in molecular medicine*. 54. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2001.
58. QIAGEN Purification Technologies: Qiagen; [Available from: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/plasmid-resource-center/qiagen-purification-technologies>].
59. Membrane Spin Columns: BIOPOLYMER ISOLATION TECHNOLOGIES, LLC; [Available from: <https://bpi-tech.com/spin-columns/Silica>].
60. Kotłowski R, Martin A, Ablordey A, Chemlal K, Fonteyne P-A, Portaels F. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *Journal of Medical Microbiology*. 2004;53(9):927-33.

61. Patel R, Kvach JT, Mounts P. Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. *J Gen Microbiol.* 1986;132(2):541-51.
62. Singh UA, Kumari M, Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online.* 2018;20:12.
63. Hershey AD, Burgi E. Molecular homogeneity of the deoxyribonucleic acid of phage T2. *Journal of Molecular Biology.* 1960;2(3):143-52.
64. Raaflaub J. Applications of Metal Buffers and Metal Indicators in Biochemistry. *Methods of Biochemical Analysis* 1956. p. 301-25.
65. Dominguez K, Ward WS. A novel nuclease activity that is activated by Ca(2+) chelated to EGTA. *Syst Biol Reprod Med.* 2009;55(5-6):193-9.
66. Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris Sigma; [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/301/225/106bbu1.pdf>].
67. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character.* 1922;93(653):306-17.
68. Kirby AJ. *Nature Structural Biology.* 2001;8(9):737-9.
69. Davies RC, Neuberger A, Wilson BM. The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology.* 1969;178(2):294-305.
70. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album Limber.* *European Journal of Biochemistry.* 1974;47(1):91-7.
71. Betzel C, Pal GP, Saenger W. Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution. *European Journal of Biochemistry.* 1988;178(1):155-71.
72. Sreenivasaya M, Pirie NW. The disintegration of tobacco mosaic virus preparations with sodium dodecyl sulphate. *Biochemical Journal.* 1938;32(10):1707-10.
73. Tan A, Ziegler A, Steinbauer B, Seelig J. Thermodynamics of Sodium Dodecyl Sulfate Partitioning into Lipid Membranes. *Biophysical Journal.* 2002;83(3):1547-56.
74. Defalque RJ, Wright AJ. Was Chloroform Produced before 1831? *Anesthesiology.* 2000;92(1):290-1.
75. Silverstein TP. The hydrophobic effect: is water afraid, or just not that interested? *ChemTexts.* 2020;6(4).
76. Silverstein T. The Real Reason Why Oil and Water Don't Mix. *Journal of Chemical Education - J CHEM EDUC.* 1998;75.
77. Kovacs H, Mark AE, Johansson J, Van Gunsteren WF. The effect of environment on the stability of an integral membrane helix: Molecular dynamics simulations of surfactant protein C in chloroform, methanol and water. *Journal of Molecular Biology.* 1995;247(4):808-22.
78. Hartsough DS, Merz KM. Protein dynamics and solvation in aqueous and nonaqueous environments. *Journal of the American Chemical Society.* 1993;115(15):6529-37.
79. Kleinert M, Barth T. Phenols from Lignin. *Chemical Engineering & Technology.* 2008;31(5):736-45.
80. Mayer RJ, Breugst M, Hampel N, Ofial AR, Mayr H. Ambident Reactivity of Phenolate Anions Revisited: A Quantitative Approach to Phenolate Reactivities. *The Journal of Organic Chemistry.* 2019;84(14):8837-58.
81. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 1987;162(1):156-9.
82. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols.* 2006;1(2):581-5.
83. Xu L, Sun L, Guan G, Huang Q, Lv J, Yan L, et al. The effects of pH and salts on nucleic acid partitioning during phenol extraction. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2019;38(4):305-20.
84. Sambrook J, Russell D, W. *Molecular Cloning*

A Laboratory Manual. Third ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

85. Crouse J, Amorese D. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus*. 1987;9:3-5.
86. Williams D, Fleming I. *Spectroscopic methods in Organic Chemistry*. 6 ed: McGraw-Hill; 2008.
87. O'Neill M, McPartlin J, Arthur K, Riedel S, McMillan N. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *Journal of Physics: Conference Series* 307 (2011). 2011.
88. Schmid F-X. *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. eLS2001.
89. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical Note 52646 ThermoScientific. 2015.
90. Spectrophotometry

Handbook. Buckinghamshire: GE Healthcare UK Limited; 2013.

91. Koetsier G, Cantor E. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. Technical note [Internet]. 2019:[8 p.]. Available from: http://www.bioke.com/blobs/downloads/NEB/MVS_Analysis_of_NA_Concentration_and_Purity.pdf.
92. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 1997;22(3):474-81.
93. RNA/DNA Quantification: Thermo Fisher Scientific; [Available from: https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html?gclid=CjwKCAjw092lBhAwEiwAxR1lRkUm5PHcLIYhX_aEaBFXKTK737d49WnSHa1vtqm4EwGo07LGLRNdmRoCPaoQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjw092lBhAwEiwAxR1lRkUm5PHcLIYhX_aEaBFXKTK737d49WnSHa1vtqm4EwGo07LGLRNdmRoCPaoQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!537634827299!p!!g!!dna%20quantification&cid=bid_pca_aqb_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con].
94. Qubit dsDNA BR Assay Kits: Life technologies; 2015 [Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf].
95. Labs S. How To: DNA Precipitation. Seeding Labs; 2019.
96. Jenkins R, Maddocks S. *Bacteriology methods for the study of infectious diseases*. London, San Diego, Cambridge, Oxford: Academic Press; 2019.
97. Söderberg JJ, Grgic M, Hjerde E, Haugen P. *Aliivibrio wodanis* as a production host: development of genetic tools for expression of cold-active enzymes. *Microb Cell Fact*. 2019;18(1):197-.
98. Chakravorty S, Tyagi JS. Novel use of guanidinium isothiocyanate in the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from clinical material. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;205(1):113-7.
99. King JR, Porter SD. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*. 2004;51:197-202.



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway