



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie

BACHELORPROEF

**OPTIMALISATIE LAMP-PROTOCOL VOOR
DETECTIE VAN BACTERIEVUUR**



Saartje Swennen

Academiejaar 2015-2016

Promotoren

Dr. Ir. Serge Remy
Ir. Hilde Schoofs
Dr. Ir. Tony Remans

Proefcentrum Fruitteelt vzw
Proefcentrum Fruitteelt vzw
Hogeschool PXL



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie

BACHELORPROEF

**OPTIMALISATIE LAMP-PROTOCOL VOOR
DETECTIE VAN BACTERIEVUUR**



Saartje Swennen

Academiejaar 2015-2016

Promotoren

Dr. Ir. Serge Remy
Ir. Hilde Schoofs
Dr. Ir. Tony Remans

Proefcentrum Fruitteelt vzw
Proefcentrum Fruitteelt vzw
Hogeschool PXL

Voorwoord

In het kader van mijn opleiding Agro- en Biotechnologie, afstudeerrichting cel- en gentechnologie, ben ik bezig aan mijn laatste jaar. Als voorbereiding op het werkveld en afsluiting van deze opleiding wordt in het tweede semester een stage gevolgd. Mijn stage gebeurde in het Proefcentrum Fruitteelt VZW te Sint-Truiden.

Binnen de afdeling pomologie in pcfruit wordt er onderzoek gedaan naar de vernietigende plantenziekte bacterievuur, veroorzaakt door de bacterie *Erwinia amylovora*. In pcfruit willen ze in de toekomst gebruik maken van LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) om bacterievuur snel te kunnen detecteren op het veld. Het doel van deze stage was het verkrijgen van geoptimaliseerde DNA-isolatie protocollen voor zowel bacteriële stalen als plantenmateriaal. Dit DNA moet van voldoende kwaliteit zodat het kan dienen als template voor LAMP.

Ik heb tijdens mijn bachelorstage veel bijgeleerd, zowel op vlak van praktijk als op sociaal vlak. Hiervoor wil ik dan ook eerst en vooral mijn stagebegeleider op pcfruit bedanken, Serge Remy. Verder wil ik ook Hilde Schoofs bedanken van pcfruit. Zij hebben mij zowel op praktijkvlak als inhoudelijk verder geholpen tijdens het verloop van mijn stage. Ik wil ook mijn PXL-promotor, Tony Remans, bedanken voor de feedback en inhoudelijke hulp bij het schrijven van mijn scriptie.

Samenvatting

Het Proefcentrum Fruitteelt vzw te Sint-Truiden is internationaal erkend onderzoekscentrum dat speciaal ontwikkeld werd voor zowel de fruittelers, onderzoekers als bedrijven. Binnen pcfruit zijn er verschillende onderzoeksgroepen te onderscheiden die elk hun eigen taken hebben; pomologie, zoölogie, mycologie en milieu en techniek. De bachelorproef beschreven in deze scriptie heeft zich afgespeeld binnen de afdeling pomologie waar er twee belangrijke hoofdaspecten naar voren komen. Hier wordt er gewerkt aan milieuvriendelijke teelttechnieken en de studie van de bacteriële plantenziekten in de fruitteelt. In deze scriptie zal het meer bepaald gaan over bacterievuur.

Bacterievuur is een verwoestende plantenziekte die een heel grote economische impact heeft op de fruitteelt en meer bepaald appels en peren. De veroorzaker is de bacterie *Erwinia amylovora*, welke geklasseerd staat als een quarantaine organisme. De naam bacterievuur is afgeleid van de symptomen, deze doen denken aan het verschroeien door vuur. Er treedt een kleurverandering op van de bladeren van groen naar bruin of zelfs zwart. Ook de snelheid waarmee een bacterievuur infectie zich kan uitbreiden, doet denken aan vuur.

Het doel van deze bachelorproef was het verkrijgen van geoptimaliseerde DNA-extractie methodes voor zowel bacteriële als plantenstalen. Er worden telkens twee DNA extractie protocollen getest waarvan één gemeenschappelijk CTAB-DTT protocol. Op die manier kan bepaald worden of dit CTAB-DTT optimaal *E. amylovora* DNA zal kunnen extraheren uit geïnfecteerde bloemenstalen. Dit geïsoleerde DNA moest van voldoende kwaliteit zijn om de Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) te kunnen uitvoeren. LAMP is een snelle amplificatietechniek die het mogelijk maakt om stalen rechtstreeks in het veld te kunnen analyseren, dit doordat de reactie doorgaat op één temperatuur.

Voor de bacteriële DNA-extractie werd gebruik gemaakt van twee protocollen, namelijk (I) Cheng & Jiang 2006 Extremely rapid DNA extraction from bacteria and yeasts en (II) CTAB-DTT protocol gebaseerd op het CTAB-DTT banana leaf DNA isolation protocol (Khayat *et al.*, 2004) en het CTAB based Micromonos DNA isolation protocol. Deze twee protocollen werden met elkaar vergeleken om te bepalen welke de beste resultaten gaf. Hetzelfde werd uitgevoerd voor het plantenmateriaal. Ook hier werden twee methodes met elkaar vergeleken, namelijk (I) het Khayat *et al.*, 2004 CTAB-DTT DNA extractie protocol en (II) Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene.

Een volgende onderdeel is het uitvoeren van de LAMP. Tijdens de uitvoering werd op een probleem gestoten. Er werden bij elke test vals positieve resultaten bekomen, wat duidt op contaminatie. Er werden vervolgens heel wat testen uitgevoerd om de oorzaak van deze contaminatie te achterhalen. Zo werden er nieuwe primers besteld, een nieuwe Isothermal Mastermix werd gebruikt, de strips werden geautoclaveerd enzovoort. Uiteindelijk werd in de laatste week van de stage heel het quarantaine labo ontsmet met javel en het LAMP-toestel werd verplaatst naar een andere ruimte. Ook werd er een mastermix besteld welke al alle componenten bevatte. Dit gaf uiteindelijk wél een negatief resultaat waaruit besloten kon worden dat er inderdaad een contaminatie aanwezig was in het quarantaine labo.

Het werk uitgevoerd tijdens deze bachelorstage heeft een goed toekomstbeeld. Door de geoptimaliseerde DNA-isolatie protocollen samen met de LAMP-techniek te gebruiken, kunnen zeer snel resultaten bekomen worden (in ongeveer twee uur). Aangezien bacterievuur zich snel kan verspreiden, is het een groot voordeel dat een snelle diagnose gesteld kan worden.

Inhoudstabel

Voorwoord	2
Samenvatting	3
Inhoudstabel	4
Lijst met afkortingen	7
1. Inleiding.....	8
2. Literatuurstudie.....	9
2.1. Erwinia amylovora.....	9
2.1.1. Ziektecyclus symptomen	9
2.1.2. Verspreiding	11
2.2. Bacterievuur	11
2.2.1. Preventie	12
2.2.2. Bestrijding.....	12
2.3. Veiligheid: werken met een quarantaine organisme.....	13
2.4. Klassieke detectiemethoden	13
2.5. Moleculaire detectiemethoden	14
2.5.1. DNA-isolatie bacterieel.....	14
2.5.2. DNA-isolatie plantenmateriaal.....	15
2.5.3. Moleculaire detectiemethoden toegepast op pathogenen algemeen.....	15
2.5.4. Moleculaire detectiemethoden toegepast op <i>E. amylovora</i>	15
3. Materialen en methoden	21
3.1. Flowschema.....	21
3.2. LPGA voedingsmedium	21
3.2.1. Materialen.....	21
3.2.2. Methoden.....	22
3.3. Subculturen bacteriën.....	22
3.3.1. Materialen	22
3.3.2. Methoden.....	23
3.4. DNA-extractie bacterieel DNA volgens 'Cheng & Jiang 2006'	24
3.4.1. Materialen	24
3.4.2. Methoden.....	26
3.5. DNA-extractie bacterieel DNA volgens CTAB-DTT gebaseerd protocol.....	28
3.5.1. Materialen.....	28
3.5.2. Methoden.....	30

3.6.	Staalname geïnfecteerde bloemenstalen	31
3.6.1.	Materialen	32
3.6.2.	Methoden.....	33
3.7.	DNA-extractie plantenmateriaal volgens CTAB-DTT gebaseerd protocol.....	34
3.7.1.	Materialen	34
3.7.2.	Methoden.....	36
3.8.	DNA-extractie plantenmateriaal volgens Plant Material DNA Extraction Kit	37
3.8.1.	Materialen	37
3.8.2.	Methoden.....	38
3.9.	Spiken van stalen.....	38
3.9.1.	Materialen	38
3.9.2.	Methoden.....	39
3.10.	Meting DNA-concentratie en zuiverheid via Multiskan GO	39
3.10.1.	Materialen	39
3.10.2.	Methoden.....	40
3.11.	Agarose gelelektroforese	42
3.11.1.	Materialen	42
3.11.2.	Methoden.....	43
3.12.	LAMP	44
3.12.1.	Materialen	44
3.12.2.	Methoden.....	46
3.13.	LAMP uitgevoerd op qPCR-toestel	47
3.13.1.	Materialen	47
3.13.2.	Methoden.....	47
3.14.	Statistiek T-toets	49
3.14.1.	Materialen	49
3.14.2.	Methoden.....	49
4.	Resultaten en discussie	50
4.1.	Uitplatingen.....	50
4.2.	Metten van DNA-concentraties aan de hand van een standaardcurve van λ -DNA met de spectrofotometer	51
4.3.	Resultaten bacteriële DNA-extracties	52
4.3.1.	Resultaten van de bacteriële DNA-extracties volgens Cheng & Jiang 2006	52
4.3.2.	Resultaten van de bacteriële DNA-extracties volgens het CTAB-DTT protocol (<i>Khayat et al., 2004</i>)	53
4.3.3.	Vergelijking Cheng & Jiang 2006 en CTAB-DTT protocol (<i>Khayat et al.,2004</i>)....	57

4.3.4.	Resultaten gelelektroforese van bacterie DNA stalen	59
4.4.	DNA-extracties van niet-geïnficeerd plantenmateriaal	60
4.4.1.	Resultaten van de DNA-extracties van niet-geïnficeerd plantenmateriaal volgens CTAB-DTT (Khayat <i>et al.</i> , 2004) protocol	60
4.4.2.	Resultaten van de DNA-extracties volgens de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene	63
4.4.3.	Vergelijking van CTAB-DTT protocol (Khayat <i>et al.</i> , 2004) en de Plant Material DNA Extraction Kit.....	64
4.4.4.	Resultaten gelelektroforese van niet-geïnficeerde plantenstalen	67
4.5.	DNA-extracties van geïnficeerde bloemenstalen	69
4.5.1.	Resultaten van de DNA-extractie van geïnficeerd plantenmateriaal volgens CTAB-DTT (Khayat <i>et al.</i> , 2004) protocol.....	69
4.5.2.	Resultaten van de DNA-extractie van geïnficeerd plantenmateriaal volgens de Plant Material DNA Extraction Kit.....	69
4.5.3.	Vergelijking CTAB-DTT protocol (Khayat <i>et al.</i> , 2004) en Plant Material DNA Extraction Kit voor geïnficeerd plantenmateriaal.....	69
4.6.	LAMP	71
4.6.1.	Experiment 1: werking toestel	71
4.6.2.	Experiment 2: oorzaken contaminatie	73
5.	Conclusie	82
	Bibliografie	83
	Figurenlijst.....	86
	Tabellenlijst	89

Lijst met afkortingen

BCO	Biologische controle organismen
BIP primer	Backward Inner Primer
B3 primer	Backward Outer Primer
DNA	Deoxyribonucleic acid (desoxyribonucleïnezuur)
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organisation
F	Fluorofoor
FIP primer	Forward Inner Primer
F3 primer	Forward Outer Primer
HEPA	High Efficiency Particulate Air
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LoopF primer	Loop Forward Primer
LoopR primer	Loop Reverse Primer
PCR	Polymerase chain reaction
PM	Primermix
Rv	Relatieve vochtigheid
Q	Quencher
Q-labo	Quarantaine labo
qPCR	Quantitative PCR
UV licht	Ultraviolet licht

1. Inleiding

In deze scriptie ligt de focus op het optimaliseren van een snelle detectiemethode van de verwoestende plantenziekte bacterievuur, veroorzaakt door de bacterie *Erwinia amylovora*. Deze bacterie veroorzaakt het verwelken van planten, voornamelijk appels en peren. De ziekte kan zich zo snel verspreiden dat soms hele boomgaarden er moeten aan geloven. Het snel kunnen detecteren van deze bacterie in een staal is dus zeer belangrijk.

De methode die in deze paper toegepast wordt is de Loop-Mediated Isothermal Amplification of ook wel LAMP genoemd. Het is een amplificatiemethode voor DNA, net zoals PCR. Echter gaat de reactie bij LAMP door op slechts één temperatuur waardoor het hele proces veel sneller kan verlopen. In combinatie met geoptimaliseerde, snelle DNA-isolatie protocollen is deze techniek ideaal om rechtstreeks in het veld te gebruiken voor de detectie van *E. amylovora*.

Behalve informatie over de bacterie, de ziektesymptomen en de verspreiding worden ook de principes van de LAMP-techniek en de qPCR ter vergelijking aangehaald. Verder zullen de verschillende geteste DNA-isolatie protocollen voor zowel bacteriële stalen als voor plantenmateriaal besproken worden. De uitvoering van zowel LAMP als qPCR worden uitgebreid beschreven waaruit een aantal belangrijke conclusies getrokken werden.

2. Literatuurstudie

2.1. *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora is gekend als de veroorzaker van bacterievuur. Het is een Gram-negatieve enterobacterie en wordt geclassificeerd als een quarantaine organisme door zijn vernietigende effecten op appel- en perenboomgaarden [1].



Figuur 1 Elektronen microscoop opname van een *Erwinia* bacteriecel met duidelijk waarneembare flagella. Lijn komt overeen met 1 μm . [7]

E. amylovora is een bewegelijke, facultatief anaerobe, niet-sporenvormende bacterie, die vaak ecologisch gelinkt wordt aan planten, voornamelijk appel- en perenbomen. De bacteriën zijn staafvormig en hebben een grootte van ongeveer 0.3 – 1-3 micrometer (figuur 1). Ze kunnen zowel alleen, in paren of in korte kettingen voorkomen. Hun bewegelijkheid wordt mogelijk gemaakt door twee tot zeven flagella per cel [2] [3] [4].

2.1.1. Ziektecyclus symptomen

E. amylovora kan zware symptomen teweeg brengen bij zijn gastheer. Zo zullen bladeren verwelken en de scheuten zullen een kleurverandering ondergaan van groen naar bruin of zelfs zwart, afhankelijk van de gastheer. Op de scheuten kunnen ook bacterieslijm en kankers waargenomen worden. Planten die zeer sterk geïnfecteerd zijn, zullen de infectie niet overleven.

Het verloop van de infectie hangt zeer sterk af van het klimaat en de weersomstandigheden. Er kunnen seizoenen voorkomen met zeer vele en ernstige bacterievuur infecties, en andere jaren met maar lage infectieaantallen. In gunstige weersomstandigheden en infectievoorwaarden kan deze bacterie zich zeer snel uitbreiden (de generatietijd van *E. amylovora* is gemiddeld 82 minuten) en veel bomen aantasten. Hierdoor komen fruitteilers vaak voor een verrassing te staan. De optimale omstandigheden voor *E. amylovora* zijn een temperatuur van 18°C tot 24°C. Ook vochtig weer (70-90% RV) en voldoende neerslag (vanaf 2,5 mm) zorgen voor optimale groeiomstandigheden. Hiernaast komen in de zomer ook geregeld onweersperiodes voor, en in combinatie met hagel zal dit de vruchten beschadigen waardoor er makkelijk een infectie zal kunnen optreden door de open wonden [5] [6] [3].



Figuur 2 Vorming van slijmdruppels (links en rechtsonder) en slijmraden (rechtsboven) door *Erwinia amylovora* in het begin van de lente [5].

Primaire infectie

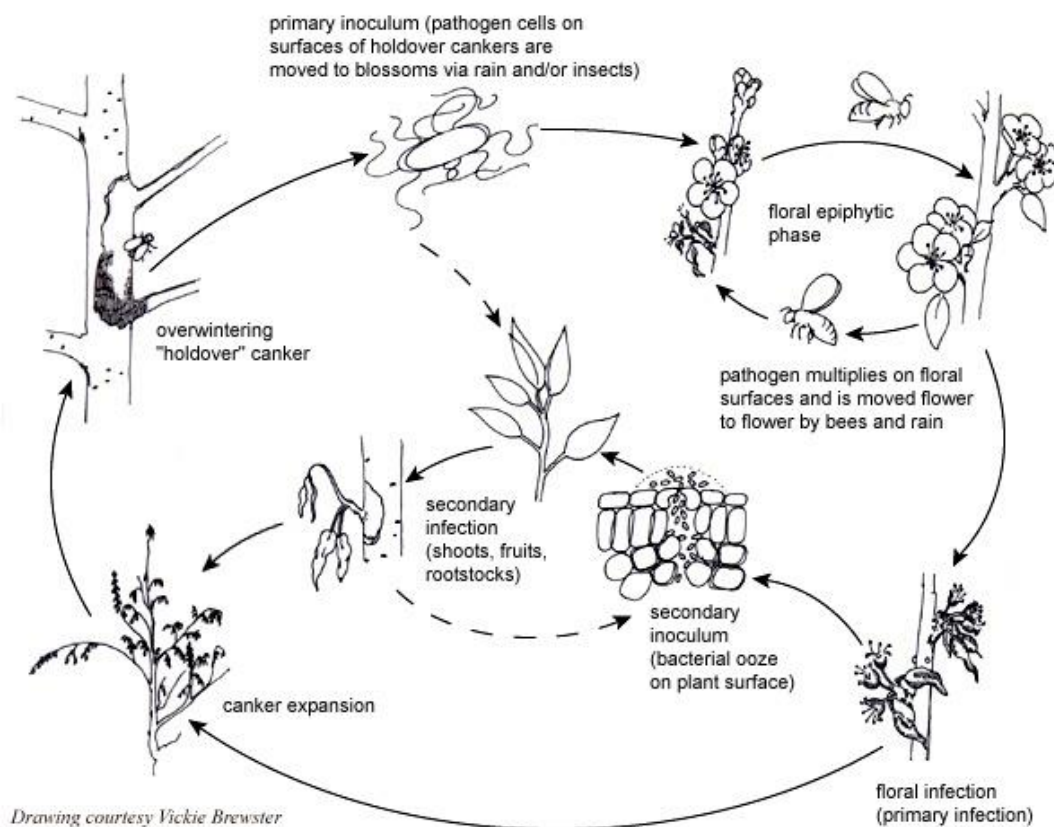
Overwintering

De eerste fase van de cyclus zijn de bacteriën die overwinteren in kleine percentages aan de rand van de overwinteringskankers die tijdens het groeiseizoen gevormd worden. Wanneer het lente wordt, zullen deze bacteriën zich snel gaan vermenigvuldigen door de stijgende temperaturen (vanaf half april tot eind

september). Vrije bacteriecellen komen los op de schors. Eerst uit dit zich in slijmdruppels of – draden (zie figuur 2). Deze druppels en draden zullen vervolgens passief verspreid worden door insecten, regen en wind. Op deze manier kunnen zo de bloemen, jonge scheuten en vruchten (via de huidmondjes) geïnfecteerd worden [5] [7].

Bloesem infectie

Een volgende fase in de ziektecyclus (zie figuur 3) is de infectie van de bloesems. De stempels in de bloemen zijn de voornaamste plaats waar kolonisatie en groei van *E. amylovora* plaatsvindt. Tijdens deze fase spelen de temperatuur en het aantal bloesems een grote rol, deze parameters zullen uiteindelijk bepalen welke populatiegrootte bereikt wordt door *E. amylovora*. De bacterie dringt de bloesems binnen via hun natuurlijke openingen. Vervolgens zal de bacterie zich vermenigvuldigen en verspreiden [8] [7].



Figuur 3 Ziektecyclus van *Erwinia amylovora* [7].

Scheut, stam en onderstam infectie

In de secundaire fases spreidt bacterievuur zich uit. Zowel de scheuten, het fruit en de onderstammen worden aangetast. Deze verspreiding wordt meestal bewerkstelligd door slijmdruppels ('ooze droplets') bestaande uit een slijmerige oplossing met een zeer hoge concentratie aan bacteriën en initieel op het oppervlak van de zieke bloesemweefsel verschijnen (op bloembodem, bloemblaadjes, bloemsteeltje). Voordat *E. amylovora* rechtstreeks toegang kan krijgen tot het fruit en de scheuten zijn er 'wonden' nodig. Deze wonden worden veroorzaakt door zowel insecten als door bijvoorbeeld harde regen of hagel. Via geïnfecteerde bloemen gaat de bacterie via het bloemsteeltje door naar de scheut, bladeren en verder in de tak. De infectie kan dan afgesloten worden en vormt een kanker of beweegt verder door tot in

de stam waar het zowel naar boven als naar onder beweegt. Bacterievuur op de onderstammen kan dus het gevolg zijn van translocatie van *E. amylovora* afkomstig van infecties hoger in de boom. Soms zullen niet enkel scheuten of (gestel)takken afsterven maar de hele boom [7].

Kanker expansie

Zowel de primaire als de secundaire infecties kunnen sterk uitbreiden in de zomer. De ernst van de infectie hangt af van een aantal factoren. Zo spelen het klimaat (temperatuur en vocht), de soort gastheer, het milieu, de leeftijd en de voedingstoestand van de gastheer een grote rol. Bij voldoende hoge temperatuur (gemiddelde van dag- en nachttemperatuur samen boven 15°C) en vocht (bv. na hevige regenval) kan dit tot een enorm snelle verspreiding van de infectie leiden indien de primaire en secundaire infecties niet verwijderd zijn. Jonge, snelgroeiende bomen zijn meer vatbaar voor bacterievuur dan oudere en trager groeiende bomen. Een hoge waterstatus in bomen (door bijvoorbeeld slecht gedraineerde bodems) kan ook zorgen voor snellere uitbreiding van de kankers.

In de late zomer zal de verspreiding van de kankers weer vertraagd worden aangezien de temperatuur zakt en de groei van bomen en scheuten daalt [7].

2.1.2. Verspreiding

Natuurlijke verspreiding van *E. amylovora* gebeurt lokaal vooral door insecten en regendruppels. Op korte afstand is de verspreiding vooral een gevolg van een eigenschap van de pathogeen, namelijk het produceren van een exudaat of slijmdruppels (een extracellulair polysaccharide dat een soort matrix vormt en zo de pathogeen beschermt). Dit kan vervolgens makkelijk getransporteerd worden door wind, regen, insecten en vogels.

Deze korte-afstandsverspreiding gebeurt zeer efficiënt. Eenmaal de bacterie verplaatst wordt naar een nieuw territorium, zal deze vrijwel onmiddellijk het gebied koloniseren en zich vestigen [2].

Verspreiding van de bacterie op een lange afstand komt minder voor. *E. amylovora* kan uiteraard overgedragen worden door zijn gastheer over langere afstanden te verplaatsen, het betreft dan vaak planten die latent geïnfecteerd zijn. Dit wil zeggen dat de bacterie wel aanwezig is, maar nog niet waarneembaar. Verder kunnen ook aerosols (een mengsel van druppels en stofdeeltjes in een gas) de oorzaak zijn van verspreiding op lange afstand, dit bleek vooral het geval te zijn in Europa. Een laatste oorzaak van verspreiding op lange afstand zijn de planten en plantenweefsel die over de oceanen worden verplaatst. Omdat ook de mens een oorzaak van verspreiding kan zijn, is het uiterst belangrijk dat het wegnemen van infecties gebeurt met de grootste voorzichtigheid. Zo dient het verwijderen van de infectie te gebeuren bij droog weer en moet na elke handeling het materiaal ontsmet worden met bijvoorbeeld Dettol [1] [5].



Figuur 4 Ooze droplets gevormd door *E. amylovora*.

2.2. Bacterievuur

Bacterievuur is een bacteriële plantenziekte die veroorzaakt wordt door bovenstaand besproken bacterie, *Erwinia amylovora*. Het is een zeer besmettelijke ziekte en vormt een groot gevaar voor de fruitteelt.

De naam bacterievuur is ontstaan omdat de symptomen nogal doen denken aan het verschroeien door vuur. Bloesems, twijgen, vruchten en bladeren kleuren zwart. Ook de snelheid waarmee de ziekte uitzaait lijkt op de verspreiding van vuur [9].

2.2.1. Preventie

Controleren op bacterievuur start al in de tweede helft van mei als de temperaturen beginnen op te lopen. Het is zeer belangrijk dat de telers zelf letten op eventuele bacterievuur symptomen lang voor de eigenlijke oogst.

Na het oogsten van de appels en peren moet bij de snoei vooral gelet worden op waterloten, de wortelopslag van de onderstammen en de ingezonken kankerplekken op de stam. Verder is het ook belangrijk dat het verwijderen of terug snoeien van de aangetaste delen tot 50 cm onder de onderste symptomen gebeurt. Het snoeigereedschap moet altijd goed ontsmet moet worden met een toegelaten ontsmettingsmiddel (bv. Dettol of iso-Betadine) om verdere verspreiding van de infectie te voorkomen [6].

Het belangrijkste preventiemiddel is het voorkomen van de infectie van de bloesems. Deze bloeminfectie is zeer destructief aangezien de pathogeen van daaruit ook makkelijke secundaire infecties in scheuten, fruit en wortels kan induceren. De nadruk om deze infectie te beheren ligt dan vooral op de epifytische fase van de bloemen (zie ook figuur 3).

Sinds 2005 is het gebruik van streptomycine verboden in België om bacterievuur te helpen voorkomen. Sindsdien zijn er enkele nieuwe strategieën ontwikkeld. Zo worden er bijvoorbeeld kopercomponenten gebruikt voor de preventie van bacterievuur vroeg in het seizoen. Dit koper zorgt ervoor dat de bacteriën in een Viable But Non Culturable (VBNC) staat terecht komen, dit wil zeggen dat ze nog wel levend zijn maar zich niet vermenigvuldigen. Dit heeft wel een nadeel, het kan namelijk fytoxisch (toxisch effect op de groei van planten) zijn voor de huid van jonge vruchten. Een ander nadeel voor de preventie is dat het blijkt dat *E. amylovora* resistent aan het worden is tegen streptomycine in bepaalde gebieden, waardoor de effectiviteit van deze stof zeer sterk verlaagd wordt [7] [10].

2.2.2. Bestrijding

Het bestrijden van bacterievuur is geen simpele klus. Het enige wat er gedaan kan worden om bacterievuur te bestrijden is regelmatige controles uitvoeren. Er bestaan op de dag van vandaag nog geen echte doeltreffende chemische of biologische bestrijdingsmiddelen. Enkel Blossom Protect is een erkend BCO (biologisch controle organisme) voor appel en peer wat *Aureobasidium pullulans* bevat. Deze gist wordt gespoten op de bomen en zal zich vestigen op de stampers en in de bloembodem. Hier zal de gist dan de infectie kunnen beheersen door voor competitie te zorgen (plaats/nutriënten).

Indien er een infectie waargenomen wordt, wordt de betreffende boom minstens 50 cm onder de infectie weggesnoeid of weggezaagd. Hierna moet ook goed gecontroleerd worden of het gezonde deel geen sporen van een infectie vertoont (zoals een verkleuring, met water verzadigd,...). Het kan soms nodig zijn om de volledige boom weg te rooien.

Het wegnemen van een bacterievuur infectie wordt uitgevoerd bij droog weer. De weggenomen delen worden dan onmiddellijk ter plaatste opgebrand indien mogelijk. Er moet altijd opgelet worden dat de zieke delen niet in contact komen met de gezonde bomen. Vervolgens moet er

de komende weken in de omtrek van de infectie regelmatig gecontroleerd worden of er geen nieuwe infectiehaarden zijn ontstaan [5].

2.3. Veiligheid: werken met een quarantaine organisme

De bacterie *Erwinia amylovora* wordt geklasseerd als een quarantaine organisme volgens het EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation). Hierdoor zijn er enkele belangrijke maatregelen die getroffen worden om de risico's met betrekking tot het werken met pathogenen te beperken. Het labo waarin gewerkt wordt met *E. amylovora* wordt hierdoor geklasseerd als 'L2 Q labo'.

Werken met een quarantaine organisme houdt een 'ingeperkt gebruik' in. Dit wil zeggen dat bij elke activiteit waarbij pathogenen gekweekt, opgeslagen, getransporteerd,... worden speciale inperkingsmaatregelen gelden om het contact van deze pathogenen met de bevolking en het milieu te voorkomen en zo een hoog veiligheidsniveau te garanderen.

De maatregelen die vereist zijn staan beschreven in het Belgisch Staatsblad. Zo moet een L2-Q labo bijvoorbeeld vergrendelbare toegangsdeuren hebben, er is een beperkte toegang en er moet beschermende kledij gedragen worden, er moeten was- en decontaminatie plaatsen voorzien zijn voor het personeel, de lucht moet gefilterd worden met een HEPA-filter (High Efficiency Particulate Air filter), enzoverder. De maatregelen betreffen zowel de inrichting van het labo, de ventilatie, de veiligheidsuitrusting, de werkpraktijken en het afvalbeheer [11].

2.4. Klassieke detectiemethoden

Er zijn algemeen twee klassieke detectiemethoden die het meeste gebruikt worden, namelijk het uitplaten van de bacteriën op een voedingsbodem en een serologische test met fluorescentie detectie (immunofluorescentie).



Figuur 5 Voorbeeld van kolonievorming na uitplating (streepenting).

Het uitplaten van bacteriën is een kwalitatieve test, aangezien er enkel de aan- of afwezigheid van bacteriën mee bepaald wordt zonder een kwantificatie uit te voeren. Bacteriën worden uitgezet op een voedingsmedium, een medium dat alle stoffen bevat die noodzakelijk zijn voor de groei van bacteriën. Na incubatie zullen kolonies waargenomen kunnen worden (figuur 5) (of net niet) en zo kan er bepaald worden of er initieel bacteriën aanwezig waren in het te bepalen staal.

Een voedingsmedium kan zowel vast als vloeibaar zijn, selectief of niet-selectief. Een niet-selectief voedingsmedium wordt ook wel een algemeen voedingsmedium genoemd. Het bevat geen extra stoffen die een remmende werking hebben op de groei van andere micro-organismen. Een selectief medium daarentegen bevat wel stoffen die enkel de gewenste bacterie laten groeien en de rest van de micro-organismen niet (selectieve stoffen). Daarnaast kunnen er ook stoffen toegevoegd worden die de gewenste bacterie doet opvallen ten opzichte van de rest zodat hij herkenbaar wordt (selectieve stoffen) [12].

Aan de hand van immunoassays is het mogelijk om een snelle detectie te verkrijgen van bacterievuur. Zo werd er onlangs een lateral flow based immunoassay ontwikkeld speciaal voor *E. amylovora*. Deze test maakt het mogelijk de aan- of afwezigheid van een analiet in een staal te bepalen zonder gebruik te maken van dure opstellingen. Uit onderzoek bleek dat deze test een zelfde gevoeligheid had als de andere standaard testen, zoals uitplatingen en PCR (polymerase chain reaction). Door de betrouwbaarheid en de simpelheid van deze methode wordt een snelle detectie mogelijk gemaakt, na vijftien minuten wordt er al een resultaat verkregen. Dit maakt het een uitstekende tool voor controle op bacterievuur.

Bij deze manier van detectie wordt er gekeken naar de interactie tussen een antilichaam en zijn antigen waarbij de interactie kan gedetecteerd worden via fluorescentie. Zo kan er bepaald worden of er bepaalde antistoffen aanwezig zijn en in welke concentratie.

Immunofluorescentie kan gebeuren op twee manieren, namelijk direct of indirect. Bij directe immunofluorescentie is het fluorofoor gebonden aan het primair antilichaam, terwijl bij indirecte immunofluorescentie er nog een secundair antilichaam volgt waaraan het fluorofoor gebonden is. Voor beide technieken geldt dat hoe meer antigenen en dus gebonden antilichamen, hoe meer fluorescentie er zal optreden [13].

2.5. Moleculaire detectiemethoden

Er bestaan verschillende moleculaire detectiemethoden waarmee pathogenen geïdentificeerd en gedetecteerd kunnen worden, sommige daarvan worden specifiek voor *E. amylovora* gebruikt. De achterliggende principes van de twee moleculaire detectiemethoden gebruikt tijdens deze bachelorproef, qPCR en LAMP, worden ook uitgelegd.

Eerst zal er dieper ingegaan worden op de methodes die nodig zijn voor het DNA vrij te zetten uit zowel bacteriële als plantenstalen.

2.5.1. DNA-isolatie bacterieel

In deze bachelorproef wordt gebruik gemaakt van twee verschillende methodes om bacterieel DNA vrij te zetten.

2.5.1.1. Cheng & Jiang 2006

Het Cheng & Jiang protocol maakt gebruik van een STE-buffer welke bestaat uit NaCl, Tris-HCl en Na-EDTA. Deze laatste component fungeert als een chelator, wat zal zorgen voor het wegnemen van metaalionen. Deze metaalionen dienen als cofactor voor enzymen, waardoor deze geïnhibeerd worden. Het natriumchloride (NaCl) zal zorgen voor het afschermen van de ladingen van het DNA na splitsing. De Tris-HCl heeft een bufferende werking.

Hierna volgt een phenolextractie. Er wordt Tris-verzadigde phenol toegevoegd wat zal zorgen voor het breken van de celwand en kernmembraan. Doordat er twee fasen verkregen worden, kan het DNA gescheiden worden van de onzuiverheden. Aan het DNA wordt vervolgens chloroform toegevoegd voor het extraheren van de eiwitten en de phenol.

Voor het opzuiveren van het DNA wordt nog een ethanol precipitatie uitgevoerd, dit maakt gebruik van ammoniumacetaat wat voor een verhoogde zoutconcentratie zorgt. Het neerslaan van het DNA wordt gedaan met behulp van 100% ethanol.

2.5.1.2. CTAB-DTT protocol

Ook deze methode maakt gebruik van phenol en chloroform om het DNA te isoleren. Enkel de lysisbuffer is hier een CTAB-buffer. De CTAB-buffer bestaat uit volgende componenten; CTAB, Tris-HCl, NaCl, Na-EDTA en DTT.

CTAB zal zorgen voor de lysis van de bacteriën terwijl het DTT fungeert als een reducerend agens. Dit zal ervoor zorgen dat de thiolgroepen van het DNA niet kunnen interfereren met elkaar waardoor er geen dimeren gevormd worden. De werking van NaCl, Na-EDTA en Tris-HCl is dezelfde als hierboven in 2.5.1.1. besproken werd.

2.5.2. DNA-isolatie plantenmateriaal

Voor de DNA-isolatie van plantenmateriaal wordt gebruikt gemaakt van twee methodes; Khayat et al 2004 en Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene.

2.5.2.1. Khayat et al 2004

Het Khayat et al 2004 protocol werkt ook met de CTAB-buffer als lysisbuffer zoals hierboven beschreven in 2.5.1.2. Verder wordt ook hier een phenol- en chloroformextractie gedaan om het DNA te isoleren. Deze methode is volledig gelijkaardig aan het bacterieel CTAB-DTT protocol, enkel is dit aangepast om te gebruiken op plantenmateriaal.

2.5.2.2. Plant Material DNA Extraction Kit

Bij deze methode wordt enkel vers plantenweefsel samengebracht met lysisbuffer in een tube met metalen bal. De lysisbuffer en de metalen bal zullen dan samen zorgen voor het lyseren van het plantenmateriaal door krachtig te schudden. Vervolgens wordt ongeveer 10 µl van deze oplossing overgebracht in dilutiebuffer. Dit kan rechtstreeks dienen als template voor een LAMP-reactie. Het DNA wordt hier dus niet apart geëxtraheerd zoals in de andere methode, dit heeft echter geen nadeel voor het uitvoeren van de LAMP.

2.5.3. Moleculaire detectiemethoden toegepast op pathogenen algemeen

De vooruitgang van de moleculaire microbiologie is vooral een gevolg van nucleïnezuur-amplificatie technieken zoals PCR en LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Door de enorme genetische diversiteit tussen verschillende micro-organismen is het ontwerpen van een snelle en accurate detectietechniek een hele uitdaging geworden voor wetenschappers. Decennia lang heeft de detectie en de identificatie van bacteriën afgehangen van het kweken van microbiële culturen en biochemische testen zoals immunoassays (zie ook paragraaf 2.4. Klassieke detectiemethoden).

Voor het uitplaten van bacteriën is het soms nodig om de bacteriën verschillende dagen te laten groeien op voedingsmedia alvorens een éénduidige identificatie mogelijk is. Om deze beperkingen te omzeilen kunnen moleculaire detectiemethoden, zoals real-time PCR of qPCR en LAMP, een oplossing bieden. De doorlooptijden om tot een diagnose te komen worden hierdoor ook aanzienlijk verminderd van dagen naar uren en zelfs minder dan een uur in geval van LAMP [14].

2.5.4. Moleculaire detectiemethoden toegepast op *E. amylovora*

2.5.4.1. Inleiding

Er zijn verschillende moleculaire detectiemethoden (zoals ook qPCR) die geschikt zijn voor het detecteren van *E. amylovora*. Maar toch was er tot voor enkele jaren geen techniek die geschikt

was voor een snelle detectie rechtstreeks in het veld. Dit is waar de LAMP-techniek verandering in tracht te brengen. Doordat LAMP op één temperatuur een reactie kan laten doorgaan, is het aanzienlijk sneller dan bijvoorbeeld PCR. Ook is het sneller dan uitplantingen, waarbij de bacteriën minstens 24 uur moeten incuberen. Hierdoor is het een techniek die mogelijk rechtstreeks op het veld kan gebruikt worden. Dit is belangrijk omdat plantenziekten in het algemeen en bacterievuur in het bijzonder het best zo snel mogelijk gedetecteerd worden om tijdig ingrijpen mogelijk te maken. Bacterievuur kan immers onder optimale omstandigheden (zie paragraaf 2.2.) zeer snel verspreiden.

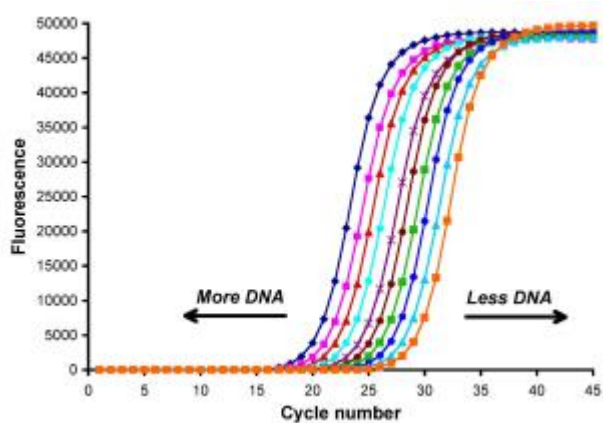
LAMP spoort de *target coding sequences* in het DNA op, welke specifiek en uniek zijn voor alle *E. amylovora* genotypes. Hierdoor worden vals positieve resultaten voorkomen. Uit onderzoeken bleek dat LAMP een zelfde of zelfs grotere prestatie had op gebied van gevoeligheid, specificiteit, snelheid én simpelheid in vergelijking met qPCR, uitplantingen en immunoassays [1].

2.5.4.2. Achterliggende principes

In dit deel worden kort de achterliggende principes van de twee meest gebruikte technieken voor het detecteren van *E. amylovora*, namelijk qPCR en LAMP, aangehaald.

qPCR

qPCR wordt ook wel kwantitatieve PCR of real-time PCR genoemd. Het grote voordeel van qPCR ten opzichte van gewone PCR is dat qPCR zowel de amplificatie als de detectie combineert in één stap. Hierdoor is er geen post-PCR techniek meer nodig om de stalen te kunnen evalueren, zoals gelelektroforese. Verder is het bij deze techniek ook mogelijk om echt kwantitatief te werken (door middel van standaarden en ijklijnen) doordat de hoeveelheid DNA opgevolgd wordt na elke cyclus (zie figuur 6).

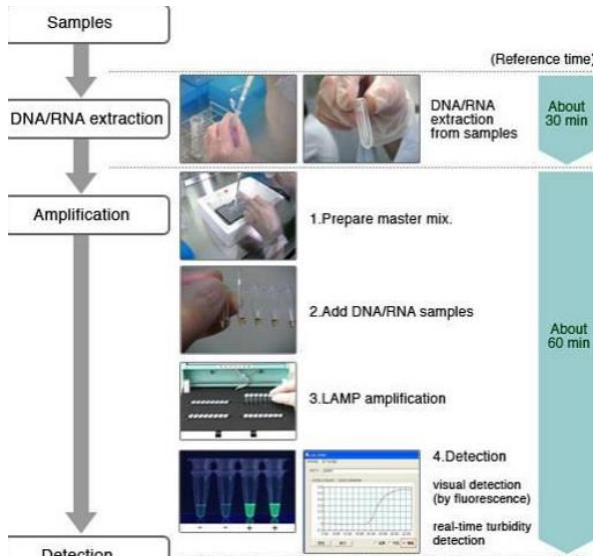


Figuur 6 Amplificatieplot verkregen met qPCR. Door middel van fluorescentie wordt na elke cyclus de hoeveelheid DNA gemeten. Door middel van ijklijnen kan de originele hoeveelheid in een staal bepaald worden.

Om de amplificatie op te volgen, wordt er gebruik gemaakt van fluorescentie. Hiervoor zijn er enkele verschillende mogelijkheden. Ten eerste kan er gebruik gemaakt worden van verschillende soorten probes. Een probe is gelabeld met een fluorofoor en een quencher. Indien de probe intact is gaat de quencher de fluorescentie uitgestraald door de fluorofoor reduceren. Wanneer de probe ingebouwd wordt in het amplicon (amplificatieproduct), wordt de quenching verstoord en zal er wel fluorescentie optreden [15].

Een andere techniek is het gebruiken van een DNA-bindende fluorescerende kleurstof, zoals SYBR green. SYBR green zal fluorescentie uitstralen wanneer deze bindt aan dubbelstrengig DNA. Een nadeel bij deze kleurstof is wel dat deze bindt aan alle dubbelstrengige moleculen, en dus ook aan primer-artefacten. Hierdoor kan er een overschatting gebeuren van de hoeveelheid DNA [16].

LAMP



Figuur 7 De verschillende stappen van de LAMP-methode [33].

LAMP is een techniek die een snellere detectie van pathogenen mogelijk maakt dan een PCR gebaseerde techniek inclusief qPCR. Net zoals bij PCR gebruikt LAMP primers om de target sequentie te detecteren en te amplificeren. Het verschil met PCR dat een temperatuurprofiel heeft met verschillende temperatuurstappen is dat LAMP gebeurt bij één temperatuur (65°C). Dit is de voornaamste reden waarom deze techniek sneller is.

LAMP is een amplificatiemethode welke gebruik maakt van twee primersets en een DNA-polymerase (*Bst* DNA-polymerase). Tijdens de reactie worden amplificatieproducten gevormd met *loop*

regions. Aan deze enkelstrengige gebieden kunnen dan weer primers binden en zo kan de reactie doorgaan zonder thermocycling (niet telkens denaturatie en annealing nodig). De amplificatie kan nog versneld worden door het toevoegen van een derde primerset, de zogenaamde *loop primers* [17] [18].

Door het uitvoeren van een snel DNA/RNA-extractie protocol en vervolgens LAMP, kunnen er al resultaten verkregen worden in minder dan twee uur. Figuur 6 geeft een korte weergave over het verloop van LAMP.

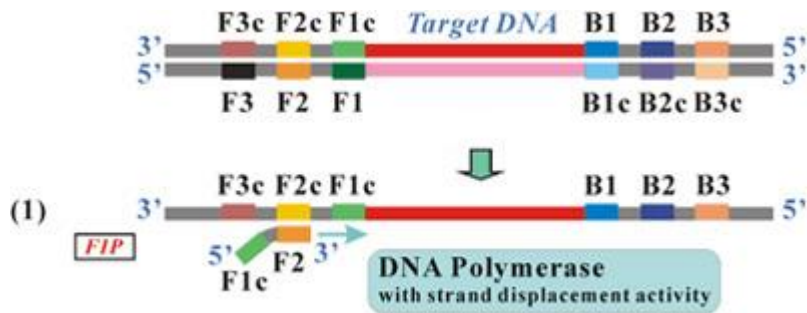
Principe

De vier primers gebruikt bij LAMP zullen zes regio's herkennen op het *target*-DNA. Hieronder volgt een overzicht van de primers.

Tabel 1 Overzicht gebruikte primers voor LAMP

FIP primer (<i>forward inner primer</i>)	Heeft een F2-regio welke complementair is aan F2c-regio op het <i>target</i> -DNA + heeft een F1c-regio
F3 primer (<i>forward outer primer</i>)	Is complementair aan de F3c-regio op het <i>target</i> -DNA
BIP primer (<i>backward inner primer</i>)	Heeft een B2-regio welke complementair is aan B2c-regio op het <i>target</i> -DNA + heeft een B1c-regio
B3 primer (<i>backward outer primer</i>)	Is complementair aan de B3c-regio op het <i>target</i> -DNA

In een eerste stap zal de F2-regio van de FIP-primer binden aan zijn complementaire regio F2c op het dubbelstrengs DNA. Door de *strand displacement* activiteit van het *Bst* DNA-polymerase wordt er een enkelstreng vrijgezet (zie figuur 7) [19] [20].



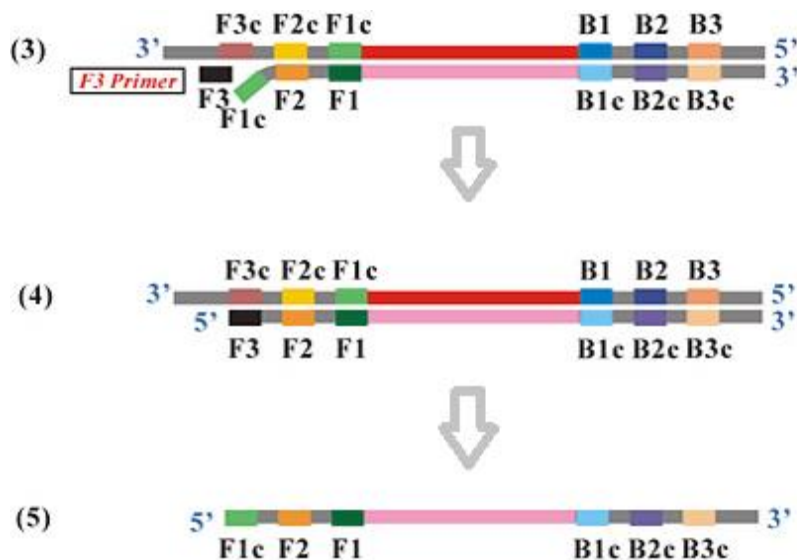
Figuur 8 LAMP stap 1: FIP-primer bindt; ds DNA wordt ss DNA.

Vervolgens wordt vanaf de F2-regio van de FIP-primer de streng verlengd door middel van het DNA-polymerase van het 5'-uiteinde naar het 3'-uiteinde (zie figuur 8) [19] [20].



Figuur 9 LAMP stap 2: synthese complementaire DNA streng.

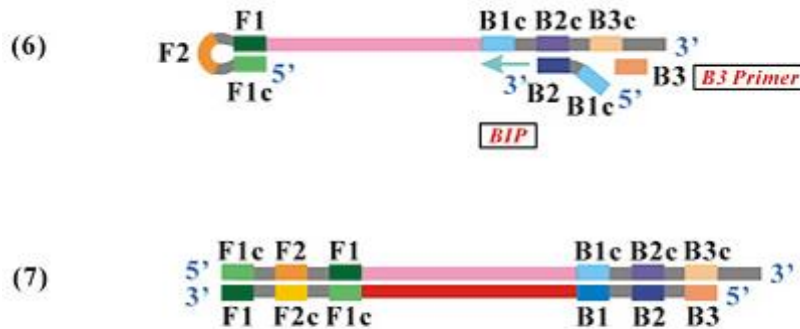
Hierna zal de F3-primer binden aan zijn complementaire sequentie F3c op het *target*-DNA. Dit zal het DNA-polymerase initiëren en er wordt een complementaire DNA-streng gevormd aan de bovenste streng waardoor er dubbelstrengs DNA ontstaat. Hierdoor komt de onderste streng (met de FIP-primer) vrij als een enkelstreng (zie figuur 9) [19] [20].



Figuur 10 LAMP stap 3-5: 3. F3-primer bindt; 4. nieuwe complementaire streng wordt gevormd (ds DNA); 5. streng met FIP komt vrij als enkelstreng.

Vervolgens wordt verdergegaan met de gevormde enkelstreng. Zoals weergegeven bevat het 5'-uiteinde van deze streng nu twee complementaire regio's (F1c en F1). Deze zullen dan ook gaan binden en zo een 'lus' vormen.

Hierna worden op het 3'-uiteinde de BIP-primer en de B3-primer ingebouwd. Dezelfde stappen als hierboven worden overlopen waardoor er weer dubbelstrengs DNA verkregen wordt en een enkelstreng (zie figuur 10) [19] [20].



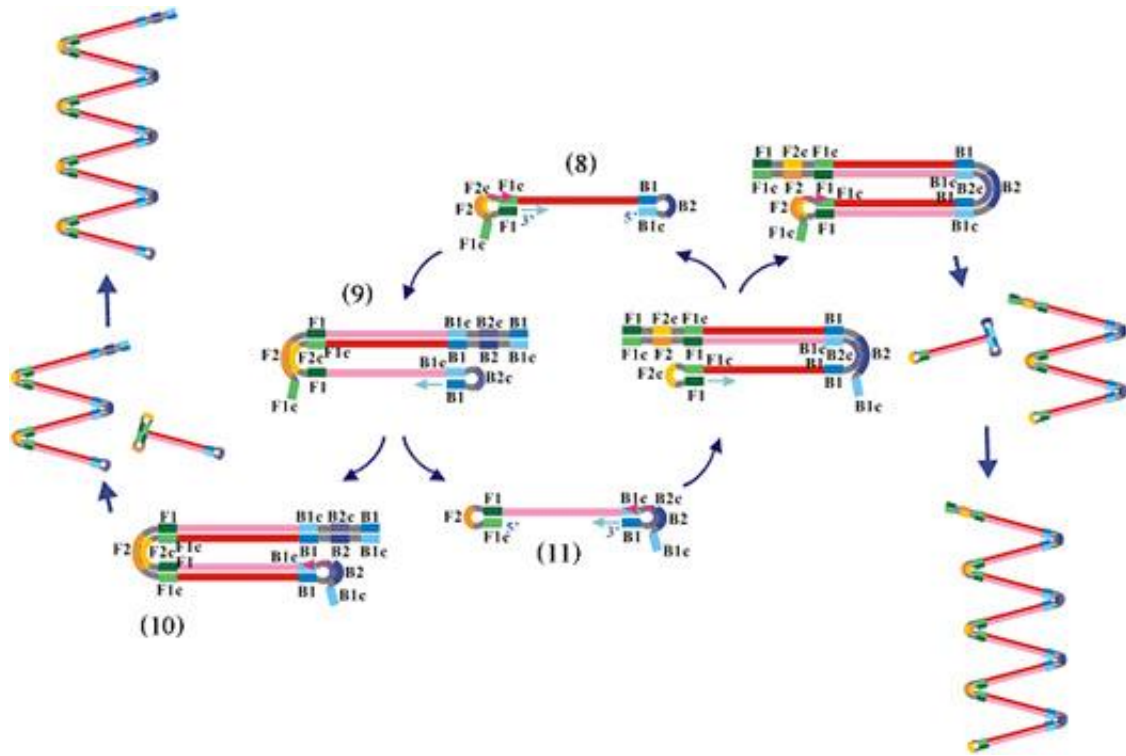
Figuur 11 LAMP stap 6-7: 6. Binding van de BIP en B3-primers; 7. Dubbelstrengs DNA wordt gevormd.

De verkregen enkelstreng bevat nu zowel aan het 5'- als aan het 3'-uiteinde complementaire regio's die met elkaar gaan binden en zo lussen vormen aan beide uiteindes (zie figuur 11). Deze structuur is de eigenlijke startstructuur voor de amplificatiecyclus van LAMP [19] [20].



Figuur 12 LAMP stap 8: vorming van de loops aan beide uiteindes. Complementaire regio's (F1c en F1 / B1c en B1) gaan binden ter vorming van lussen.

In de amplificatiecyclus worden nu opnieuw stap voor stap de primers ingebouwd. Hierdoor worden er verschillende groottes van structuren verkregen welke allemaal aanzienlijk vermeerderd worden. De startstructuur, zoals hierboven aangegeven in figuur 11, wordt telkens terug afgesplitst en zo kunnen kan de cyclus blijven verdergaan (zie figuur 12).

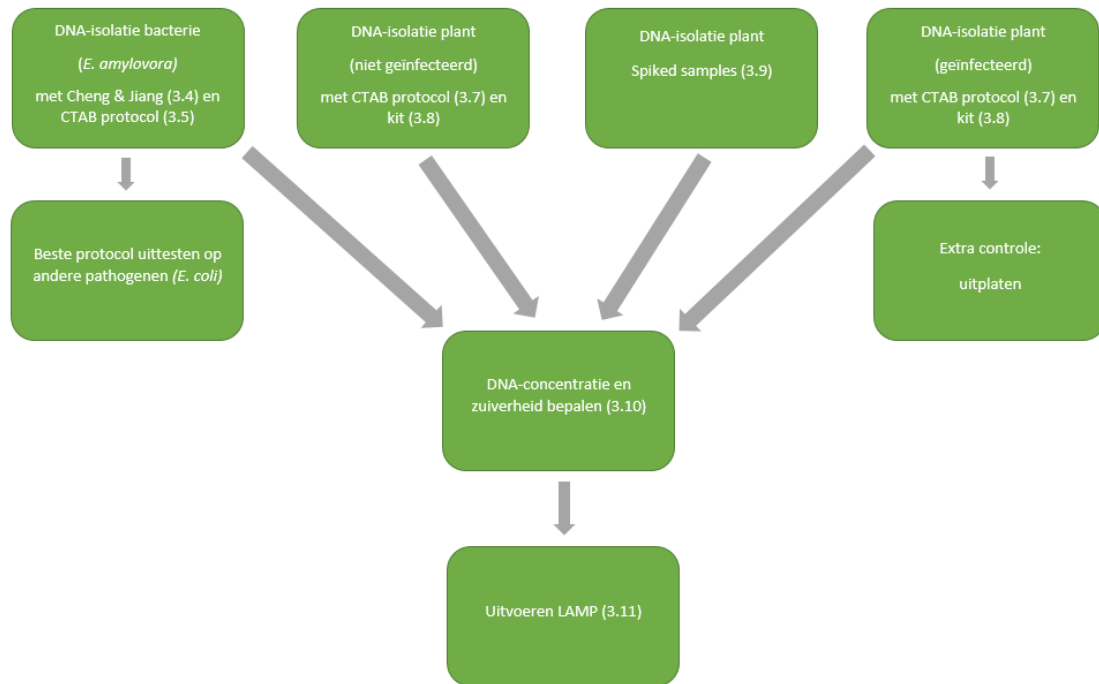


Figuur 13 De amplificatiecyclus van LAMP

3. Materialen en methoden

3.1. Flowschema

In onderstaande figuur 14 is het algemeen werkschema van dit thesis werk opgenomen. In essentie is de benadering telkens identiek, namelijk DNA-isolatie waarvan dan de opbrengst en kwaliteit wordt bepaald om ten slotte *E. amylovora* detectie te doen met de LAMP techniek.



Figuur 14 Flowschema bachelorproef. Tussen haakjes is het desbetreffende paragraaf nummer aangegeven waar de gebruikte materialen en methoden kunnen worden geraadpleegd.

3.2. LPGA voedingsmedium

Er werd LPGA voedingsmedium bereid dat de ideale voedingsstoffen heeft voor de bacteriën om zich optimaal de kunnen vermenigvuldigen.

3.2.1. Materialen

Tabel 2 Overzicht gebruikte apparatuur aanmaak LPGA voedingsmedium

Hardware	Merk en type	Doel
Autclaveerbare flessen	Schott	Medium in maken
Autoclaf	Analisis, Systec	Autoclaveren van medium
Laminaire flowkast	Beun De Ronde Serlabo	Beschermen experiment en laborant, steriel werken
Analytische balans	Mettler PJ3000	Afwegen componenten

Tabel 3 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor aanmaak LPGA voedingsmedium

Hardware	Doel
Steriele Petri-platen (9 cm doormeter)	Voedingsmedium uitgieten

Weegschuitjes	Afwegen componenten
---------------	---------------------

Tabel 4 overzicht gebruikte stoffen en oplossingen aanmaak LPGa voedingsmedium

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	Doel
Gedestilleerd water	/	Vloeibaar	Aanlengen voedingsmedium
Agar	VWR -15G030011	Vast	Voedingsmedium
Dextrose	Merck - K45016742409	Vast	Voedingsmedium
Gistextract	BD - 8275279	Vast	Voedingsmedium
Bactopeptone	BD - 8252715	Vast	Voedingsmedium

3.2.2. Methoden

- Weeg volgende componenten af, los op in ongeveer 800 ml gedestilleerd water:
 - Agar 20 g
 - Dextrose 10 g
 - Gistextract 5 g
 - Bactopeptone 5 g
- Bereid medium in autoclaveerbare flessen met blauwe dop (fles met inhoud 2 l gebruiken voor bereiding 1 l medium of 1 l fles voor bereiding tot max. 800 ml medium)
- Alles goed laten roeren (eventueel verwarmen tot kookpunt) – roeren op stand 5 met roerstaafje
- Leng aan met gedestilleerd water tot 1 l
- Autoclaveren: 20 min bij 110°C (opgelet: geen 121°C!)
- Uitgieten in steriele Petriplaten in de laminaire airflowkast

3.3. Subculturen bacteriën

Een cultuur (*Erwinia amylovora* stam E3) wordt overgeënt om de bacteriën op te kweken. De bacteriën worden immers ideaal geoogst als ze in de exponentiële fase van hun groei zitten (na ongeveer 24 uur incubatie).

3.3.1. Materialen

De gebruikte materialen, glaswerk en disposables evenals gebruikte stoffen en oplossingen zijn op gelijst in Tabel 5, 6 en 7, respectievelijk.

Tabel 5 Overzicht gebruikte apparatuur voor subculturen bacteriën


Hardware	Merk en type	Doel
Laminaire flowkast	Beun De Rond Serlabo	Beschermen experiment en laborant, steriel werken
Pipetboy	HTL Lab Solutions, SwiftpetPro	Correcte volumes pipetteren

Incubator	Binder	Incuberen
Entoog	/	Bacteriën overbrengen
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine volumes pipetteren
Drigalski spatel (driehoekig, glas)	/	Uitstrijken bacteriesuspensie op voedingsbodem
Draaitafel	Schuett-Biotec	Uitplaten

Tabel 6 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor subculturen bacteriën

Hardware	Doel
Glazen steriele pipetten	Correcte volumes pipetteren
Micropipet tippen	Kleine volumes pipetteren
15 ml Falcon buizen	Container bacteriesuspensie
LPGA voedingsbodem	Subculturen

Tabel 7 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor subculturen bacteriën

Stofnaam of naam oplossing	Merk - Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
70% ethanol 	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280 P305+P351+P338 P337+P313 P403+P235	Ontsmetten
PBS 10 mM pH 7.2	/	Vloeibaar	8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O, 0.2 g KH ₂ PO ₄ , 1 l Steriel H ₂ O	/	/	Fysiologische oplossing

3.3.2. Methoden

Petriplaten met 100 µl cultuur

- 4 ml PBS toevoegen op het medium in de Petriplaat
- Kolonies afschrapen met entoog
- Suspensie opzuigen met micropipet en overbrengen in 15 ml buis

- Aanvullen met PBS tot 5 ml
- Goed mengen
- 100 µl op verse LPGA voedingsbodem
- Uitplaten met Drigalski spatel door Petriplaat rond te draaien met draaitafel
- Incuberen op 28°C

Streepenting

- 1 kolonie oppikken met entoog
- Streepenting op verse LPGA voedingsbodem: driemaal strepen trekken met entoog telkens op een deel van de voedingsbodem en tussenin de entoog steriliseren door afvlammen en met een andere entoog de volgende reeks strepen trekken zodat de bacteriën geleidelijk verdund worden en finaal bij de laatste streepenting aparte kolonies ('single colonies') worden bekomen.

3.4. DNA-extractie bacterieel DNA volgens 'Cheng & Jiang 2006'

Een eerste protocol dat getest werd voor de DNA-extractie van bacterieel DNA is het protocol volgens Cheng & Jiang (2006) *Extremely rapid DNA extraction from bacteria and yeasts* [21]. Zoals de titel al zegt is dat een zeer snelle en relatief eenvoudige DNA-extractie methode. Het werd getest op een cultuur van de *Erwinia amylovora* stam E3.

Na dit protocol werd telkens een ethanol precipitatie uitgevoerd om het DNA te zuiveren (zie verder).

3.4.1. Materialen

De gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables, stoffen en oplossingen evenals de geteste bacteriesoorten met het protocol Cheng & Jiang (2006) zijn weergegeven in Tabel 8, 9, 10 en 11, respectievelijk.



Tabel 8 Overzicht gebruikte apparatuur voor bacteriële DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006





Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Entoog	/	Kolonies enten
Centrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5430 R	Scheiden van mengsels
Trekkast	Köttermann	Bescherming laborant
Vortex	Lab-line Instrument Inc, Vortex Genie	Homogeniseren/mengen
Diepvriezer -20°C	Liebherr	Bewaren stalen
Warmwaterbad	GFL	Incuberen bij 37°C

Tabel 9 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor bacteriële DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006

Hardware	Doel
1,8 ml microtube met schroefdop	Vloeistofcontainer
Handschoenen (neopreen)	Bescherming laborant
1,5 ml Eppendorf tube	Vloeistofcontainer
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten

Tabel 10 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor bacteriële DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006

Stofnaam of naam oplossing	Merk - Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
Steriel water	/	Vloeibaar	/	/	/	Bacteriekolonies in oplossing krijgen / oplossen DNA-pellet
TE-buffer	/	Vloeibaar	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 8.0	/	/	Oplossen DNA-pellet
STE-buffer	/	Vloeibaar	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 8.0	/	/	Cellen wassen
Tris verzadigde phenol 	Sigma-Aldrich MKBV9724 V	Vloeibaar	Equilibrated with 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na-EDTA	H301 H312+H332 H314 H336 H341 H351 H361d H372 H411	P201 P261 P301+P310+P330 P303+P361+P353 P304+P340+P310 P305+P351+P338	Cellen lysiseren
Chloroform 	Sigma-Aldrich BCBC1010	Vloeibaar	/	H302 H315 H319 H331 H336 H351 H361d H372	P261 P281 P305+P351+P338 P311	Scheiden bovenste waterige fase van onderste organische fase

RNase	Invitrogen 12091-021	Vloeibaar	20 mg/ml	/	/	Afbreken RNA
Ammonium- acetaat	/	Vloeibaar	10M	/	/	Zoutcon- centratie verhogen
100% ethanol  	VWR - 151791	Vloeibaar	100%	H225 H319	P210 P280 P305+P35 1+P338 P337+P31 3 P403+P23 5	DNA neerslaan
70% ethanol  	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280 P305+P35 1+P338 P337+P31 3 P403+P23 5	DNA- pellet wassen



Tabel 11 Overzicht gebruikte bacteriestalen voor DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006

Staalcode	Aard van het staal	Oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	Afval
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>	Diepvries -80°C 08/10/2012	Pathogeen – quarantaine labo Handschoenen	Auto- claveren
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>	Diepvries -80°C 11/06/2015	Pathogeen – quarantaine labo Handschoenen	Auto- claveren
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	Diepvries -80°C 07/03/2012	Pathogeen – L1 labo Handschoenen	Auto- claveren

3.4.2. Methoden


DNA-extractie protocol

- Los de bacteriële pellet (*E. amylovora*, 1 ml bacteriesuspensie) op in 400 µl STE-buffer. Centrifugeer voor 5 min aan een snelheid van 8000 g op kamertemperatuur
- Verwijder het supernatans en herhaal de vorige stap. Verwijder opnieuw het supernatans en sla de pellet op in -80°C of ga verder met de DNA-isolatie
- Resuspendeer de pellet in 200 µl TE-buffer

- Voeg 100 μ l Tris-verzadigde phenol (pH 8.0) toe en vortex 60 seconden om de cellen te lyseren. Werk in de trekkast en draag handschoenen 
- Centrifugeer voor 10 min op 4°C en een snelheid van 13000 g om de bovenste waterige fase te scheiden van de onderste organische fase
- Breng 160 μ l van de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1.8 ml microtube met schroefdop, voeg 40 μ l TE-buffer toe en mix met 100 μ l chloroform.  Centrifugeer voor 10 min op 4°C en een snelheid van 13000 g
- Herhaal de vorige stap één of meerdere keren, totdat er geen witte interfase meer zichtbaar is
- Breng 160 μ l van de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1.5 ml Eppendorf microtube. Voeg 40 μ l TE-buffer toe en voeg ook 5 μ l DNase-vrij RNase (10 mg/ml stock concentratie; 250 μ g/ml eindconcentratie) toe. Incubeer voor 15 min op 37°C
- Voeg 100 μ l chloroform toe, vortex en centrifugeer voor 10 min op 4°C en een snelheid van 13000 g
- Breng 150 μ l van de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1.5 ml Eppendorf microtube
- Meet de DNA-concentratie en zuiverheid (zie paragraaf 3.10) [21].

Ethanol precipitatie

In een 2 ml microtube:

- 400 μ l staal + 100 μ l 10M ammoniumacetaat (2M eindconcentratie)
- Mix door te vortexen
- Voeg 1000 μ l 100% (v/v) ethanol toe (ijskoud, 2  volumes)
- Mix door te vortexen
- 20 min op ijs incuberen
- 15 min centrifugeren op 4°C en een snelheid van 13000 rpm
- Verwijder het supernatans
- Voeg 500 μ l 70% (v/v) ethanol toe (2x)
- 5 min centrifugeren op 4°C en een snelheid van 13000 rpm
- Verwijder het supernatans
- Laat de pellet drogen aan de lucht
- Los de pellet op in een toepasselijk volume TE-buffer (50-100 μ l)

3.5. DNA-extractie bacterieel DNA volgens CTAB-DTT gebaseerd protocol

Een tweede protocol dat getest wordt is een CTAB en DTT (als rededurend agens) gebaseerde DNA-extractie methode aangepast naar een protocol ontwikkeld voor banaan bladeren (Khayat et al., 2004) [22] en met aanpassingen van een DNA-extractie protocol voor algen [23]. Ook deze methode wordt getest op de stam E3 van *E. amylovora*. In dit protocol werd een kleine aanpassing gedaan om tot betere resultaten te komen. Zo werd voor de phenol extractie stap eerst een chloroform extractie stap ingevoerd om het grootste deel van de eiwitten al te kunnen verwijderen.

3.5.1. Materialen

De gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables, stoffen en oplossingen evenals bacteriestalen voor DNA-extractie volgens het CTAB-DTT protocol zijn weergegeven in Tabel 12, 13, 14 en 15, respectievelijk.

Tabel 12 Overzicht gebruikte apparatuur voor bacteriële DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol





Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Centrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5430 R	Scheiden van mengsels
Trekkast	Köttermann	Bescherming laborant
Vortex	Lab-line Instrument Inc, Vortex Genie	Homogeniseren/mengen
Diepvriezer -20°C	Liebherr	Bewaren stalen
Warmwaterbad	GFL	Incuberen bij 37°C
Ovent	Termaks	Incuberen bij 55°C
Diepvriezer -80°C	New Brunswick Scientific, U4lo Premium	Incuberen bij -80°C



Tabel 13 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor bacteriële DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol

Hardware	Doel
1,8 ml microtube met schroefdop	Vloeistofcontainer
Handschoenen (neopreen)	Bescherming laborant
1,5 ml microtube	Vloeistofcontainer
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten

Tabel 14 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor bacteriële DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
Steriel water	/	Vloeibaar	/	/	/	Bacteriekolonies in

						oplossing krijgen / oplossen DNA-pellet
TE-buffer	/	Vloeibaar	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/	/	Oplossen DNA-pellet
CTAB-buffer 	/	Vloeibaar	4% CTAB, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1,4 M NaCl, 20 mM Na-EDTA pH 8.0, 1% (w/v) DTT	H302 H315 H318 H335 H373 H400	P260 P280 P301+P312+P330 P305+P351+P338+P310	Extractie buffer
DNase-vrij RNaseA	Invitrogen 12091-021	Vloeibaar	20 mg/ml	/	/	RNA afbreken
Phenol: chloroform: isoamyl alcohol  (25:24:1)	Roth A156.2	Vloeibaar	25:24:1	H301 H312+H332 H314 H336 H341 H351 H361d H372 H411	P201 P261 P301+P310+P330 P303+P361+P353 P304+P340+P310 P305+P351+P338	Proteïnen extraheren
Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 	Roth X984.2	Vloeibaar	24:1	H302 H315 H319 H331 H336 H351 H361d H372	P201 P261 P280 P304+P340+P311 P308+P313 P403+P233	Proteïnen en phenol extraheren
Iso-propanol 	Roth 6752.1	Vloeibaar	/	H225 H319 H336	P210 P261 P305+P351+P338	DNA neerslaan

70% (v/v) ethanol  	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280 P305+P 351+P33 8 P337+P 313 P403+P 235	DNA- pellet wassen
--	-----------------	-----------	-----	--------------	--	--------------------------

Tabel 15 Overzicht gebruikte bacteriestalen voor DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol

Staalcode	Aard van het staal	Oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	Afval
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>	Diepvries -80°C 08/10/2012	Pathogeen – quarantaine labo Handschoenen	Auto-clavere n
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>	Diepvries -80°C 11/06/2015	Pathogeen – quarantaine labo Handschoenen	Auto-clavere n
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	Diepvries -80°C 07/03/2012	Pathogeen – L1 labo Handschoenen	Auto-clavere n

3.5.2. Methoden

- Los de bacteriën op in 800 µl extractie buffer in een 1,8 ml microtube met schroefdop en meng goed door te vortexen

Tabel 16 Aanmaak CTAB-DTT extractiebuffer

COMPONENT	final conc.	stock conc.*	10 ml extr. buffer
CTAB	4% (w/v)	/	400 mg
TRIS-HCl pH 8.0	10 mM	1 M	100 µl
NaCl	1.4 M	5 M	2.8 ml
Na-EDTA pH 8.0	20 mM	0.5 M	400 µl
DTT	1% (w/v)	/	100 mg

* Stock oplossingen kunnen bewaard worden op kamertemperatuur maar de buffer moet altijd vers aangemaakt worden.

- Incubeer de stalen op 55°C voor 30 tot 60 min. Inverteer de microtubes geregeld tijdens de incubatie
- Laat de microtube afkoelen en behandel het staal vervolgens met DNase-vrij RNaseA aan 200 µg/ml eindconcentratie (of 8 µl van 20 mg/ml stock). Incubeer voor 30 tot 45 min bij 37°C

- Voeg een gelijk volume chloroform:isoamyl alcohol (24:1) toe, sluit de microtube goed, vortex en centrifugeer voor 5 min bij 4°C en een snelheid van 10000 rpm. Breng de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1,8 ml microtube zoals beschreven in de vorige stap. Werk in de trekkast en draag handschoenen. 
- Voeg een gelijk volume phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) toe, sluit de microtube goed, vortex en centrifugeer voor 5 minuten op 4°C en een snelheid van 10000 rpm. Breng de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1,8 ml microtube. Zorg ervoor de interfase met de proteïne niet te verstoren. Om dit te doen, breng eerst het groter volume van de waterige fase over met een blauwe 1 ml tip en breng vervolgens de rest over met een gele 200 µl tip. Werk in de trekkast en draag handschoenen. 
- Voeg een gelijk volume chloroform:isoamyl alcohol (24:1) toe, sluit de microtube goed, vortex en centrifugeer voor 5 min bij 4°C en een snelheid van 10000 rpm. Breng de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1,8 ml microtube zoals beschreven in de vorige stap. Werk in de trekkast en draag handschoenen. 
- Voeg een gelijk volume ijskoude iso-propanol toe, meng en incubeer bij -80°C voor ten minste 30 min. Ontdooi de stalen zonder mengen. 
- Centrifugeer voor 20 min bij 4°C en een snelheid van 8500 rpm, was de DNA-pellet twee keer met 1 ml EtOH (70% v/v), centrifugeer telkens 5 min bij 4°C en een snelheid van 8500 rpm. Verwijder de EtOH elke keer. 
- Laat de pellet drogen aan de lucht en los de pellet vervolgens op in 50-100 µl TE-buffer of steriel water. Bewaar op -20°C en meet de DNA-concentratie en zuiverheid (zie paragraaf 3.10) [23].

3.6. Staalname geïnfecteerde bloemenstalen

Voor de geïnfecteerde bloemenstalen werden bloemen genomen van vier controlebomen (in pot) uit een lopend quarantaine serre experiment op pcfruit (RES-05) die twee dagen eerder geïnfecteerd waren met *E. amylovora*. Dit waren 'Conference' perenbomen welke verder geen behandeling hadden gekregen behalve dat bepaalde van deze controlebomen wel bespoten waren met Pollunis, een bijen en hommelm attractant, en andere controlebomen niet. Van beide typen, +Pollinus en -Pollinus, werden bloemenstalen genomen.

3.6.1. Materialen

De gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables, stoffen en oplossingen en tenslotte de genomen stalen zijn terug te vinden in Tabel 17, 18, 19 en 20 respectievelijk.



Tabel 17 Overzicht gebruikte apparatuur nodig voor staalname geïnfecteerde bloemenstalen

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Centrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5430 R	Pellet verkrijgen
Vortex	Lab-line Instrument Inc, Vortex Genie	Homogeniseren/mengen
Diepvriezer -20°C	Liebherr	Bewaren stalen
Laminaire flowkast	Beun De Ronde Serlabo	Bescherming laborant en experiment, steriel werken
Schaartje en pincet	/	Kroonbladeren en meeldraden verwijderen

Tabel 18 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor staalname geïnfecteerde bloemenstalen

Hardware	Doel
1,8 ml microtube met schroefdop	Opslag bloemen
Handschoenen (neopreen)	Bescherming laborant
1,5 ml microtube	Vloeistofcontainer
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten
5 ml pipet	Wasbuffer aanbrengen
15 ml Greiner buis	Vloeistofcontainer
Petriplaten	Bloemen verzamelen

Tabel 19 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor staalname geïnfecteerde bloemenstalen

Stofnaam of oplossing	Merk - Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
Steriel water	/	Vloeibaar	/	/	/	Waterverzadigd papier voor in Petriplaat
70% (v/v) ethanol  	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280 P305+P351+P338 P337+P313 P403+P235	Ontsmetten

Wasbuffer	/	Vloeibaar	100 ml 0,05M fosfaatbuffer (4,26 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,72 g/l KH ₂ PO ₄), 0,1 ml Tween-20 (0.1% v/v)	/	/	Bacteriën van bloemen afwassen
-----------	---	-----------	--	---	---	--------------------------------

Tabel 20 Overzicht van de genomen geïnfecteerde bloemenstalen met oorsprong en identificatie.

Staalcode	Aard van het staal	Oorsprong	Risico's en veiligheidsvoorschriften	Afval
A1	Controleboom Pollunis +	Conference peren	Handschoenen, labo- jas, schoenenover- trek	Auto- claveren
B1	Controleboom Pollunis +	Conference peren	Handschoenen, labo- jas, schoenenover- trek	Auto- claveren
D1	Controleboom Pollunis -	Conference peren	Handschoenen, labo- jas, schoenenover- trek	Auto- claveren
E1	Controleboom Pollunis -	Conference peren	Handschoenen, labo- jas, schoenenover- trek	Auto- claveren
F1	Controleboom	Jonagold appel	Handschoenen, labo- jas, schoenenover- trek	Auto- claveren

* Er werden per boom telkens tien bloemen genomen.

3.6.2. Methoden

- Zet 4 petriplaten klaar met daarin waterverzadigd papier
- Haal in de quarantaine serres 10 bloemen per boom (A1, B1, D1 en E1) → dus 40 in totaal
- Vries van elke boom 5 bloemen direct in in een microtube met schroefdop
- De andere 5 bloemen: kroonbladeren en meeldraden verwijderen met steriel schaar-
tje en steriele pincet onder de laminaire airflow (bloembodem en stamper behouden)
- Bloemsteeltje met onderste deel van de bloembodem afknippen en resterende
bloembodem en stampers in 5 ml wasbuffer brengen in een 15 ml Greiner buis. De 10
bloemen per boom worden samengebracht in 5 ml wasbuffer.
- 20 sec vortexen
- Bloemen verwijderen met pincet
- Centrifugereren voor 10 min op kamertemperatuur en een snelheid van 5000 rpm
- Supernatans verwijderen
- Pellet invriezen (-20°C)

3.7. DNA-extractie plantenmateriaal volgens CTAB-DTT gebaseerd protocol

Het plantenmateriaal (zowel geïnfecteerd als niet-geïnfecteerd) werd geëxtraheerd volgens het protocol van Khayat et al. (2004) met enkele aanpassingen [22].

Voor niet-geïnfecteerde stalen werden openbrekende bloemknoppen en takjes (zowel 1-, 2- als meerjarig hout) gebruikt van 'Svatana' en 'Jonagold' appelbomen en ook van 'Conference' perenbomen.

3.7.1. Materialen

Tabel 21 Overzicht gebruikte apparatuur voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens CTAB-DTT protocol





Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Centrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5430 R	Scheiden van mengsels
Crusher	Bioreba AG	Fijnmalen van de stalen
Vortex	Lab-line Instrument Inc, Vortex Genie	Homogeniseren/mengen
Diepvriezer -20°C	Liebherr	Bewaren stalen
Warmwaterbad	GFL	Incuberen bij 37°C
Oven	Termaks	Incuberen bij 55°C
Diepvriezer -80°C	New Brunswick Scientific, U4lo Premium	Incuberen bij -80°C
Trekkast	Köttermann	Bescherming laborant

Tabel 22 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens CTAB-DTT protocol

Hardware	Doel
Handschoenen (neopreen)	Bescherming laborant
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Filtertips	Contaminatie vermijden
Plastiek zakje	Stalen crushen
1,5 ml microtubes	Vloeistofcontainer
1,8 ml microtubes met schroefdop	Vloeistofcontainer

Tabel 23 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens Khayat

Stofnaam of naam oplossing	Merk - Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
Steriel water	/	Vloeibaar	/	/	/	Bacteriekolonies in oplossing krijgen /

						oplossen DNA-pellet
TE-buffer	/	Vloeibaar	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/	/	Oplossen DNA-pellet
CTAB-buffer 	/	Vloeibaar	4% CTAB, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1,4 M NaCl, 20 mM Na-EDTA pH 8.0, 1% (w/v) DTT	H302 H315 H318 H335 H373 H400	P260 P280 P301+P312+P330 P305+P351+P338+P310	Extractie buffer
DNase-vrij RNaseA	Invitrogen - 12091-021	Vloeibaar	20 mg/ml	/	/	RNA afbreken
Phenol: chloroform: isoamyl alcohol  (25:24:1)	Roth - A156.2	Vloeibaar	25:24:1	H301 H312+H332 H314 H336 H341 H351 H361d H372 H411	P201 P261 P301+P310+P330 P303+P361+P353 P304+P340+P310 P305+P351+P338	Proteïnen extraheren
Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 	Roth - X984.2	Vloeibaar	24:1	H302 H315 H319 H331 H336 H351 H361d H372	P201 P261 P280 P304+P340+P311 P308+P313 P403+P233	Proteïnen en phenol extraheren
Iso-propanol 	Roth 6752.1	Vloeibaar	/	H225 H319 H336	P210 P261 P305+P351+P338	DNA neerslaan
70% (v/v) ethanol	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280	DNA-pellet wassen

					P305+P351+P338	
					P337+P313	
					P403+P235	







Tabel 24 Overzicht gebruikte plantenstalen voor DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol

Staalcode	Aard van het staal	Oorsprong
Bloembot	Bloembotten	'Svatana' appelbomen in pot – serre, 'Conference' peren – veld (niet geïnfecteerd), 'Jonagold' appel – veld (niet geïnfecteerd)
Schors	1-, 2- of meerjarig hout	'Svatana' appelbomen in pot – serre, 'Conference' peren – veld (niet geïnfecteerd) 'Jonagold' appel – veld (niet geïnfecteerd)
Bloem	Open bloemen	'Svatana' appelbomen in pot (niet geïnfecteerd)

3.7.2. Methoden

- Verzamel ongeveer 0,4 gram plantenmateriaal
- Snij in kleine stukjes met een scalpel en breng over in plastic zakje
- Voeg 4 ml CTAB-buffer toe (Tabel 16)
- Laat 5 min incuberen op kamertemperatuur
- Crush de stalen met de handcrusher
- OF
- Homogeniseer de stalen met vloeibare stikstof
- Koel eerst de stamper en mortier en laat vloeibare stikstof verdampen
- Voeg staal toe en opnieuw vloeibare stikstof
- Crush de stalen
- Breng over in een 1.8 ml microtube met schroefdop
- Laat 30 min incuberen op 55°C
- Behandel de stalen met DNase-vrij RNaseA aan 200 µg/ml eindconcentratie
- Laat 15-45 min incuberen op 37°C
- Voeg een gelijk volume phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) toe
- Vortex en centrifugeer voor 5 min bij 4°C en een snelheid van 5000 rpm
- Breng de bovenste waterige fase over in een nieuwe 1.8 ml microtube



- Voeg een gelijk volume chloroform:isoamyl alcohol (24:1) toe  
- Vortex en centrifugeer voor 5 min bij 4°C en een snelheid van 5000 rpm
- Herhaal eventueel de twee bovenstaande stappen
- Voeg een gelijk volume ijskoude isopropanol toe en meng  
- Incubeer 30 min bij -80°C
- Ontdooi stalen zonder mengen
- Centrifugeer voor 20 min bij 4°C en een snelheid van 8500 rpm
- Was de DNA-pellet twee keer met 1 ml 70% ethanol  
- Laat de pellet drogen aan de lucht
- Los op in 50-100 µl TE-buffer. Bewaar op -20°C en meet de DNA-concentratie en zuiverheid (zie paragraaf 3.10) [22].


3.8. DNA-extractie plantenmateriaal volgens Plant Material DNA Extraction Kit

Naast het CTAB-DTT protocol werd het DNA van het plantenmateriaal ook geëxtraheerd volgens de Plant Material Extraction Kit van OptiGene (EXT-001L). Deze kit voorziet alle materialen en reagentia nodig voor het extraheren van DNA dat nadien direct gebruikt kan worden als template voor LAMP.

3.8.1. Materialen

Voor de DNA-extractie met de OptiGene Plant Material DNA Extraction Kit geeft tabel 25 een overzicht van het gebruikte glaswerk en disposables, terwijl de gebruikte stoffen en oplossingen in Tabel 26 terug te vinden zijn.

Tabel 25 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens de Plant Material DNA Extraction Kit

Hardware	Doel
Scalpel	Plantenmateriaal snijden
5 ml tube met rode schroefdop en metalen (stainless steel) bal 	Fijnmalen plantenmateriaal
Plastieken entoog	Overbrengen van oplossing
Microtube met dilutiebuffer	Template LAMP

Tabel 26 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens de Plant Material DNA Extraction Kit

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	Doel
Lysisbuffer (samenstelling niet gekend)	Vloeibaar	Optimale condities verzekeren voor cellysis

3.8.2. Methoden

- Snij met een steriele scalpel een vierkant van 2x2cm of een kubus van 1x1x1cm uit het plantenmateriaal
- Breng het plantenmateriaal over in een nieuwe tube met rode schroefdop en metalen bal
- Voeg hieraan 1 ml lysisbuffer toe en sluit de tube goed
- Schud met de hand de tube hard gedurende 1 min zodat de metalen bal het plantenmateriaal fijnmaakt
- Breng 10 µl van deze oplossing over in de microtube met dilutiebuffer met een zuivere plastieken entoog
- Sluit microtube goed en mix de oplossing
- 5 µl van deze oplossing kan vervolgens direct gebruikt worden als template voor LAMP [24].

3.9. Spiken van stalen

Het spiken van de stalen kan gebeuren op twee manieren: op DNA-niveau of op weefselniveau.

3.9.1. Materialen

Voor het spiken van stalen zijn de gebruikte apparatuur, het glaswerk en disposables evenals de stoffen en oplossingen weergegeven in Tabel 27, 28 en 29, respectievelijk.

Tabel 27 Overzicht gebruikte apparatuur voor het spiken van stalen

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Turbiditeitsmeter	Merck, TurbiQuant 1500 IR	Turbiditeit meten
Laminaire flowkast	Beun De Ronde Serlabo	Bescherming laborant en experiment, steriel werken

Tabel 28 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor het spiken van stalen

Hardware	Doel
Handschoenen (neopreen)	Bescherming laborant
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten
50 ml Greiner buis	Aanmaak bacteriesuspensie

Tabel 29 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor het spiken van stalen

Stofnaam of naam oplossing	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Doel
----------------------------	-------------------	---	------

PBS 10 mM pH 7.2	Vloeibaar	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1 l steriel H ₂ O	Fysiologische oplossing
---------------------	-----------	---	-------------------------

3.9.2. Methoden

Spiken op weefselniveau

- Subcultuur *E. amylovora* op LPGA voedingsbodem
- Oogst deze plaat in een 50 ml Greiner buis (zie paragraaf 3.3.2.)
- Leng aan met PBS tot ongeveer 50 ml
- Meet de turbiditeit van de bacteriesuspensie ($34 = 10^8$ KVE/ml)
- Maak eventueel een verdunningsreeks aan tot de gewenste hoeveelheid bacteriën verkregen wordt
- Weeg 0,4 gram bloemen af
- Doe hier 4 ml CTAB-buffer en 1 ml bacteriesuspensie bij in een plastic zakje
- Volg vervolgens het CTAB-DTT DNA-extractie protocol voor plantenmateriaal (zie ook paragraaf 3.7.2)

Spiken op DNA-niveau

- Breng 2,5 µl bacterieel DNA samen met 2,5 µl planten DNA
- Doe dit één keer met eenzelfde input aan bacterieel DNA en een veranderende input aan planten DNA
- Doe dit een volgende keer met eenzelfde input aan planten DNA en een veranderende input aan bacterieel DNA

3.10. Meting DNA-concentratie en zuiverheid via Multiskan GO

Na de DNA-isolatie is het belangrijk voor volgende experimenten dat de DNA-concentratie en de zuiverheid bepaald wordt. Dit werd gedaan via het toestel 'Multiskan Go' en met behulp van een µdrop plaat.

3.10.1. Materialen

De gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables evenals de stoffen en oplossingen voor het meten van de DNA-concentratie en zuiverheid worden weergegeven in Tabel 30, 31 en 32, respectievelijk.

Tabel 30 Overzicht gebruikte apparatuur nodig voor DNA-concentratie en zuiverheid meting met de Multiskan GO


Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten

Computer	Hp	Skinit software bedienen
Microtiterplaat reader (spectrofotometer) met μ drop plate	ThermoScientific, Multiskan GO	DNA-concentratie en zuiverheid meten

Tabel 31 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor DNA-concentratie en zuiverheid meting met Multiskan GO

Hardware	Doel
Handschoenen (neopreen)	Bescherming laborant
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten

Tabel 32 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor DNA-concentratie en zuiverheid meting met Multiskan GO

Stofnaam of naam oplossing	Merk - Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
70% (v/v) ethanol 	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280 P305+ P351+ P338 P337+ P313 P403+ P235	Ontsmetten
Steriel water	/	Vloeibaar	/	/	/	Spoelen μ drop plaat
TE-buffer	/	Vloeibaar	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/	/	Blanco

3.10.2. Methoden

- Spoel de μ drop plaat af met gedestilleerd water en ontsmet met 70% ethanol
- Spoel de μ drop plaat na met gedestilleerd water
- Droog de plaat met papier
- Hef het glas op en breng telkens 3 μ l staal op de plaat (laat plaats voor blanco's)
- Doe het glaasje terug toe
- Zet de computer en het Multiskan GO toestel aan
- Open de Skanit software op de computer
- Druk op 'Login'
- Druk in de tab 'Home – Instrument' op 'Plate out'

- Plaats de μ drop plaat in het toestel
- Druk in de tab 'Home – Instrument' op 'Plate in'
- Druk in de tab 'Home – Session' op 'New'
- Ga naar de tab 'Layout'
- Vul de positie van de stalen in door ze te selecteren en vervolgens op 'Fill With' te klikken

De μ drop plaat komt overeen met kolom 2 en 3 in de Fill Wizard (is normaal voor 96-well-platen)

Selecteer 'Unknown' voor onbekende stalen en 'Blanks' voor blanco's

- Ga naar de tab 'Protocol'
- Druk in het venster 'Measurement' op 'Photometric'

Selecteer 'Multiple wavelengths' en 'Precision'

Geef de gewenste golflengtes in (230 nm, 260 nm en 280 nm)

- Druk op de groene knop 'Start'
- De meting gebeurt nu
- Ga na de meting naar de tab 'Results'
- Druk op 'Blank subtraction' in het venster 'Basic' voor het aftrekken van de waarden van de blanco
- Druk in het venster 'Processing' op 'Precalculation'
- Kies 'Ratio (A/B)' voor het berekenen van de verhouding A_{260}/A_{230}

Kies bij A voor 'Blanksubtraction1' bij 260 nm

Kies bij B voor 'Blanksubtraction2' bij 230 nm

⇒ 'Precalc1'

- Kies 'Ratio (A/B)' voor het berekenen van de verhouding A_{260}/A_{280}

Kies bij A voor 'Blanksubtraction1' bij 260 nm

Kies bij B voor 'Blanksubtraction2' bij 280 nm

⇒ 'Precalc2'

- Kies 'Scale (A*x)' voor het berekenen van de DNA-concentratie

Kies bij A voor 'Blanksubtraction1' bij 260 nm

Geef bij X het getal 980,39216 in. Dit zal de bekomen absorptie omzetten in een DNA-concentratie (=50*10/0.51)

→ 50 dient voor de omzetting van de gemeten absorbantiewaarde naar de DNA-concentratie want als $A_{260} = 1$, dan is DNA = 50 $\mu\text{g/ml}$ of $\text{ng}/\mu\text{l}$

→ 10/0.51 = toepassing wet van Lambert-Beer

$$E = \epsilon \cdot c \cdot L$$

E = Extinctie

ϵ = molaire extinctie coëfficiënt ($\text{l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$)

C = concentratie (mol/l)

L = de weglengte (cm). Voor μdrop plaat is deze 0,51 mm i.p.v. 10 mm

⇒ 'Precalc3'

- Bekijk de resultaten in de tab "Table"

3.11. Agarose gelelektroforese

Om de intactheid van zowel het bacterieel als het planten DNA na te gaan, werd een agarose gelelektroforese uitgevoerd. Hiervoor werd een gel gebruikt van 0,8% (w/v) agarose.

3.11.1. Materialen

De gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables evenals de gebruikte stoffen en oplossingen voor het uitvoeren van een agarose gelelektroforese worden weergegeven in Tabel 40, 41 en 42, respectievelijk.

Tabel 33 Overzicht gebruikte apparatuur voor gelelektroforese

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Thermo labsystems P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
UV-transilluminator	Bio-rad hood 2	Bekijken gel, nemen van een foto van de gel
Computer	Hp	Openen software Quantity One
Microgolfoven	Sharp Platinum collection	Verwarmen oplossing om agarose op te lossen
Elektroforesetank	Bio-rad	Uitvoering gelelektroforese
Elektroforese power supply	Bio-rad	Uitvoering gelelektroforese

Tabel 34 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor gelelektroforese

Hardware	Doel
Handschoenen (neopreen)	Tegengaan contaminatie

Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Filtertips	Bescherming experiment tegen contaminatie
Erlenmeyer	Aanmaken gel

Tabel 35 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor gelelektroforese

Stofnaam of naam oplossing	Merk – Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Doel
Agarose	Sigma – 085K1569	Vast	/	Aanmaken gel
Gelred	Boitium – 13G1218	Vloeibaar	/	Visualisatie DNA
Orange G	/	Vloeibaar	/	Laden van de stalen, opvolging gelelektroforese ('loading buffer')
TAE-buffer 1x	/	Vloeibaar	40 mM Tris 20 mM azijnzuur 1 mM EDTA	Elektroforese buffer

3.11.2. Methoden

Bereiding 0,8% agarose gel

- Weeg 0,8 gram agarose af per 100 ml TAE-buffer
 - o 40 ml per gel → 2 gels dus 80 ml
 - o Weeg dus 0,64 gram agarose af
- Voeg het agarose poeder samen met de TAE-buffer 1x in een erlenmeyer
- Verwarm deze oplossing in de microgolfoven tot deze volledig helder is
- Laat de oplossing afkoelen tot deze handwarm is (onder koud water houden)
- Voeg Gelred toe
 - o 10 µl per 100 ml gel
 - o Dus voeg 8 µl Gelred toe
- Giet de gel in de voorziene trays
- Plaats de kammetjes (15 slotjes) in de gel om de slotjes te vormen
- Verwijder eventuele luchtballen met een pipettip
- Laat de gel stollen door te laten afkoelen
- Verwijder de kammetjes voorzichtig eens de gel hard is
- Vul de elektroforesetank met TAE-buffer 1x



- Zorg ervoor dat het vloeistofniveau tot juist boven het oppervlak van de gel reikt en controleer of alle slotjes gevuld zijn

Laden van de gel

- Voeg aan de DNA-stalen Orange G toe (3 µl per 10 µl staal)
 - o Voor 3 µl staal, voeg 1 µl Orange G toe
- Pipetteer op en neer om te mengen
- Laadt dit mengsel in de slotjes
- Voorzie per gel 1 slotje voor de lengtemerker te laden

Run

- Sluit de elektroforesetank aan op de spanningsbron
- Selecteer het gewenste voltage (= 80V) en schakel de stroom in
- Laat de gel ongeveer 45 minuten lopen

Visualiseer

- Spoel de overtollige Gelred van de gel door deze te wassen in water
- Plaats de gel in de UV-transilluminator
- Bekijk en evalueer de gel
- Neem een foto en sla de resultaten op



3.12. LAMP

Loop-mediated isothermal amplification is een snelle amplificatiemethode die doorgaat op één temperatuur van 65°C en wordt in deze bachelorproef gebruikt voor de detectie van *Erwinia amylovora*.

De gebruikte primers en primermix zijn gebaseerd op het artikel van Bühlmann et al 2012 'Erwinia amylovora loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight' [1].

3.12.1. Materialen

De voor LAMP vereiste apparatuur, glaswerk en disposables, stoffen en oplossingen en primers zijn terug te vinden in Tabel 33, 34, 35 en 36, respectievelijk.

Tabel 36 Overzicht gebruikte apparatuur voor uitvoering LAMP op Genie III toestel


Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
LAMP-toestel	OptiGene, Genie III	DNA amplificatie

Tabel 37 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor uitvoering LAMP op Genie III toestel

Hardware	Doel

Handschoenen (neopreen)	Tegengaan contaminatie
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Filtertips	Bescherming experiment tegen contaminatie
Stripje van acht kleine microtubes (150 µl max.)	Receptiënt voor LAMP reactie

Tabel 38 Overzicht gebruikte stoffen en oplossing voor uitvoering LAMP op Genie III toestel

Stofnaam of oplossing	Merk - Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	H-zinnen	P-zinnen	Doel
70% (v/v) ethanol 	VWR - 151791	Vloeibaar	70%	H225 H319	P210 P280 P305+ P351+ P338 P337+ P313 P403+ P235	Ontsmetten
TE-buffer	/	Vloeibaar	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/	/	Negatieve controle
Isothermal mastermix	OptiGene	Vloeibaar	Reactiebuffer, MgSO ₄ , DNA polymerase*, dNTP's ds DNA binding fluorescent dye	/	/	Componenten nodig voor amplificatie

* Een engineered long fragment (LF) DNA polymerase geïsoleerd uit *Geobacillus sp.*, SSD (GSp, SSD)

Tabel 39 Overzicht gebruikte primers voor uitvoering LAMP gebaseerd op Bühlmann et al 2012

Primer	Smelttemperatuur	Sequentie	Master stock concentratie	Werkoplossing concentratie
F3 primer EAMY_3195	56,0°C	TCA AGA TCG TGT GGC TAT G	100 µM	20 µM
B3 primer EAMY_3195	54,0°C	CTA AAA ACC GGG GCA AAC		
FIP primer EAMY_3195	64,4°C	ACG RTT CTA CCC TTC CTG TCT ACT TCT CTG GGG TTT CAG TC		
BIP primer EAMY_3195	63,3°C	ATG TCA CCT GAT TCT ACA GCC GCA ATC		

		ATT CAT GGT TCT GGA C		
LoopF primer EAMY_3195	60,0°C	ACA TTA GCG GCC CGA CCA A		
LoopR primer EAMY_3195	60,0°C	CTR TTA AGA TGG CAT GCA GA		

3.12.2. Methoden

- Maak van elke primer een werkoplossing van 20 µM (stockconcentratie = 100 µM). Sla de primer 100 µM master stocks en 20 µM werkoplossingen op bij -20°C.
- Laat de Isothermal Mastermix en primers ontdooien
- Short spin alle componenten
- Bereid een primermix volgens onderstaand schema (Tabel 37):

Tabel 40 Overzicht primermix volgens Bühlmann et al 2012 [1]

Primer	Volume (µl) 1 reactie	Volume (µl) 10 reacties	Eindconcentratie (µM)
EAMY_3195 F3	0,25	2,5	0,2
EAMY_3195 B3	0,25	2,5	0,2
EAMY_3195 FIP	1	10	0,8
EAMY_3195 BIP	1	10	0,8
EAMY_3195 Loop F	0,5	5	0,4
EAMY_3195 Loop R	0,5	5	0,4
TOTAAL	3,5	35	
	1,5	+ 15 µl H ₂ O	
EINDTOTAAL	5	50	

- Voeg 5 µl van deze primermix toe per epje van de strip
- Voeg daarna 5 µl DNA toe (of TE-buffer als negatieve controle)
- Voeg dan 15 µl isothermal mastermix toe
- Zet het Genie III toestel aan en plaats de strip in het warmteblok
- Sluit het warmteblok
- Klik op 'LAMP & Anneal'
- Klik op 'Edit'
- Geef de naam van het experiment en de verschillende stalen in
- Check het temperatuurprofiel:

65°C – 30 min	} dalen met 0,05°C/sec
98°C – 1 min	
80°C – 1 sec	

- Druk op start
- Sla de resultaten op en breng over naar laptop
- Bekijk de resultaten met behulp van software programma Genie Explorer

3.13. LAMP uitgevoerd op qPCR-toestel

Om een vergelijking te maken met het OptiGene LAMP toestel, werd het LAMP-protocol ook uitgevoerd op het qPCR-toestel. Hier wordt hetzelfde temperatuurprofiel van LAMP (isotherm profiel) ingesteld op het qPCR-toestel.

3.13.1. Materialen

De gebruikte apparatuur, glaswerk en disposables evenals de stoffen en oplossingen nodig voor de uitvoering van LAMP op het qPCR toestel, worden weergegeven in tabel 38 en 39, respectievelijk.

Tabel 41 Overzicht gebruikte apparatuur voor uitvoering LAMP op qPCR toestel

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	Gilson P1000, P200, P20	Kleine vloeistofvolumes afmeten
qPCR toestel	Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System	Uitvoeren qPCR
Computer	Hp	Openen Software 7500 v2.0.6

Tabel 42 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor uitvoering LAMP op qPCR toestel

Hardware	Doel
Handschoenen (neopreen)	Tegengaan contaminatie
Micropipet tippen	Kleine vloeistofvolumes afmeten
Filtertips	Bescherming experiment tegen contaminatie
96-well-plaat, transparant	Applied Biosystems
Afdek strip (hard deksel) voor 96-well-plaat	Applied Biosystems

Voor een overzicht van de gebruikte stoffen en oplossingen zie tabel 35 (paragraaf 3.11.1).

Voor een overzicht van de gebruikte primers zie tabel 36 (paragraaf 3.11.1).

3.13.2. Methodes

- Laat de isothermal mastermix en de primers ontdooien
- Bereid een primermix volgens het schema in tabel 37 (zie paragraaf 3.11.2)
- Vortex de primermix
- Verdeel de primermix over de 96-well plaat (5 µl per well)
- Pipetteer 5 µl staal of buffer in elke well
- Pipetteer vervolgens nog 15 µl isothermal mastermix toe aan elke well

- Breng het stripje aan om de wellen af te dekken
- Schakel de computer en het qPCR-toestel aan
- Open de 7500 Software v2.0.6.
- Plaats de 96-well plaat in het toestel
- Klik op 'new experiment'
- Ga naar de 'setup' tab
- Geef de naam van het experiment in bij 'experiment properties'
- Duid ook nog volgende keuzes aan:
 - 7500 (96 Wells)
 - Presence/Absence
 - TaqMan Reagents
 - Standard (~2 hours to complete a run)
- Ga naar de 'plate setup' tab
- Vul de gewenste targets in in het blad 'Define targets and samples'
- Selecteer bij ieder target als reporter "FAM" en als quencher "NONE"
- Benoem de stalen
- Ga naar de 'assign targets and samples' tab
- Kies onder bij "Select the dye to use as the passive reference" voor "NONE"
- Duid de plaatsen aan op de 96-well plaat waar ieder staal zich bevindt
- Duid negatieve controles aan
- Ga naar de 'run method' tab
- Verander het reactievolume in 25 µl
- Vink de 'Expert mode' aan
 - Klik op 'select/view filters'
 - Vinkel enkel de eerste filter aan (FAM-SYBR)
 - Klik op OK
- Stel het volgende programma in:

LAMP-reactie	65°C	1 sec		60x
	65°C	29 sec		
Aanmaken melting curve	65°C	15 sec		
	82°C	15 sec		
	92°C	15 sec		
- Druk bovenaan op de groene knop 'Start run'

- Analyseer de resultaten en sla op

3.14. Statistiek T-toets

Om aan te duiden of er een significant verschil is tussen de verschillende geteste DNA-extractie methodes, werd er een T-toets voor gemiddelden uitgevoerd in Microsoft Excel.

3.14.1. Materialen

Tabel 43 Overzicht nodige materialen voor uitvoeren van een T-toets in Microsoft Excel

Hardware	Doel
Microsoft Excel	Uitvoeren van T-toets

3.14.2. Methodes

- Open Microsoft Excel 2010
- Ga naar de tab 'Gegevens'
- Druk op de knop 'Gegevensanalyse'
- Ga naar de functie 'T-toets: twee gepaarde steekproeven voor gemiddelden'
- Duid het variabelenbereik 1 en 2 aan
- Selecteer het gewenste uitvoerbereik
- De H0-hypothese stelt dat er geen significant verschil is
De H1-hypothese stelt dat er wel een significant verschil is
- Indien de bekomen P-waarde kleiner is dan 0,05 mag de H1-hypothese aanvaard worden

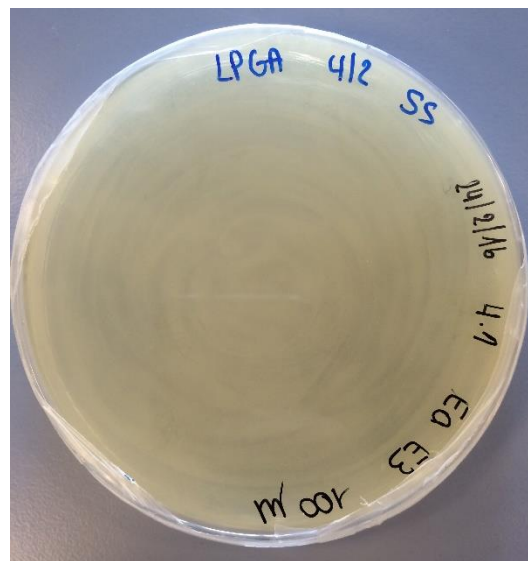
4. Resultaten en discussie

4.1. Uitplantingen

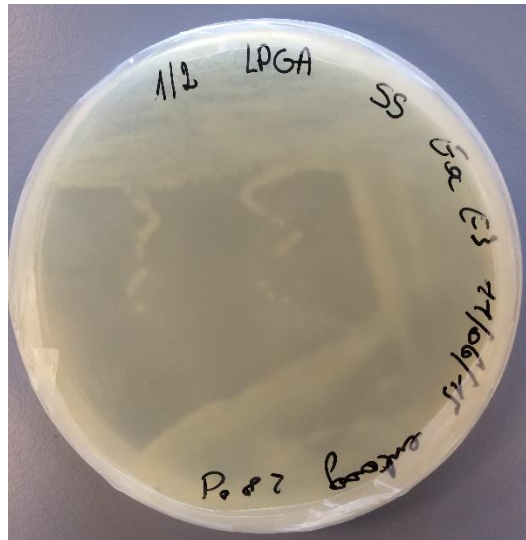
Voor *Erwinia amylovora* op te kweken werden twee verschillende stalen uit de stock in de -80°C diepvries gebruikt. Beiden waren een stam E3 van *Erwinia*, één afkomstig van het jaar 2012 en één van 2015.

Deze werden vervolgens uitgeplaat op het niet-selectief voedingsmedium LPGA. Er werd zowel een streepenting uitgevoerd als 100 µl uitgeplaat (zie paragraaf 3.3.2). Na het uitplaten werden deze platen in een incubator op 28°C gezet voor minstens 24 uur. Het oogsten van de bacterie (aanmaak bacteriële suspensie voor het verkrijgen van een pellet na centrifugatie. Hierna kan een DNA-extractie uitgevoerd worden) gebeurt ook best na 24 uur, het is immers belangrijk dat dit gebeurt wanneer de groei van de bacterie zich nog in de exponentiële fase bevindt.

In Figuur 15 en 16 worden de resultaten weergegeven van de uitplantingen.



Figuur 15 Overnacht groei op 28°C van 100 µl uitplanting van *E. amylovora* op LPGA voedingsmedium.



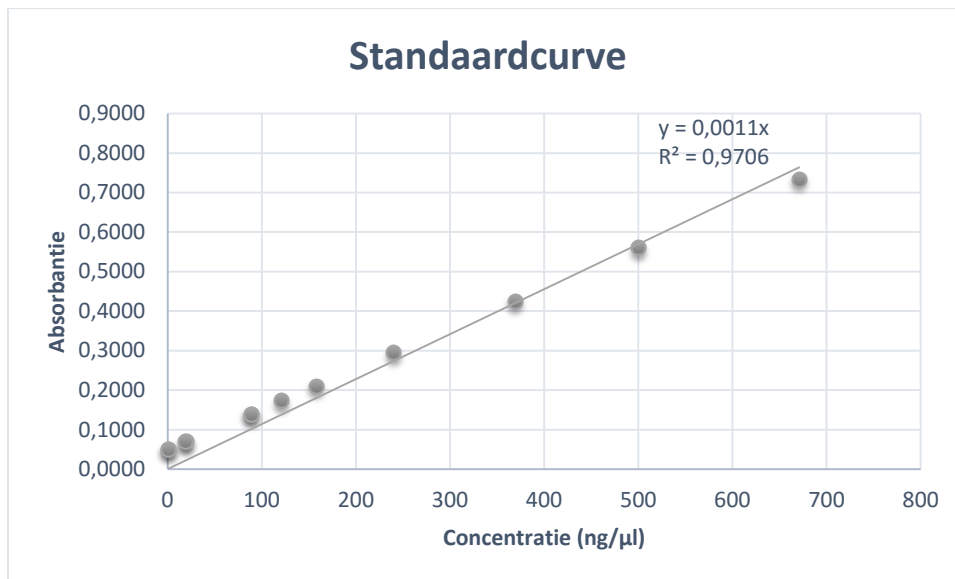
Figuur 16 Overnacht groei op 28°C van een streepenting van *E. amylovora* op LPGA voedingsmedium.

Op beide platen is een goede groei van *E. amylovora* waar te nemen. De petriplaat van 100 µl is goed begroeid. Bij de streepenting is het de bedoeling om individuele kolonies te verkrijgen zodat hiermee verder gesubcultuurd kan worden.

4.2. Meten van DNA-concentraties aan de hand van een standaardcurve van λ-DNA met de spectrofotometer

Om de correcte werking van de spectrofotometer na te gaan, werd een verdunningsreeks aangelegd van λ-DNA met een gekende concentratie van 482 ng/µl (200 ng/µl – 100 ng/µl – 50 ng/µl – 10 ng/µl – 1 ng/µl). Met de resultaten werd een standaardcurve opgesteld (zie Figuur 17). Hieruit kan besloten worden dat het toestel correcte metingen uitvoert aangezien de gemeten concentraties overeen kwamen met de uitgerekende concentraties.

Ook bij een concentratie van 1 ng/µl gaf de Multiskan GO nog een correcte waarde aan, de detectielimiet van het toestel ligt dus nog lager dan 1 ng/µl.



Figuur 17 Standaardcurve verkregen door een verdunningsreeks aan te leggen van Lamda-DNA met een gekende concentratie van 482 ng/μl. Dit werd gemeten met de spectrofotometer Multiskan GO.

4.3. Resultaten bacteriële DNA-extracties

4.3.1. Resultaten van de bacteriële DNA-extracties volgens Cheng & Jiang 2006

Het is de bedoeling om deze bacteriële DNA-isolatie protocollen te optimaliseren om er zeker van te zijn dat in een later stadium, tijdens de DNA-extracties van met *E. amylovora* geïnfecteerde plantenstalen, uit de bacteriële cellen voldoende DNA geëxtraheerd kan worden (zie paragraaf 3.4.2). De stalen die gebruikt werden zijn altijd *Erwinia amylovora* stam E3. Het verschil tussen stalen met nummer 3 en 6 zit in het jaar van afkomst. Stalen met nummer 3 zijn afkomstig uit 2012 en stalen met het nummer 6 uit 2015. Stalen met nummer 6.3 zijn ook afkomstig van 2015, deze zijn alleen opnieuw opgegroeid uit een nieuwe microtube van de stock in de -80°C diepvriezer.

Uit een DNA-extractie willen er stalen bekomen worden die een voldoende hoge zuiveringsgraad hebben, intact zijn en een hoge concentratie hebben. Stalen met een hoge DNA-opbrengst zullen een piek vertonen bij 260 nm. Uit de verhoudingen A_{260}/A_{230} en A_{260}/A_{280} kan besloten worden of het DNA al dan niet zuiver of gecontamineerd is. De verhouding A_{260}/A_{280} geeft een indicatie over de eiwit- of RNA contaminatie, deze verhouding ligt optimaal zo dicht mogelijk in de buurt van 1,8. De verhouding A_{260}/A_{230} geeft informatie over eventuele organische contaminatie. Om te spreken van zuiver DNA moet deze verhouding groter of gelijk zijn aan 2.

Het Cheng & Jiang protocol gaf vanaf de eerste keer al redelijk goede resultaten (zie Tabel 44, Extractie 1). De verhouding A_{260}/A_{230} zat wel nog te laag (1,20-1,78), maar voor LAMP kan dit zeker dienen aangezien deze techniek bij testen van vorige jaren al niet zo gevoelig bleek voor onzuiverheden. De verhouding A_{260}/A_{280} zat meteen al goed (1,46-1,84). Wel viel het op dat enkel met de uitvoering van het Cheng & Jiang protocol geen zuiver DNA bekomen werd. Hierdoor werd er besloten nog een ethanol precipitatie achteraf uit te voeren en het DNA vervolgens terug op te lossen in 100 μl TE-buffer. Dit bleek de oplossing te zijn om tot zuivere DNA-stalen te komen zoals aangegeven in Tabel 44, Extractie 1 na ethanol precipitatie.

Tabel 44 Ruwe resultaten DNA-extracties (bacterie) volgens Cheng & Jiang (2006)

Extractie	Staal	DNA-conc. (ng/ μ l) ^a	A ₂₆₀ /A ₂₃₀ ^a	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ^a	Totale opbrengst (μ g)
Extractie 1 Voor eth.prec.	160202-3A	Onder detectielimiet	1,01	1,10	/
	160202-3B	“	1,03	1,11	/
	160202-6A	“	1,02	1,10	/
	160202-6B	“	1,01	1,08	/
Extractie 1 Na eth. prec.	160202-3A	57,94	1,21	1,58	5,27
	160202-3B	76,72	1,32	1,72	6,98
	160202-6A	56,91	1,20	1,46	4,50
	160202-6B	168,73	1,78	1,84	14,50
Extractie 2	160202-3A	246,27	1,73	1,85	14,53
	160202-3B	161,52	1,44	1,81	13,73
	160202-6A	118,58	0,98	1,66	10,08
	160202-6B	102,21	0,92	1,61	8,69
Extractie 3 20x verdund ^b	6.3a-1	50,69	1,51	1,64	4,76
	6.3a-2	54,17	1,77	1,73	5,02
	6.3a-3	52,40	1,48	1,69	4,93

^a Voor elk staal werden telkens twee technische herhalingen (2 x 3 μ l) gemeten en iedere waarde in de tabel is dus het gemiddelde van deze twee technische herhalingen

^b Bij het oogsten van nieuwe petriplaten van *E. amylovora* werd de bacteriesuspensie al onmiddellijk 20 keer verdund aangezien dit nodig was voor extractie met het CTAB-DTT protocol.

Tijdens een tweede extractie gaven de stalen 3A en 3B goede resultaten, echter was de organische contaminatie zeer groot bij de stalen 6A (A₂₆₀/A₂₃₀ = 0,98) en 6B (A₂₆₀/A₂₃₀ = 0,92) en was de A₂₆₀/A₂₈₀ ook lager (1,66 en 1,61 respectievelijk). Dit kan komen doordat er niet goed gepipetteerd werd tijdens het afnemen van de bovenste waterige fase.

Extractie 1 en 2 zijn vertrokken vanuit dezelfde hoeveelheid bacteriële suspensie, deze mogen dan ook kwantitatief met elkaar vergeleken worden.

Een laatste extractie (Extractie 3) leverde ook goede resultaten op, hier had elk staal dat geëxtraheerd werd een goede DNA-opbrengst en zuiverheid. In het algemeen wordt er verwacht dat de stalen zuiver genoeg zijn voor later een LAMP-reactie op uit te voeren.

4.3.2. Resultaten van de bacteriële DNA-extracties volgens het CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004)

Het bacterieel DNA werd ook geëxtraheerd met een tweede protocol, gebaseerd op een CTAB-DTT methode oorspronkelijk bedoeld om blad DNA op te zuiveren (Khayat et al., 2004). Indien met dit protocol gemakkelijk DNA van voldoende kwaliteit geëxtraheerd kan worden uit bacteriële cellen, dan kan er met zekerheid gezegd worden dat uit de bacteriële cellen van *E.*

amylovora ook DNA vrijgezet zal worden tijdens de extractie van geïnfecteerde plantenstalen. Ook hier werden stalen gebruikt van *E. amylovora* stam E3.

Tijdens de uitvoering van dit protocol werd op een vreemd resultaat gestoten. Zo werd er na het toevoegen van phenol:chloroform:isoamyl alcohol en na centrifugatie geen twee lagen verkregen, maar drie. Het leek alsof de proteïne-bevattende interfase niet volledig doorzakte tussen de waterige en organische fase in, maar in de waterige fase bleef hangen. De kwaliteitscontrole van het DNA gaf ook duidelijk aan dat er nog veel organische contaminanten in het opgezuiverde DNA zaten (Tabel 45, Extractie 1; A_{260}/A_{230} is respectievelijk 0,87 en 1,02). In de pogingen om de probleem weg te werken, werden een aantal aanpassingen getest.

Een eerste aanpassing (zie Extractie 2 in Tabel 45) was het aantal bacteriën verminderen door de suspensie tien keer te verdunnen en vervolgens het protocol te volgen. Dit werd gedaan omdat er initieel gedacht werd dat de interfase niet doorzakte omdat er gewoonweg gestart werd met een teveel aan bacteriën. Dit had echter geen positief effect op het verschijnsel van de drie lagen, maar resulteerde wel in zuiverder DNA ($A_{260}/A_{230} = 1,32 - 1,67$ en $A_{260}/A_{280} = 1,79 - 1,99$). Een andere oorzaak kon zijn dat bij de Tris-verzadigde phenol misschien per ongeluk een beetje van de bovenliggende Tris-laag werd opgezogen met de pipet. Hier werd tijdens een volgende extractie extra op gelet. Er bleven zich drie lagen vormen. Verder werd er ook geprobeerd om na het toevoegen van de phenol:chloroform: isoamyl alcohol langer te centrifugeren, maar ook dit had geen effect.

Stalen met dezelfde staalcodes (160202-.. en 1.1-2.1) zijn afkomstig van dezelfde subcultuur en mogen daarom kwantitatief met elkaar vergeleken worden.

Tabel 45 Ruwe resultaten bacterieel DNA-extractie via CTAB-DTT protocol

Extractie	Staal	DNA-conc. (ng/ μ l) ^a	A_{260}/A_{230} ^a	A_{260}/A_{280} ^a	Totale opbrengst (μ g)
Extractie 1	160202-6A	64,61	0,87	1,59	4,52
	160202-6B	176,37	1,02	1,78	12,35
Extractie 2 <i>10x verdund</i>	160202-3A	111,08	1,32	1,89	7,66
	160202-3B	127,45	1,55	1,99	8,79
	160202-6A	179,66	1,67	1,93	11,50
	160202-6B	217,55	1,51	1,79	15,01
Extractie 3 <i>20x verdund</i> <i>+ test E. coli</i>	1.1A	42,60	0,52	1,33	1,62
	1.1B	20,00	0,78	1,57	0,76
	2.1A	4,80	0,12	0,57	0,18
	2.1B	17,40	0,47	1,33	0,66
	E. coli 1A	264,02	2,05	1,93	8,98
	E. coli 1B	652,06	2,16	2,00	28,70
	E. coli 2A	1114,12	2,10	2,00	49,02
	E. coli 2B	532,50	2,39	2,00	23,43
Extractie 4 <i>20x verdund</i>	160202-3A	61,32	2,67	1,90	2,70

<i>Extra chloroform stap voor fenol stap + aanpassing DTT: 0% - 0,1% - 1%</i>	1% (w/v) DTT				
	160202-3B 0,1% (w/v) DTT	37,30	2,54	1,44	1,64
	1.1 0% (w/v) DTT	20,98	/ (onbetrouwbaar ^b)	1,93	0,92
	160202-6A 1% (w/v) DTT	22,40	/	2,10	0,99
	160202-6B 0,1% (w/v) DTT	24,61	/	1,80	1,08
	2.1 0% (w/v) DTT	2,30	/	1,42	0,10
Extractie 5 <i>20x verdund + aanpassing DTT: 0,1% - 0,2% - 0,5%</i>	1.2A 0,1% (w/v) DTT	18,92	2,64	1,49	0,62
	1.2B 0,2% (w/v) DTT	5,78	/	1,05	0,22
	1.2C 0,5% (w/v) DTT	18,48	/	1,52	0,70
	2.2A 0,1% (w/v) DTT	3,73	/	1,04	0,14
	2.2B 0,2% (w/v) DTT	12,21	/	1,35	0,46
	2.2C 0,5% (w/v) DTT	19,71	/	1,57	0,75
Extractie 6 <i>20x verdund + orgineel protocol (extra chloroformstap)</i>	6.3a-1	123,24	1,53	1,81	11,58
	6.3a-2	103,87	1,89	1,87	9,76
	6.3a-3	92,06	1,70	1,85	8,65

^a Voor elk staal werden telkens twee technische herhalingen (2 x 3 µl) gemeten en iedere waarde in de tabel is dus het gemiddelde van deze twee technische herhalingen.

^b Tijdens het meten van de DNA-concentraties en zuiverheid werden er altijd herhalingen meegenomen. Indien deze herhalingen te veel van elkaar verschillen, zijn de resultaten onbetrouwbaar.

Na al deze pogingen werd besloten om het protocol uit te voeren met een andere bacterie (zie Extractie 3 in Tabel 44) om zo te kijken of het misschien aan de soort bacterie lag. Hiervoor werd *E. coli* gebruikt. Helaas trad ook bij deze *E. coli* DNA isolatie drie in plaats van twee lagen op. Wat wel opviel was dat de stalen van *E. coli* zeer zuiver waren ($A_{260}/A_{230} = 2,05 - 2,39$ en $A_{260}/A_{280} = 1,93 - 2,00$) terwijl de *E. amylovora* stalen in deze test zeer onzuiver waren ($A_{260}/A_{230} = 0,12 - 0,78$ en $A_{260}/A_{280} = 0,57 - 1,57$). Nochtans werd de *E. amylovora* bacterie suspensie nog meer verdund in deze test, namelijk twintig keer.

Met de extracties waar deze drie lagen gevormd werden, werd toch verder gewerkt. Er werd zo voorzichtig mogelijk geprobeerd om de waterige fase tussen de witte interfase uit te pipetteren. Wanneer het protocol dan vervolgd werd en de chloroform:isoamyl alcohol toegevoegd werd, werden hier wel gewoon twee lagen verkregen zoals verwacht en werden de metingen zoals weergegeven in Tabel 44 bekomen.

In volgende stappen voor betere resultaten werden aanpassingen gedaan in de CTAB-buffer zelf. Zo werd er eerst nagedacht over de werking van het reducerend agens DTT, was dit wel nodig voor de DNA-extractie uit bacteriën aangezien het protocol origineel opgesteld werd voor DNA-extractie uit plantenmateriaal en er bij bacteriën minder organische componenten zoals polyfenolen worden verwacht waarvan de oxidatie moet worden tegengegaan. Hiervoor werd een test gedaan met drie verschillende CTAB-buffers (zie Extractie 4 in Tabel 44): één met 0% (w/v) DTT, 0,1% (w/v) DTT en 1% (w/v) DTT. Tegelijk werd ook een chloroformstap ingevoerd voor de phenolstap om de meeste eiwitten al te kunnen verwijderen. Hier viel het onmiddellijk op dat de buffer met 0% (w/v) DTT twee lagen gaf. Helaas werd tijdens de meting van de DNA-concentratie en zuiverheid vastgesteld dat de resultaten duidelijk slechter waren dan wanneer er wél DTT toegevoegd wordt (A_{260}/A_{230} voor 0% - 0,1% en 1% (w/v) DTT respectievelijk = onbetrouwbaar - 2,54 - 2,67 en A_{260}/A_{280} respectievelijk = 1,42/1,93 - 1,80/1,44 - 2,10/1,90). Er is dus wel een reducerend agens nodig voor de bacteriële DNA-extractie.

Hierna werd er nog een bijkomende aanpassing gedaan met het percentage aan DTT (zie Extractie 5 in Tabel 44). Er werd 0,1% - 0,2% en 0,5% (w/v) DTT getest. Ook met deze lagere DTT concentraties werden zeer slechte resultaten bekomen. De verhouding A_{260}/A_{230} gaf elke keer een niet betrouwbaar resultaat, ook de A_{260}/A_{280} verhouding lag bij de meeste stalen nog te laag (1,04 - 1,57).

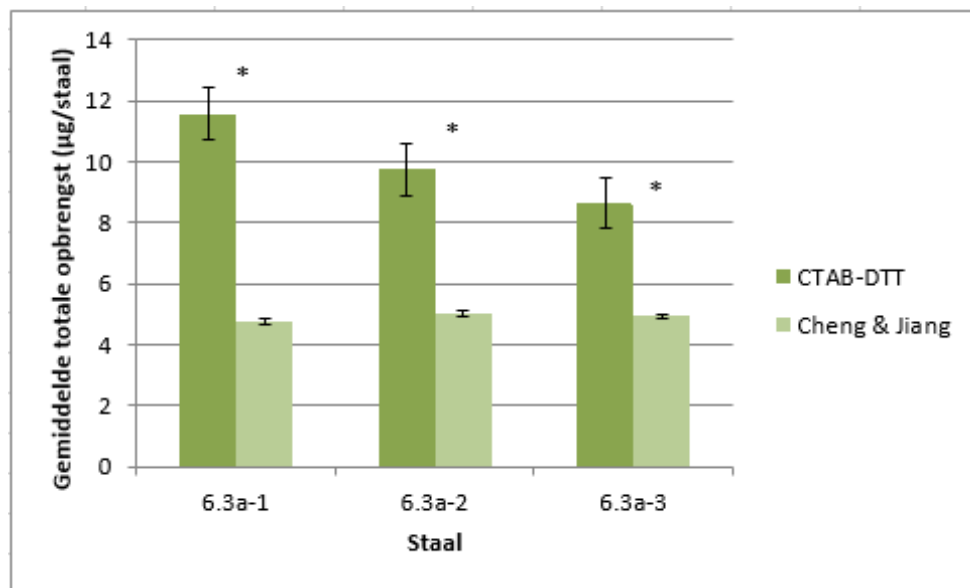
Uiteindelijk werd beslist om het gewone protocol te gebruiken, maar met de invoering van de extra chloroformstap vóór de phenolstap (dit staat ook zo vermeld in Materialen en methoden, zie paragraaf 3.5.2.). Hiermee werden goede resultaten verkregen (zie Extractie 6 in Tabel 44). De verhouding A_{260}/A_{230} mocht optimaal nog iets hoger liggen, maar deze resultaten ($A_{260}/A_{230} = 1,53 - 1,89$) zijn zuiver genoeg voor het uitvoeren van een LAMP-reactie. De A_{260}/A_{280} verhouding is zelfs voor de drie geteste stalen rond de 1,8 wat betekent dat er weinig of geen RNA- en/of eiwitcontaminatie aanwezig is.

4.3.3. Vergelijking Cheng & Jiang 2006 en CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004)

Voor de vergelijking van beide methodes worden de gemiddelde waardes gebruikt van de resultaten ($n = 3$) verkregen met de laatste DNA-extracties (zie ook Tabel 43 en 44). Hier werden de geoptimaliseerde protocollen toegepast en de beste resultaten verkregen.

De vergeleken stalen zijn van dezelfde oorsprong, *E. amylovora* geogst van dezelfde subcultuur, en dus ook dezelfde hoeveelheid aan bacteriën waardoor ook een kwantitatieve vergelijking mogelijk is.

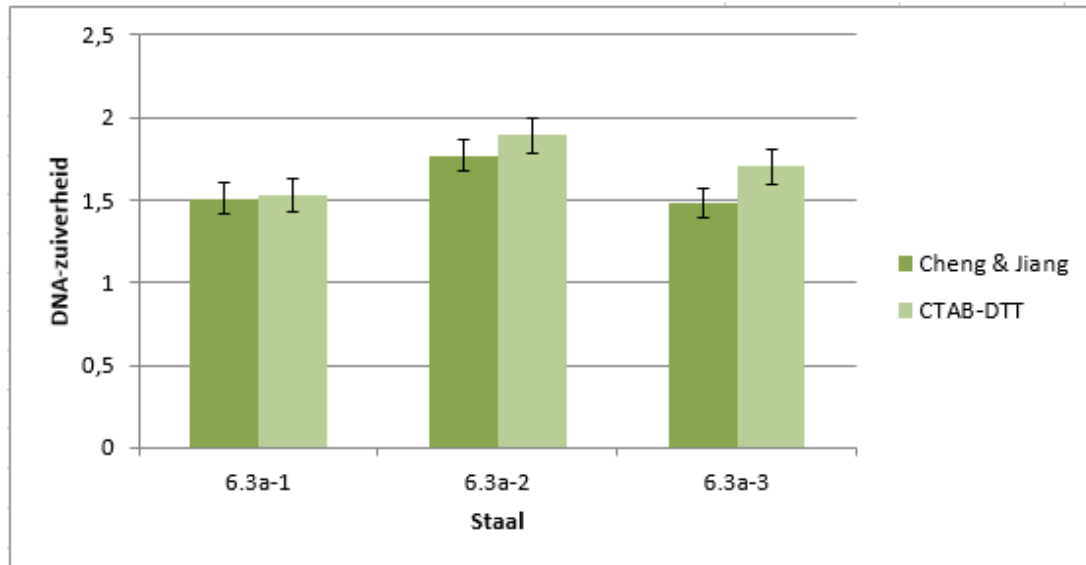
Uit de grafiek (zie Figuur 18) valt duidelijk op dat met het CTAB-DTT protocol een gemiddeld hogere DNA-opbrengst verkregen wordt in vergelijking met het Cheng & Jiang protocol. Er werd ook een T-toets uitgevoerd (zie paragraaf 3.14.2) waaruit bleek dat er een significant verschil is tussen beide methodes met een significant hogere opbrengst voor het CTAB-DTT protocol dan het Cheng & Jiang protocol. De hogere DNA-concentraties verkregen door het CTAB-DTT protocol is te verwachten aangezien het Cheng & Jiang een veel sneller protocol is en dit heeft natuurlijk ook invloed op de DNA-opbrengst. Een betere staalvoorbereiding (zoals in het CTAB-DTT protocol) zorgt ervoor dat er meer DNA vrijgezet wordt. De opbrengst verkregen met het Cheng & Jiang protocol is echter wel nog meer als voldoende voor het uitvoeren van LAMP.



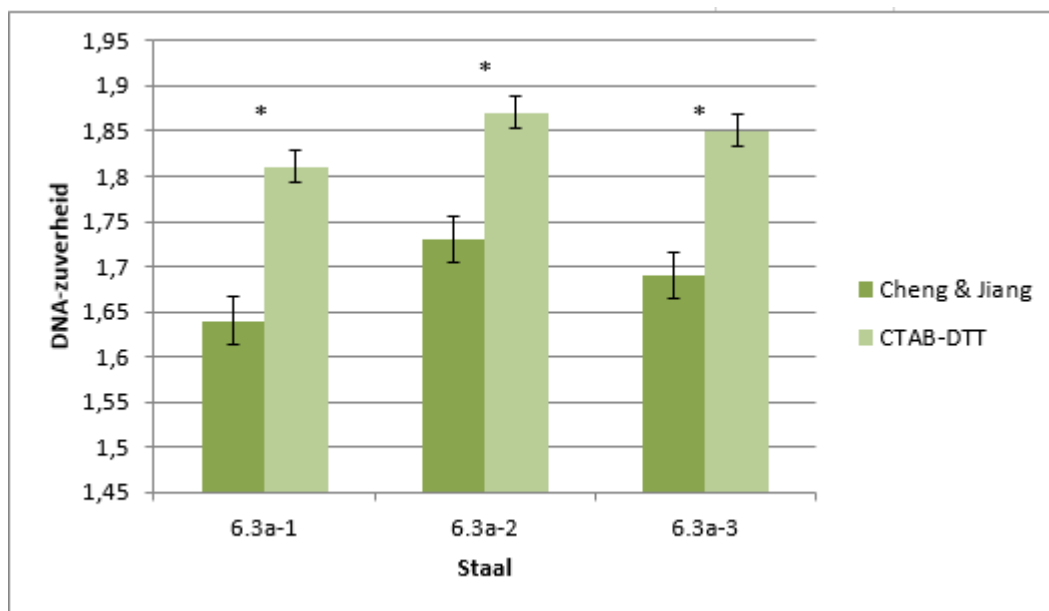
Figuur 18 Vergelijking gemiddelde ($n=3$) DNA-opbrengsten verkregen uit *Erwinia amylovora* stalen met het Cheng & Jiang 2006 protocol en het CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004). Voor elk staal werd DNA geïsoleerd uit 3 substalen met het Cheng & Jiang 2006 protocol en 3 substalen met het CTAB-DTT protocol. Elk substaal bestond uit 1 ml van een verzadigde *E. amylovora* suspensie bekomen na het oogsten van een geïncubeerde (24u, 28°C) Petriplaat met LPGA medium. Na centrifugatie (5 min, 8000 g, 4°C) en verwijdering van het supernatans werd DNA uit de bacteriële pellet geïsoleerd. Een T-toets werd uitgevoerd voor elk staal. Een sterretje boven de gegevens geeft aan dat er een significant verschil is ($p < 0,05$) tussen de gemiddelde opbrengsten bekomen met beide DNA extractiemethoden.

In Figuur 19 is de vergelijking van de beide methodes waar te nemen voor de gemiddelde A_{260}/A_{230} -verhouding. Hieruit blijkt dat de CTAB-DTT methode resulteert in een iets hogere verhouding en dus minder organische contaminanten bij elk getest staal. Echter blijkt uit de T-toets dat het geen significant verschil is tussen beide DNA-extractie methodes. Figuur 20 geeft

de vergelijking van de gemiddelde A_{260}/A_{280} -verhouding weer. Ook hier werd een T-toets uitgevoerd waaruit bleek dat er voor elk staal een significant hogere A_{260}/A_{280} en dus minder contaminerende eiwitten werd bekomen met het CTAB-DTT protocol dan met het snellere Cheng & Jiang protocol ($>1,8$ vs. $<1,75$, respectievelijk). Om te besluiten kan er dus zuiverder DNA verkregen worden met het CTAB-DTT dan met het Cheng & Jiang protocol.



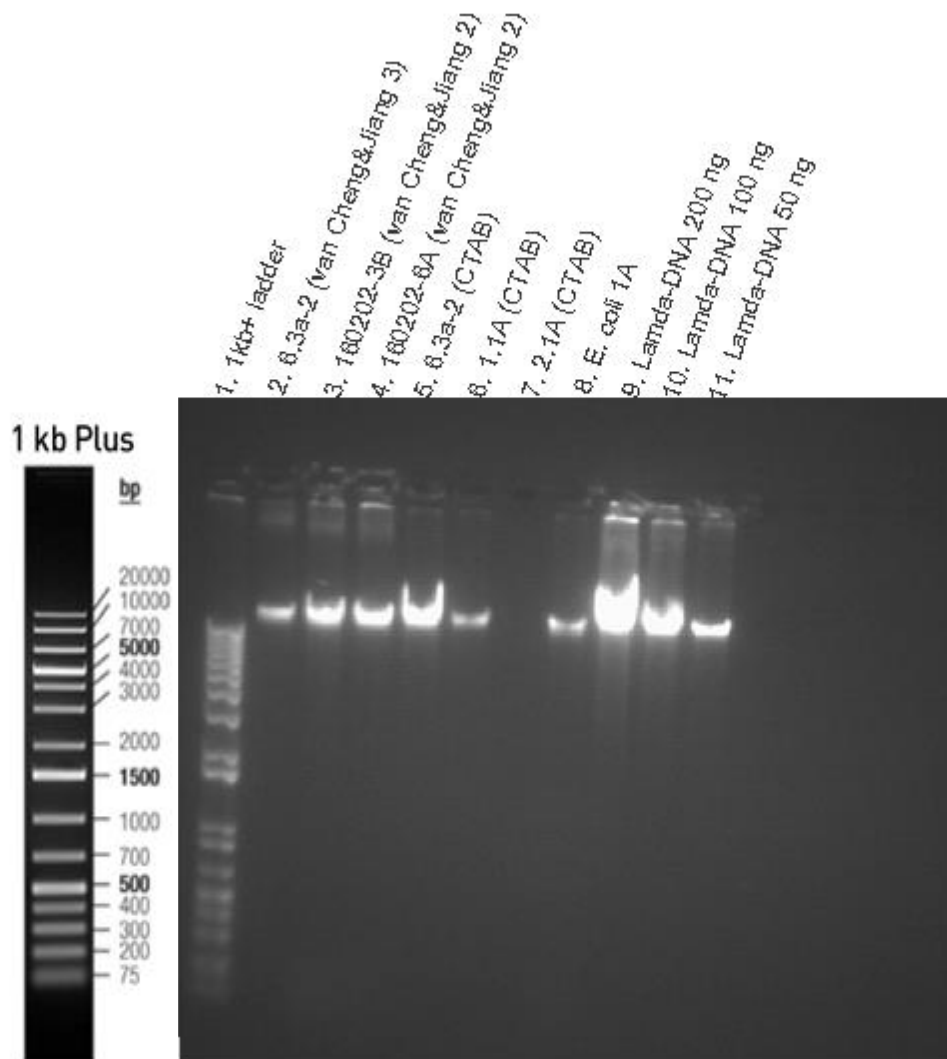
Figuur 19 Vergelijking DNA-zuiverheid wat betreft organische componenten (A_{260}/A_{230}) Cheng & Jiang 2006 protocol met CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004).



Figuur 20 Vergelijking DNA-zuiverheid wat betreft eiwit- en/of RNA-contaminanten (A_{260}/A_{280}) Cheng & Jiang 2006 protocol met CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004).

4.3.4. Resultaten gelelektroforese van bacterie DNA stalen

Om de intactheid van het DNA na te gaan, werden een aantal stalen gecontroleerd met een agarose gelelektroforese (zie paragraaf 3.11).



Figuur 21 Resultaat gelelektroforese bacterie DNA stalen. Een selectie van zeven bacterie DNA stalen waarvan één *E. coli* DNA staal werden geladen in de slotjes van een 0.8% (w/v) TAE gel. De gel werd gedurende 45 minuten bij 80V gelopen. Van elk staal werd 3 μ l geladen. De slotnummers en namen van de bijhorende stalen zijn bovenaan de gel weergegeven. De DNA-concentraties kunnen teruggevonden worden in Tabel 43 en 44. Bv. Cheng & Jiang 3 = Extractie 3 van Cheng & Jiang protocol.

In het eerste laantje bevindt zich de 1kb+ ladder. Zoals verwacht bevindt elk DNA staal zich nog boven deze ladder met als grootste fragment 20 kb. Dit was verwacht omdat de DNA-stalen hoog moleculair gewicht genomisch DNA bevatten, wat bovendien ongeknipt is. In de laantjes 9, 10 en 11 bevindt zich λ -DNA met een input van respectievelijk 200 ng, 100 ng en 50 ng. Hiermee kan vergeleken worden of de diktes van de fragmenten overeenkomen met de gemeten opbrengst.

De fragmenten van de bacteriestalen worden duidelijk dunner en minder zichtbaar naarmate de input afneemt. De hoeveelheden geschat vanuit de intensiteit van de fragmenten op gel van de bacteriestalen komen daarenboven goed overeen met de gemeten concentraties en opbrengsten met de Multiskan GO spectrofotometer. Zo bevat laantje 5 bijvoorbeeld het dikste fragment, dit staal (6.3a-2 van het CTAB protocol) heeft ook de hoogste concentratie (103,87 ng/ μ l). Het staal in laantje 6 heeft maar een dun fragment, ook dit komt overeen met de concentratie welke slechts 42,60 ng/ μ l bedraagt. Er werd telkens 3 μ l van een staal geladen, de geladen hoeveelheden bedragen dus 312 ng en 128 ng, respectievelijk.

Enkel in laantje 7 is geen fragment waar te nemen. Ook dit was te verwachten. Dit staal (2.1A) gaf een zeer lage concentratie (amper 4,80 ng/ μ l) en opbrengst (0,18 μ g) en bovendien een zeer slechte DNA-zuiverheid ($A_{260}/A_{230} = 0,12$ en $A_{260}/A_{280} = 0,57$) zoals gemeten met de spectrofotometer. Het is dus logisch dat hier geen fragment verschijnt aangezien de input laag is en het staal zéér onzuiver is.

Tenslotte is het ook belangrijk dat op de gel geen RNA zichtbaar is (dit wordt waargenomen als 'vlekken' onderaan de gel). Hieruit wordt besloten dat de RNase behandeling dus duidelijk volstond.

Uit al deze resultaten wordt besloten dat met het CTAB-DTT (Khayat *et al.*, 2004) protocol ook efficiënt DNA uit *E. amylovora* geïsoleerd kan worden. Dit is belangrijk aangezien dit protocol later ook gebruikt wordt voor het isoleren van geïnfecteerd plantenmateriaal. Zo kan er met zekerheid gezegd worden dat tijdens die extracties het DNA van de *E. amylovora* ook vrijgezet wordt.

4.4. DNA-extracties van niet-geïnfecteerd plantenmateriaal

4.4.1. Resultaten van de DNA-extracties van niet-geïnfecteerd plantenmateriaal volgens CTAB-DTT (Khayat *et al.*, 2004) protocol

Het CTAB-DTT protocol (Khayat *et al.*, 2004) (zie paragraaf 3.7.2) werd uitgetest op verschillende niet-geïnfecteerde plantenstalen. Zowel bloembotten (BB), schors van 1- en 2-jarig hout (S) en bloemen (BL) werden gebruikt voor deze DNA-extracties van de rassen 'Conference' peer, 'Jonagold' appel en 'Svatana' appel.

Al bij de eerste meting viel het op dat de schors van de twijgjes moeilijkheden gaf om DNA uit te extraheren (zie Extractie 1 in Tabel 46). Bij de methode werd gebruikt gemaakt van de CTAB-buffer in combinatie met de handcrusher. Het was echter moeilijk het schors-weefsel volledig te crushen waardoor er geen DNA kon vrijkomen. Voor beide bloembot stalen werden wel goede resultaten verkregen. Het DNA had een goede zuiverheid ($A_{260}/A_{230} = 2,00-2,04$ en $A_{260}/A_{280} = 1,98-2,02$). Tijdens een tweede extractie (zie Extractie 2 in Tabel 46) werd een nieuwe poging gedaan met dezelfde techniek om DNA vrij te krijgen uit de schors, wat ook deze keer niet lukte. Er werden negatieve DNA-concentraties verkregen, de opbrengst van het DNA lag dus beneden de detectielimiet van het toestel.

Om dit probleem te verhelpen, werden de stukjes schors vervolgens eerst in zeer kleine stukjes gesneden in een plastic Petriplaat en met toevoeging van CTAB-buffer (zie Extractie 3 in Tabel 46). Hierna werden deze nog eens extra behandeld met de handcrusher. Deze manier bleek al een heel stuk efficiënter te zijn. Er werd zowel bij de 'Conference', 'Jonagold' als bij de 'Svatana' een behoorlijk goede opbrengst verkregen (gemiddeld 0,20 μ g, 3,43 μ g en 1,28 μ g per staal,

respectievelijk). De zuiverheid van het DNA lag hier wel nog zeer laag; gemiddeld 0,45 voor A_{260}/A_{230} en gemiddeld 0,99 voor A_{260}/A_{280} voor de drie rassen. Tijdens extractie 3 werden ook bloembotten meegenomen van elk ras. De verkregen resultaten waren zuiver genoeg om mee verder te werken, enkel de A_{260}/A_{230} verhouding van de 'Conference' stalen lag te laag (0,93 en 1,12).

Ook Extractie 4 werd op dezelfde manier uitgevoerd als Extractie 3 en er werd voor de eerste maal ook open bloemen getest. Om de DNA-opbrengst en zuiverheid van de schors nog te verbeteren, werd er besloten om de homogenisatie van de stalen te doen met vloeibare stikstof (zie paragraaf 3.7.2) in plaats van de handcrusher. De eerste resultaten hiervan zijn terug te vinden in Tabel 46 Extractie 5. Naast een 'Jonagold' schorsstaal werden er ook twee 'Svatana' bloemenstalen meegenomen. De zuiverheid van het schorsstaal was nu veel beter (1,43 voor A_{260}/A_{230} en 1,66 voor A_{260}/A_{280}) dan bij de eerdere extracties met de hand homogenisator. Het staal in bevroren toestand houden en met mortier verpulveren leidt dus bij schors tot zuiverder DNA, maar dit werd verder getest (zie hieronder). De DNA opbrengst met vloeibare stikstof was vergelijkbaar met de opbrengst bekomen met de hand homogenisator (zie 'Jonagold' schors in Extractie 4 en 5 in Tabel 46, A_{260}/A_{230} ging van gemiddeld 1,33 naar 1,43 en A_{260}/A_{280} van gemiddeld 1,57 naar 1,66).

Tijdens een zesde extractie werden dan schorsstalen van de verschillende soorten getest. De meeste bekomen resultaten hadden een voldoende hoge opbrengst en zuiverheid ($A_{260}/A_{230} = 0,61 - 2,00$ en $A_{260}/A_{280} = 1,30 - 2,38$) om mee verder te werken in LAMP. Het viel op dat de 'Svatana' en 'Conference' schors iets moeilijker bleken te zijn om DNA uit te extraheren (de gemiddelde DNA-opbrengsten voor 'Jonagold', 'Conference' en 'Svatana' zijn respectievelijk 3,04 μg , 1,49 μg en 1,42 μg). Een logische verklaring kan hier niet direct voor gegeven worden tenzij dat de 'Jonagold' schors soepeler en minder vezelrijk is en daardoor gemakkelijker en beter verpulverd kan worden.

Extractie 7 in Tabel 46 geeft de resultaten weer van extra RNase-behandelde stalen, meer uitleg hierover in paragraaf 4.3.4.

Uiteindelijk werd een laatste extractie 8 uitgevoerd met enkel bloemenstalen, de verpulvering werd hier ook gedaan met vloeibare stikstof. De resultaten van deze stalen waren voldoende met een gemiddelde van 1,26 voor de A_{260}/A_{230} -verhouding en een gemiddelde van 1,71 voor de A_{260}/A_{280} -verhouding voor de vier geteste stalen.

Tabel 46 Ruwe resultaten DNA-extractie plantstalen via CTAB-DTT protocol (Khayat et al 2004)

Extractie	Staal	DNA-conc. (ng/ μl) ^a	A_{260}/A_{230} ^a	A_{260}/A_{280} ^a	Totale opbrengst ($\mu\text{g}/400$ mg weefsel)
Extractie 1 <i>Hand crusher</i>	Bloembot 1	257,45	2,00	1,98	24,20
	Bloembot 2	406,47	2,04	2,02	38,21
	Schors	-1,42	/ (niet betrouwbaar)	/	/

Extractie 2 <i>Hand crusher</i>	Schors 1	-21,27	2,63	0,87	/
	Schors 2	-20,34	/	0,87	/
Extractie 3 <i>Schors klein snijden in Petriplaat</i>	Conf BB 1	178,77	0,93	1,57	16,80
	Conf BB 2	196,23	1,12	1,61	18,45
	Conf S 1	16,27	0,39	1,10	1,43
	Conf S 2	4,31	0,23	0,66	0,41
	Jona BB 1	195,88	2,15	2,13	18,41
	Jona BB 2	299,22	2,32	2,15	28,13
	Jona S 1	43,04	0,87	1,14	4,05
	Jona S 2	29,85	0,43	1,21	2,81
	Svat BB 1	346,27	1,66	2,04	32,55
	Svat BB 2	297,11	1,72	2,02	27,93
	Svat S 1	4,66	0,40	0,72	0,44
	Svat S 2	22,60	0,40	1,13	2,12
Extractie 4 <i>Schors klein snijden in Petriplaat</i>	Conf BB 1	331,67	1,09	1,57	31,18
	Conf BB 2	135,20	1,18	1,66	12,30
	Conf S 1	15,00	1,32	1,76	1,32
	Conf S 2	-0,34	/	/	/
	Jona BB 1	842,30	2,18	2,05	79,18
	Jona BB 2	265,39	2,04	2,01	24,15
	Jona S 1	52,21	1,19	1,42	4,91
	Jona S 2	65,88	1,47	1,73	6,19
	Svat BL 1	116,42	1,51	2,16	10,94
	Svat BL 2	173,09	1,77	1,80	16,27
	Svat BB 1	552,40	2,29	2,11	50,27
	Svat BB 2	634,51	2,25	2,03	59,64
	Svat S 1	-35,69	0,84	0,92	/
	Svat S 2	-33,63	1,10	1,00	/
Extractie 5 <i>Gebruik van vl. stikstof</i>	Svat BL 1	161,18	1,45	1,91	15,15
	Svat BL 2	105,20	1,53	1,92	9,89
	Jona S	63,65	1,43	1,66	5,98
Extractie 6 <i>Gebruik van vl. stikstof</i>	Conf S 1A	21,67	0,73	1,61	2,04
	Conf S 1B	15,59	1,38	1,83	1,42
	Conf S 2A	20,93	1,49	2,37	1,97
	Conf S 2B	5,59	0,68	2,38	0,51
	Jona S 1A	65,15	1,29	1,56	6,12
	Jona S 1B	32,45	1,72	1,68	2,95

	Jona S 2A	90,88	1,40	1,49	8,54
	Jona S 2B	39,71	2,00	1,75	3,61
	Svat S 1	13,09	0,61	1,30	1,23
	Svat S 2	16,99	0,92	1,35	1,60
Extractie 7 <i>Extra RNase behandeling</i>	Conf BB 2	3,68	0,18	1,16	0,35
	Jona BB 2	3,14	0,15	1,32	0,29
	Svat BB 1	5,69	0,24	1,57	0,53
Extractie 8 <i>Gebruik van vl. stikstof + langere incubatie RNase</i>	Svat BL A	149,80	1,20	1,67	14,08
	Svat BL B	109,46	1,08	1,57	10,29
	F1 A ^b	189,51	1,37	1,81	17,81
	F1 B ^b	203,28	1,39	1,77	19,11

^a Voor elk staal werden telkens twee technische herhalingen (2 x 3 µl) gemeten en iedere waarde in de tabel is dus het gemiddelde van deze twee technische herhalingen.

^bF1 is een niet-geïnfecteerde controleboom uit de serre ('Jonagold' appel), dit zijn bloem stalen

4.4.2. Resultaten van de DNA-extracties volgens de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene

Hieronder worden de resultaten weergegeven welke verkregen werden met de OptiGene Plant Material DNA Extraction Kit (zie ook paragraaf 3.8.2). Ook hier werd gebruik gemaakt van dezelfde stalen: bloembotten, schors van 1- en 2-jarig hout en bloemen.

De Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene is een zeer snelle methode om DNA vrij te krijgen uit plantenmateriaal. Net omdat dit zo een snelle methode is, uit dit zich ook in de resultaten (zie Tabel 47). Er wordt wel een goede DNA-opbrengst verkregen voor al de stalen, maar het DNA is niet zuiver. Zowel de A_{260}/A_{230} verhouding (gemiddeld 0,48 over alle stalen heen) als de A_{260}/A_{280} verhouding (gemiddeld 0,97 over alle stalen heen) liggen te laag. Het is wel verassend dat met de schors stalen van 1-jarig hout van 'Svatana' een relatief goede opbrengst werd bekomen (63,53 µg). Bovendien werd ook uit schors van 2-jarig hout een goede DNA opbrengst bekomen voor de drie geteste rassen (115 µg voor 'Conference', 69,86 µg voor 'Jonagold' en 104,12 µg voor 'Svatana'). Het doel van deze kit is om direct een geschikte template te bekomen voor LAMP. Daar de LAMP-techniek robuust is, wordt er verwacht dat deze zuiverheid wel voldoende is. Bovendien werd dit al vastgesteld in enkele testen vorig jaar [25]. Het is dus een ideale methode voor snel stalen te behandelen, wat uiteindelijk het doel is van de LAMP-techniek.

Tabel 47 Resultaten van DNA-extracties m.b.v. de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene

Staal (datum van extractie)	DNA-conc. (ng/µl)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	Totale opbrengst (µg/400 mg weefsel)
Svat BB 30/03	102,35	0,45	0,91	9,62

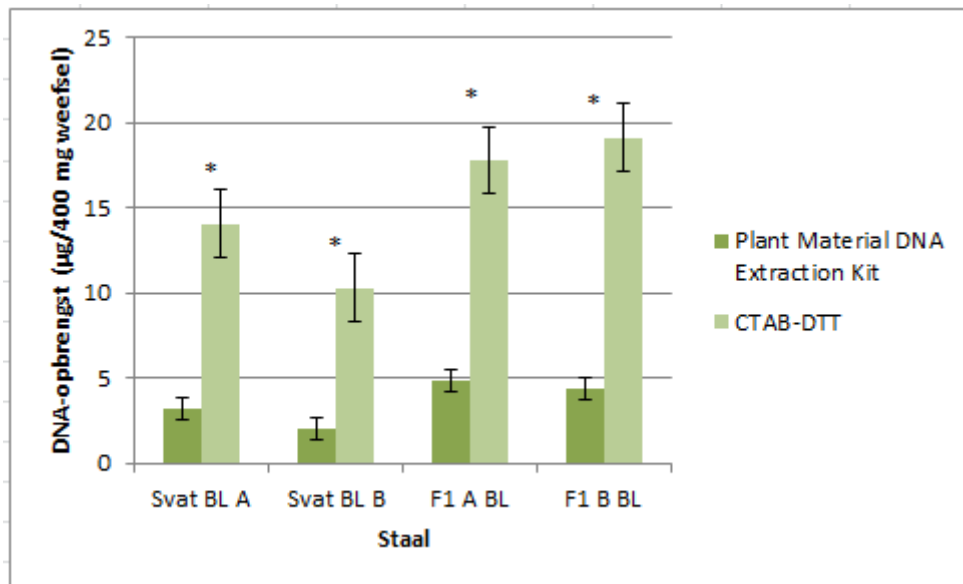
Svat S 30/03	42,35	0,46	1,62	3,98
Conf S 2J ^a 14/04	76,67	0,30	0,89	7,21
Conf BB 14/04	92,84	0,60	1,03	8,73
Jona BB 14/04	97,55	0,41	0,55	9,17
Jona S 2J ^a 14/04	46,57	0,48	0,86	4,38
Svat BB 14/04	117,84	0,40	0,64	11,08
Svat S 2J ^a 14/04	69,41	0,44	0,74	6,52
Svat BL 15/04	66,18	0,57	1,28	6,22
Svat BL 1 27/04	32,75	0,53	1,25	3,08
Svat BL 2 27/04	60,59	0,51	1,33	5,70
Svat BB 27/04	154,80	0,45	0,66	14,55
Conf BB 27/04	43,14	0,54	0,96	4,06
Jona BB 27/04	55,20	0,39	0,59	5,19
Svat BL A	34,31	0,50	1,16	3,23
Svat BL B	22,06	0,51	0,97	2,07
F1 A BL ^b	51,86	0,51	1,01	4,87
F1 B BL ^b	47,16	0,54	0,96	4,43

^a S 2J = 2-jarig hout

^bF1 is een niet-geïnfecteerde controleboom uit de serre ('Jonagold' appel), dit zijn bloem stalen

4.4.3. Vergelijking van CTAB-DTT protocol (Khayat *et al.*, 2004) en de Plant Material DNA Extraction Kit

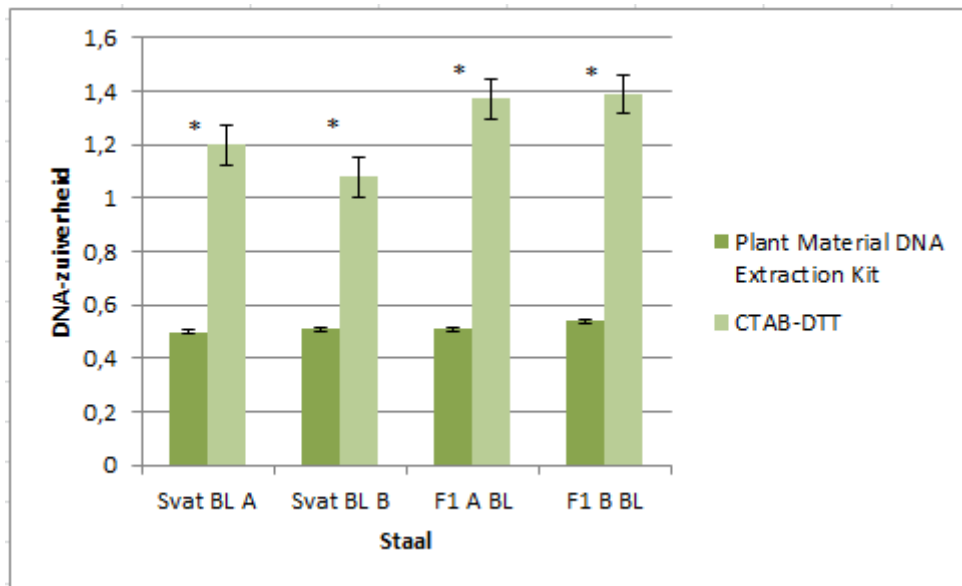
Voor de vergelijking wordt gebruik gemaakt van de laatst geëxtraheerde stalen (Tabel 47: Svato BL A, Svato BL B, F1 A BL en F1 B BL) omdat hier het geoptimaliseerde Khayat *et al.*, 2004 protocol toegepast werd (zie Tabel 46 Extractie 8).



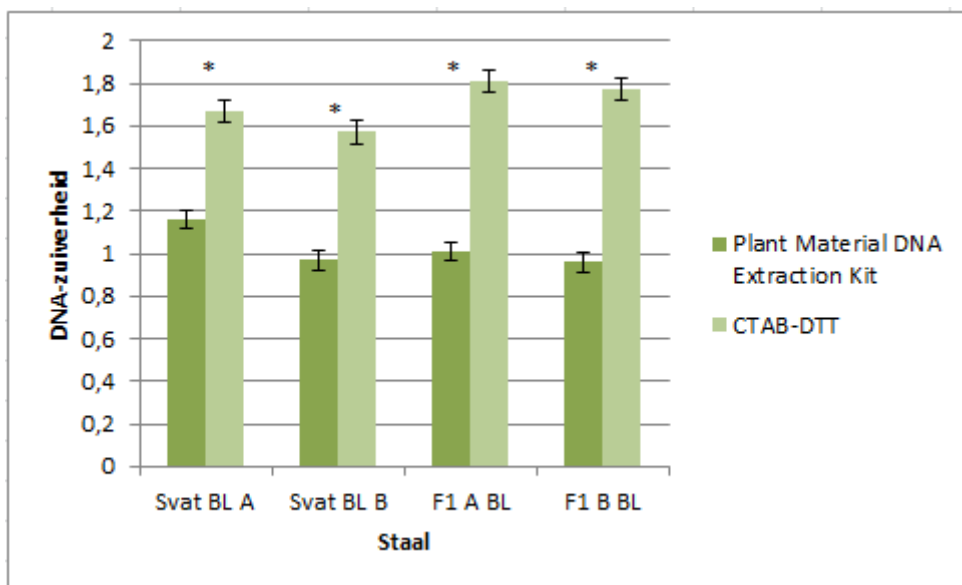
Figuur 22 Vergelijking gemiddelde DNA-opbrengsten (n=4) verkregen met de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene en met het CTAB-DTT (Khayat et al., 2004) protocol uit niet-geïnfecteerde bloemstalen afkomstig van potbomen. Elk staal bestond uit 400 mg plantenweefsel. Een T-toets werd uitgevoerd: een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil is tussen beide DNA extractiemethodes.

In Figuur 22 is duidelijk het verschil tussen de DNA opbrengst waar te nemen van de Plant Material DNA Extraction Kit en het CTAB-DTT protocol. Er werd een T-toets uitgevoerd waaruit blijkt dat er een significant hogere opbrengst (tot vier maal hoger) wordt bekomen met het CTAB-DTT protocol. Dit is ook wat er verwacht werd aangezien de kit enkel dient om snel DNA te extraheren voor gebruik in de LAMP procedure. Het is dus niet nodig om een grote hoeveelheid DNA te hebben.

Ook voor de A_{260}/A_{230} en A_{260}/A_{280} verhoudingen geldt hetzelfde (zie Figuur 23 en 24). Voor beide vergelijkingen werd opnieuw een T-toets uitgevoerd voor de vier stalen waaruit besloten wordt dat er voor beide een significant verschil is tussen de twee methodes. Significant minder organische (A_{260}/A_{230} , Figuur 23) en minder eiwit contaminanten (A_{260}/A_{280} , Figuur 24) zijn aanwezig in de DNA stalen bekomen met het CTAB-DTT protocol. Doordat de kit sneller is en er geen extra stappen gedaan worden om eiwitten, RNA,... te verwijderen, ligt de zuiverheid lager dan bij de CTAB-DTT methode. Waarschijnlijk vormt dit geen probleem voor de LAMP-techniek, deze techniek is robuust genoeg om zelfs onzuivere stalen te kunnen amplificeren. Maar indien detectie en kwantificatie vereist is met qPCR zal de zuiverheid van de DNA stalen bekomen met de OptiGene kit zeker niet volstaan en is isolatie met het CTAB-DTT protocol nodig [25].

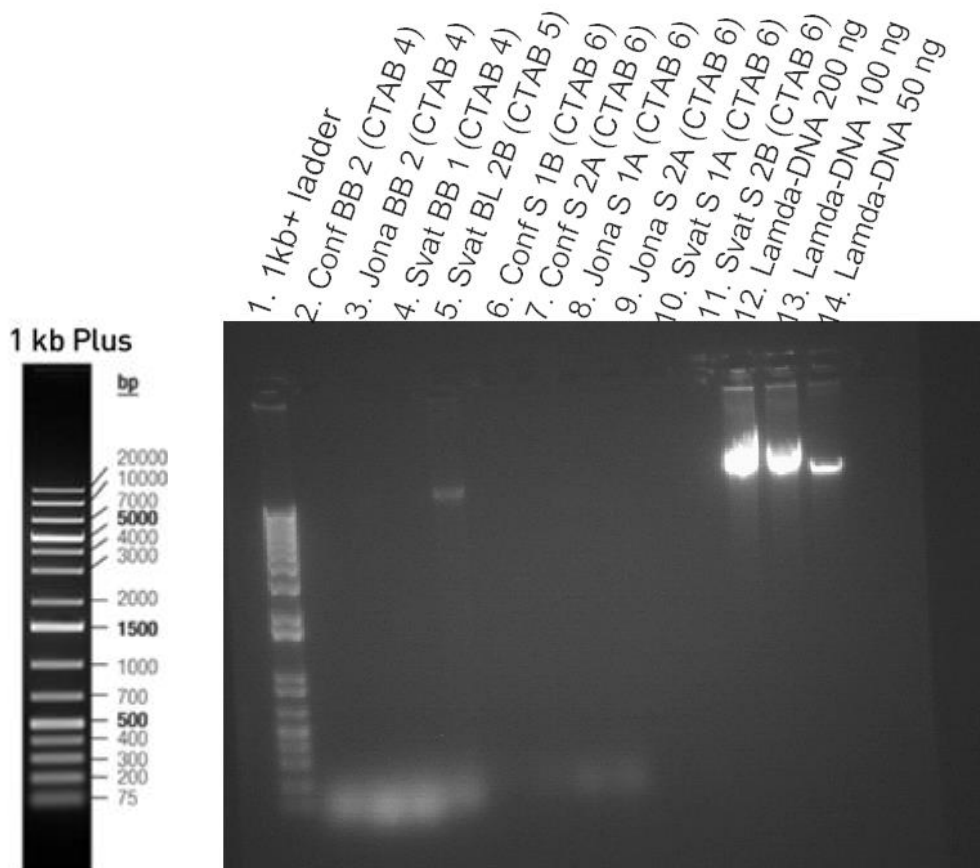


Figuur 23 Vergelijking van de DNA-zuiverheid wat betreft organische contaminanten (A_{260}/A_{230}) met de Plant Material DNA Extraction Kit en het CTAB-DTT (Khayat et al., 2004) protocol van niet-geïnfecteerd plantestalen. Een T-toets werd uitgevoerd: een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil is tussen beide DNA extractiemethodes.



Figuur 24 Vergelijking van de DNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280}) met de Plant Material DNA Extraction Kit en het CTAB-DTT (Khayat et al., 2004) protocol van niet-geïnfecteerd plantestalen. Een T-toets werd uitgevoerd: een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil is tussen beide DNA extractiemethodes.

4.4.4. Resultaten gelelektroforese van niet-geïnfecteerde plantenstalen



Figuur 25 Gelelektroforese van DNA geïsoleerd uit niet-geïnfecteerde plantenstalen (BB = bloembot, BL = open bloem, S = schors van 1- of 2-jarig hout) van drie rassen ('Conference', 'Jonagold' en 'Svatana'). De corresponderende stalen kunnen terug gevonden worden in Tabel 46 en 47. CTAB 4 staat bv. voor de vierde extractie van het CTAB-DTT protocol. De stalen werden geladen in de slotjes van een 0.8% (w/v) TAE gel. De gel werd gedurende 45 minuten bij 80V gelopen. Van elk staal werd 3 μ l geladen.

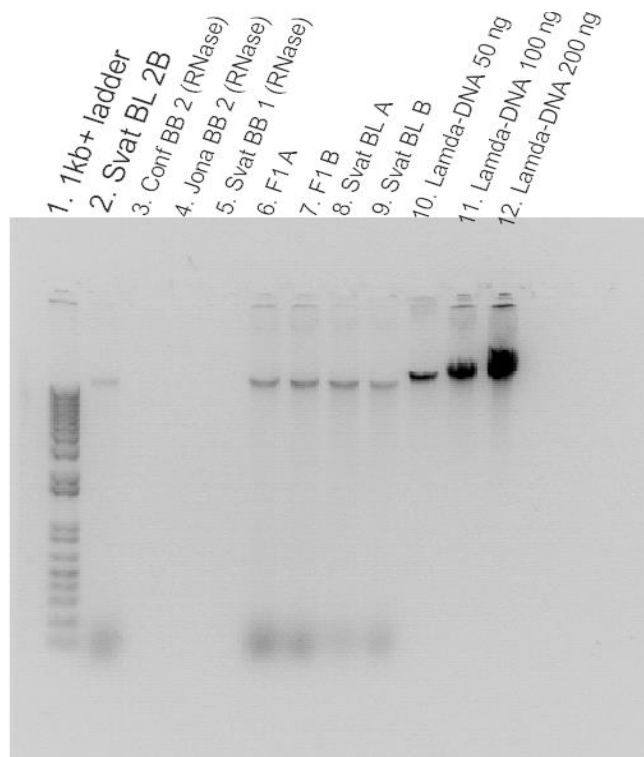
Op deze gel valt het onmiddellijk op dat er bij de meeste stalen geen bandjes te zien zijn. Enkel bij het staal in laantje 5, Svatana bloem 2B is een DNA-bandje waar te nemen. Bij de rest van de stalen (zowel de bloembotten als de schors) is er enkel onderaan de gel RNA zichtbaar. De reden dat er geen bandje waar te nemen is, kan twee oorzaken hebben. Ofwel zijn de gemeten DNA-concentraties enkel RNA aangezien ook RNA gemeten wordt bij een golflengte van 260 nm. Een hoge aanwezigheid van RNA kan dan zorgen voor een overschatting van de DNA-opbrengst. Een tweede oorzaak kan zijn dat bij de DNA-isolatie het DNA verloren geraakt is door bijvoorbeeld de pellet mee op te zuigen. Aan de gelelektroforese zelf ligt het probleem niet, de 1kb+ ladder (laantje 1) is wel duidelijk waar te nemen alsook het Lamda-DNA van 200, 100 en 50 ng is gelukt.

Op de bloembot stalen (Conf BB 2, Jona BB 2 en Svat BB 1) werd vervolgens een nieuwe RNase-behandeling uitgevoerd (60 min incubatie bij 37°C) om het aanwezige RNA te verwijderen. Het RNase werd vervolgens verwijderd met een fenol:chloroform:isoamyl alcohol extractie, opgezuiverd met chloroform:isoamyl alcohol extractie en na precipitatie opgelost in 100 μ l TE-buffer. De resultaten zijn terug te vinden in Tabel 45 onder Extractie 7. De gemeten DNA-concentraties waren laag (ongeveer 3-5 ng/ μ l) waardoor er aangenomen wordt dat het

inderdaad vooral RNA was dat voorheen gemeten werd in de originele stalen. Uiteraard treedt er een deel verlies op van DNA door deze extra RNase behandeling procedure maar zelfs als er 50% verlies opgetreden is, blijft de DNA concentratie ($\pm 6-10$ ng/ μ l) en dus opbrengst ($\pm 0,4-1$ μ g) laag.

Daarnaast werd ook een nieuwe DNA-isolatie uitgevoerd met het CTAB-DTT (Khayat *et al.*, 2004) protocol (zie paragraaf 3.7.2) op stalen Svat BL A, Svat BL B, F1 A BL en F1 B BL. Hier werd de RNase incubatiestap verlengd tot één uur. De bekomen DNA stalen werden op gel gezet evenals opnieuw het enige positieve DNA staal uit Figuur 25 (Svat BL 2B) en de hierboven vermelde drie stalen (Conf BB 2, Jona BB 2 en Svat BB 1) waarop achteraf een extra RNase behandeling is uitgevoerd (Figuur 26).

De 1kb+ ladder en de positieve stalen (λ -DNA) zijn duidelijk waar te nemen, en dus is de gelelektroforese gelukt. De extra RNase-behandelde stalen (laantje 3, 4 en 5) gaven opnieuw geen DNA-bandje. Het RNA wat onderaan aanwezig was op de vorige gel (zie Figuur 25) is nu ook wel verdwenen. De reden dat er nu geen fragment verscheen is waarschijnlijk omdat de DNA-input te laag is (zie Tabel 46) of dat tijdens de extractie toch het DNA verloren geraakt is dus bijvoorbeeld de pellet mee op te zuigen met de pipet. De nieuw geëxtraheerde stalen (laantje 6 tot en met 9) bevatten wel allemaal een mooi DNA-bandje bovenaan. Er is echter ook nog een beetje RNA aanwezig in deze stalen, dit is waar te nemen aan de vlekken die zichtbaar zijn onderaan de gel. Het is dus beter om de RNase langer te laten duren dan origineel in het protocol aangegeven staat dus minimum 60 min.



Figuur 26 Tweede gelelektroforese van DNA geïsoleerd uit niet-geïnfecteerde plantenstalen. De stalen werden geladen in de slotjes van een 0.8% (w/v) TAE gel. De gel werd gedurende 45 minuten bij 80V gelopen. Van elk staal werd 3 μ l geladen.

4.5. DNA-extracties van geïnfecteerde bloemenstalen

Stalen A1, B1 en C1 zijn verschillende controlebomen van 'Jonagold' appel in de serres welke kunstmatig geïnfecteerd werden met *E. amylovora*. De bloemen werden twee dagen na de infectie genomen en één staal bestaat uit ±400 mg weefsel.

4.5.1. Resultaten van de DNA-extractie van geïnfecteerd plantenmateriaal volgens CTAB-DTT (Khayat *et al.*, 2004) protocol

De DNA isolatie volgens het CTAB-DTT protocol van geïnfecteerde bloemenstalen gaf goede resultaten (zie Tabel 48). Met een gemiddelde DNA-concentratie van 66,47 ng/μl en opbrengst van 6,45 μg is dit zeker voldoende. De A_{260}/A_{280} zuiverheid ligt ook voldoende hoog (1,31-1,64). Enkel de A_{260}/A_{230} verhouding ligt redelijk laag wat wijst op een aanwezigheid van organische contaminanten. Omdat de LAMP techniek zo robuust is wordt niet verwacht dat dit problemen zal geven.

Tabel 48 Resultaten van DNA-extractie van geïnfecteerde bloemenstalen volgens het CTAB-DTT (Khayat *et al.*, 2004) protocol

Staal	DNA-conc. (ng/μl)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	Totale opbrengst (μg)
A1	63,24	1,10	1,58	6,13
B1	81,67	1,17	1,31	7,92
C1	54,51	1,28	1,64	5,29

4.5.2. Resultaten van de DNA-extractie van geïnfecteerd plantenmateriaal volgens de Plant Material DNA Extraction Kit

Uit dezelfde stalen (A1, B1 en C1) werd DNA geïsoleerd met behulp van de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene (zie Tabel 49). Ook dit leverende behoorlijke DNA-concentraties (gemiddeld 40 ng/μl) en een gemiddelde opbrengst van 3,88 μg op. Zoals bij de niet-geïnfecteerde plantenstalen geeft de kit ook hier een lagere DNA zuiverheid dan het CTAB-DTT protocol. De A_{260}/A_{230} varieert van 0,37 tot 0,49 terwijl A_{260}/A_{280} een range heeft van 0,68 tot 0,86.

Tabel 49 Resultaten van DNA-extractie van geïnfecteerde bloemenstalen volgens de Plant Material DNA Extraction Kit

Staal	DNA-conc. (ng/μl)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	Totale opbrengst
A1	47,16	0,41	0,73	4,57
B1	30,10	0,49	0,86	2,92
C1	42,75	0,37	0,68	4,15

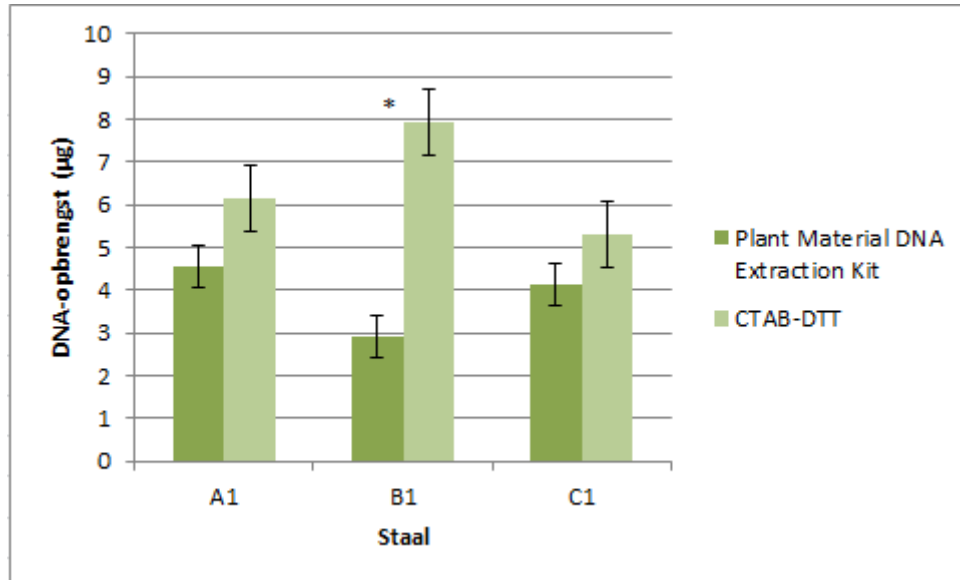
4.5.3. Vergelijking CTAB-DTT protocol (Khayat *et al.*, 2004) en Plant Material DNA Extraction Kit voor geïnfecteerd plantenmateriaal

De Plant Material DNA Extraction Kit geeft ook voor deze geïnfecteerde stalen een lagere DNA-opbrengst dan de CTAB-DTT methode (zie Figuur 27).

Er werd echter een T-toets uitgevoerd voor deze vergelijking en deze stelde dat er geen significant verschil is tussen beide methodes voor staal A1 en C1. Er is echter wel een trend

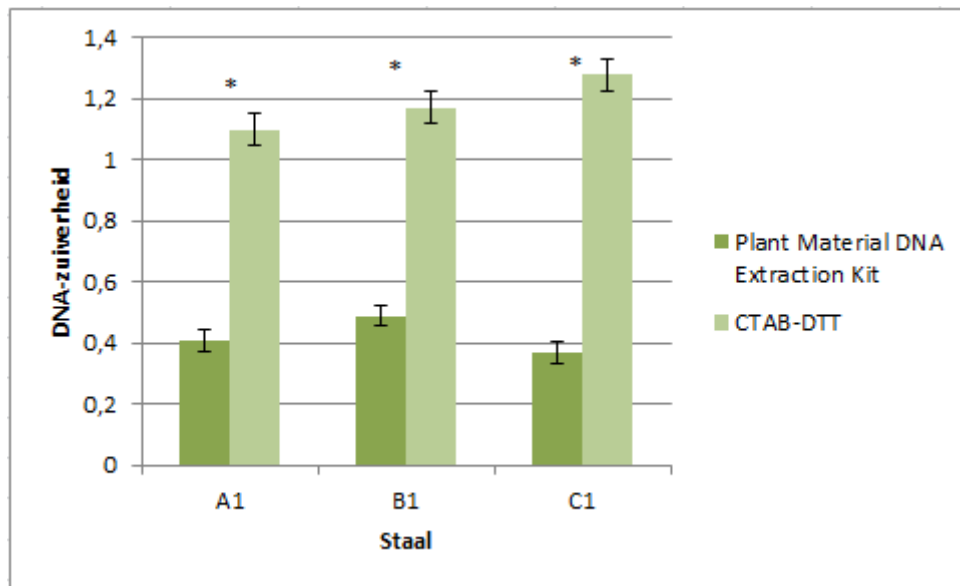
waarneembaar dat de CTAB-DTT methode een hogere opbrengst geeft dan de OptiGene kit. Voor staal B1 is er wel een significant verschil aanwezig.

Er werd verwacht dat er voor geïnfecteerde bloemenstalen een betere DNA opbrengst van hogere kwaliteit verkregen wordt met het CTAB-DTT protocol. Dit omdat het weefsel door de infectie begint de necrotiseren en CTAB-DTT vervolgens de polyfenolen gaat tegengaan en verwijderen. De samenstelling van de lysisbuffer van de kit is niet gekend en hier kan dus niet bepaald worden of deze buffer wel of niet de polyfenol vorming tegengaat.

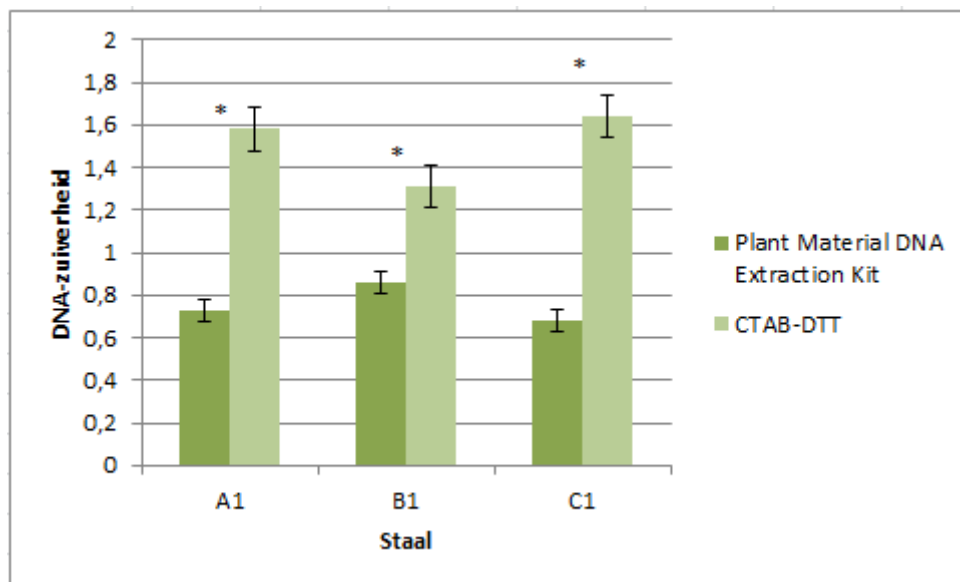


Figuur 27 Vergelijking van de gemiddelde ($n=3$) DNA-opbrengsten van met *E. amylovora* geïnfecteerde bloemenstalen. Er werd voor elk staal een T-toets uitgevoerd. Een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil bestaat tussen beide DNA extractie methodes.

Vervolgens werd ook de zuiverheid van beide methodes vergeleken (zie Figuur 28 en 29). Door het uitvoeren van een T-toets kan besloten worden dat er zowel voor A_{260}/A_{230} als voor A_{260}/A_{280} een significant verschil is tussen beide methodes. De zuiverheid ligt bij het CTAB-DTT protocol hoger dan bij de kit omdat de stalen hier meer stappen ondergaan om alle onzuiverheden te verwijderen.



Figuur 28 Vergelijking van de DNA-zuiverheid wat betreft organische contaminanten (A_{260}/A_{230}) van geïnfecteerde bloemenstalen



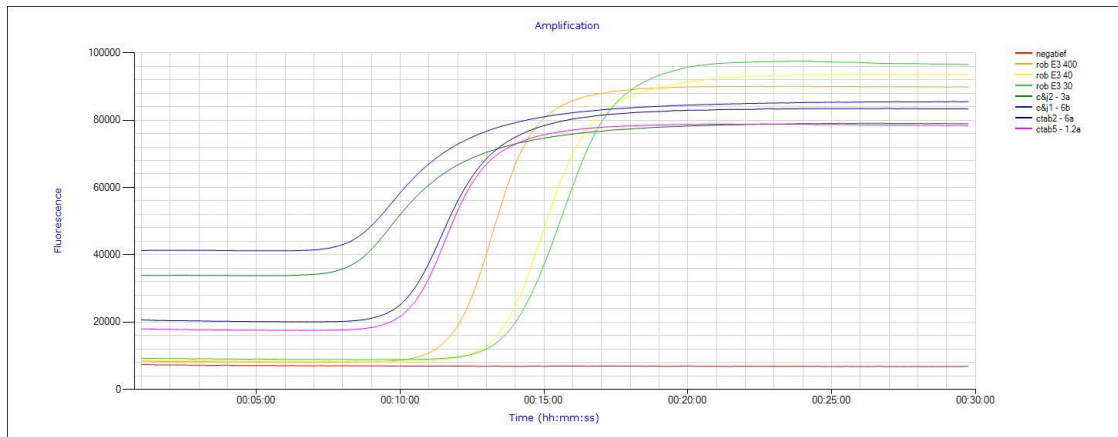
Figuur 29 Vergelijking van de DNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280}) van geïnfecteerde plantenstalen.

4.6. LAMP

4.6.1. Experiment 1: werking toestel

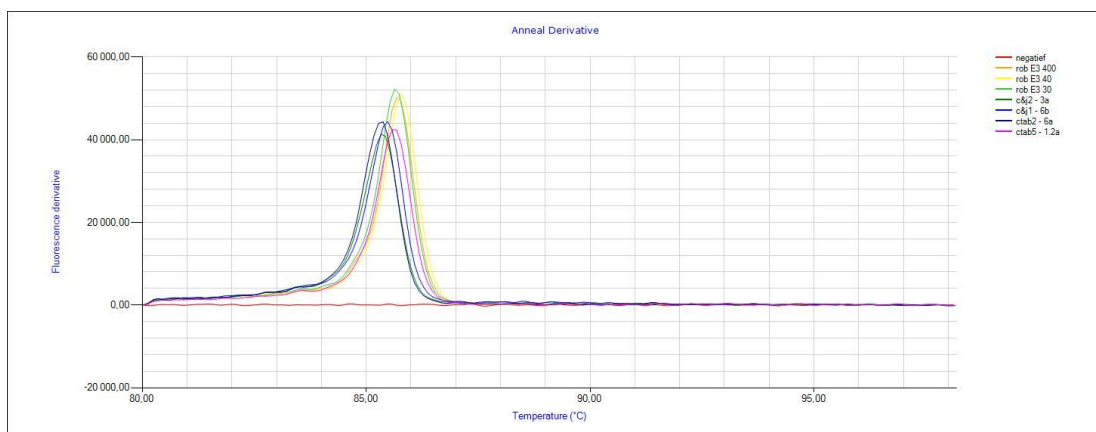
Omdat het de eerste keer was dat LAMP uitgevoerd werd in het kader van deze thesis, werd er in experiment 1 een reactie ingezet met gekende positieve stalen en een negatieve controle. Zowel het DNA dat eerder geëxtraheerd werd uit de bacterie *E. amylovora* (zie paragraaf 4.3.1) als stalen van vorig jaar die al eens een positief resultaat (bacteriestalen van een zuivere *E. amylovora* E3 cultuur) gaven op het LAMP-toestel werden gebruikt als positieve stalen. Als negatief staal werd TE-buffer ingezet. Dit enkel om de werking van het toestel te begrijpen en zo gewoon te worden met de handelingen die nodig zijn om een LAMP-reactie in te zetten (zie paragraaf 3.12.2).

In Figuur 30 wordt het resultaat weergegeven van het eerste LAMP experiment. Er wordt een amplificatieplot verkregen met in de X-as de tijd en in de Y-as de gemeten fluorescentie. Op deze manier kan snel en gemakkelijk de tijd bepaald worden dat een staal begint te amplificeren. De blanco of het negatieve staal bevat alle reactiecomponenten, maar geen staal zelf. Dit negatieve staal (rode lijn) vertoont ook geen amplificatie zoals verwacht. Op de grafiek is te zien dat de eerste positieve stalen een amplificatietijd hebben van ongeveer tien min. Hoe meer DNA er initieel aanwezig is in het staal, hoe sneller de exponentiële amplificatie zichtbaar wordt.



Figuur 30 LAMP amplificatieplot van experiment 1 met positieve bacteriestalen en een negatieve controle (TE-buffer) verkregen met het Genie III toestel door een LAMP reactie volgens Bühlmann et al., 2013 met op de X-as de amplificatietijd en op de Y-as de fluorescentie. De LAMP werd uitgevoerd zoals beschreven in 3.12.2. Stalen Rob E3 400 – E3 40 en E3 30 zijn stalen van vorig jaar. Het betreft een verdunning van *E. amylovora* staal. De C&J stalen slaan op stalen (*E. amylovora*) welke tijdens deze bachelorproef geëxtraheerd werden met behulp van het Cheng & Jiang (2006) protocol.

Naast de amplificatieplot kan ook de smeltcurve opgevraagd worden (zie Figuur 31). Op deze grafiek is waar te nemen dat alle positieve stalen een piek vertonen rond 85°C wat duidt op de vorming van één specifiek amplificatieproduct, namelijk een product van de EAMY_3195 CDS (coding sequence) dat geannoteerd is als een *hisZ* gen. Deze CDS is deel van een chromosomale sequentie die specifiek is voor *E. amylovora* [1].

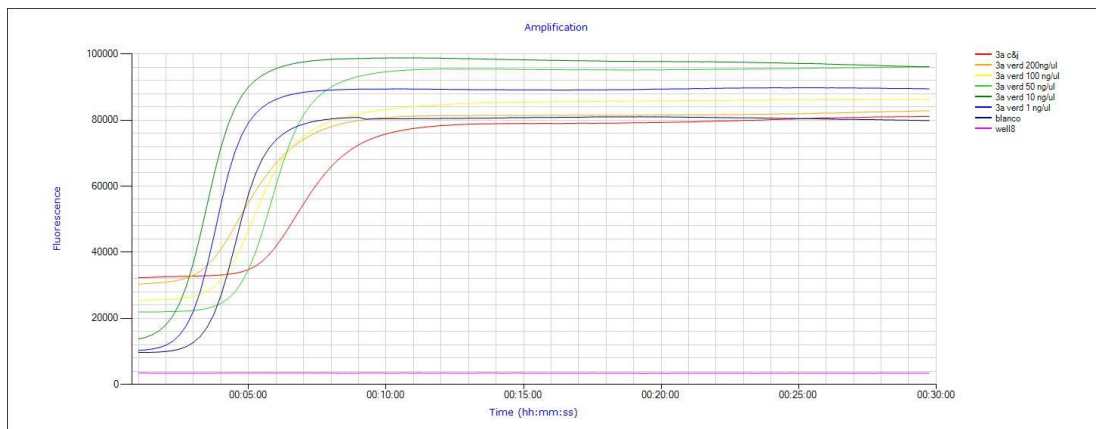


Figuur 31 LAMP smeltcurve experiment 1 met positieve bacteriestalen en een negatieve controle (TE-buffer) verkregen met het Genie III toestel door een LAMP reactie volgens Bühlmann et al., 2013 met op de X-as de temperatuur en op de Y-as de fluorescentie afgeleide. De stalen zijn dezelfde als in Figuur 30.

4.6.2. Experiment 2: oorzaken contaminatie

Een tweede experiment dat uitgevoerd werd op het LAMP-toestel was het bepalen van de detectielimiet. Hiervoor werd een verdunningsreeks aangelegd van bacteriestaal 160202-3A (zie paragraaf 4.3.1., Extractie 2).

Alle verdunningen van het bacterie DNA bleken positief zoals verwacht en de amplificatiecurves zaten in de exponentiële fase binnen de 5 min. De blanco was echter positief (donkerblauwe curve in Figuur 32). Dit wijst op een contaminatie van *E. amylovora* DNA en blijkbaar een grote contaminatie vermits de amplificatiecurve al opkwam vóór 5 min net zoals bij de positieve stalen. Dezelfde stalen werden opnieuw ingezet onder exact dezelfde condities voor een extra bevestiging en opnieuw was de blanco positief. Gezien het gebruik van een nieuwe filtertip voor elk staal dat in de epjes van de strip wordt overgebracht, wordt een crosscontaminatie van een positief *E. amylovora* DNA staal naar het blanco staal uitgesloten. Vanaf dit experiment zijn heel wat testen uitgevoerd om te bepalen waar de contaminatie zich bevond. De mogelijke oorzaken worden nu één voor één overlopen.



Figuur 32 LAMP amplificatieplot met positieve bacteriestalen en vals positieve blanco als resultaat verkregen met het Genie III toestel. Er werd een verdunningsreeks meegenomen van staal 160202-3A alsook een negatieve controle (TE-buffer). Well 8 was leeg.

Strip + test contaminatie

Een eerste fout die ontdekt werd, was het gebruik van dezelfde strip met epjes of microtubes (paragraaf 3.12.1) in het Genie III LAMP-toestel in de bovenstaande test dan de strip die in experiment 1 werd gebruikt. Nochtans waren de epjes uitgewassen met Dettol. Deze strip is echter niet herbruikbaar gezien de gevoeligheid van de LAMP reactie, er moet voor elke test telkens een nieuwe strip gebruikt worden. Verder werd er ook een nieuwe test ingezet met negatieve stalen van vorig jaar, dit wil zeggen stalen die vorig jaar negatief waren voor *E. amylovora* detectie met LAMP.

- Gebruikte stalen:
1. TE-buffer + Isothermal Mastermix (blanco primermix)
 2. TE-buffer + primermix + Isothermal Mastermix (normale blanco)
 3. Negatieve controle: plant DNA BB 'Svatana' Kit (geïsoleerd met Plant Material DNA Extraction kit van OptiGene, zie Tabel 47)
 4. Negatieve controle: staal vorig jaar B0/1

5. Negatieve controle: *E. coli* staal 1A (zie Tabel 45)

6. Positieve controle: *E. amylovora* staal 160202-6A (geïsoleerd volgens Cheng & Jiang (2006), zie Tabel 45)

Alle stalen van deze test gaven een positief resultaat (grafiek niet getoond). Hieruit werd besloten dat de primerwerkoplossingen (20 µM) gecontamineerd waren. Er werd vanuit de primer stockoplossingen van 100 µM opnieuw primerwerkoplossingen van 20 µM aangemaakt met geautoclaveerd water.

Nieuwe primerwerkoplossingen

Met deze nieuwe primerwerkoplossingen werd dezelfde test als hierboven ingezet met dezelfde 6 stalen. Ook bij deze test kwamen alle 6 stalen positief terug. Voor het maken van de 20 µM werkoplossingen wordt de 100 µM stock aangelengd met steriel geautoclaveerd gedestilleerd water. Dit water kon ook een mogelijke bron van besmetting zijn.

Zuiver water

Om te testen of de contaminatie afkomstig was van het gebruikte water, werden er nu twee types zeer zuiver water getest om de 20 µM primer werkoplossingen aan te maken (I) Nuclease-Free Water van Qiagen en (II) Mol Bio grade DNase-, RNase-, and Protease-Free Water van 5PRIME GmbH.

Er werden nieuwe primermixen gemaakt met deze twee verschillende soorten water en vergeleken met een ongeopende microtube gedestilleerd water van vorig jaar. Dus de volgende primermixen werden getest:

- Nieuwe, ongeopende microtube van vorig jaar (PM1)
- Nuclease-Free water van Qiagen (PM2)
- DNase-, RNase-, and Protease-Free water van 5PRIME (PM3)

Verder werd nu ook de isothermal mastermix alsook de primermix in de epjes van de LAMP-strip toegevoegd in een ander lokaal dan waar de DNA-isolaties uitgevoerd worden.

Volgende stalen werden getest in de *E. amylovora* LAMP:

1. TE-buffer + Isothermal Mastermix
2. Gewone blanco (TE-buffer + PM1 + Isothermal Mastermix)
3. Gewone blanco (TE-buffer + PM2 + Isothermal Mastermix)
4. Gewone blanco (TE-buffer + PM3 + Isothermal Mastermix)
5. Negatieve controle: plant DNA BB Svat Kit (paragraaf 4.4.2, Tabel 47) PM1
6. Negatieve controle: plant DNA BB Svat Kit (paragraaf 4.4.2, Tabel 47) PM2

7. Negatieve controle: plant DNA BB Svat Kit (paragraaf 4.4.2, Tabel 47) PM3

8. Negatieve controle: staal vorig jaar niet-geïnficeerd BO/1 PM1

Het resultaat was opnieuw voor elk van deze negatieve stalen positief, behalve voor staal 1 zonder de primers. Dit laatste was ook verwacht, zonder primers kan er immers geen amplificatie plaatsvinden. Met dit resultaat werd uitgesloten dat de contaminatie afkomstig was van het gebruikte water om de primer 20 μM werkoplossingen te maken want de kans is zeer klein dat de drie geteste typen water alle drie besmet zouden zijn met *E. amylovora* DNA. De volgende logische hypothese was dan dat de 100 μM stocks van de primers gecontamineerd waren en dus werden er nieuwe primers besteld.

Nieuwe stock primers 1

Vier van de zes primers komen aan in opgeloste toestand, twee primers (FIP en BIP) komen aan in gedroogde toestand en moeten nog opgelost worden tot een 100 μM master stockoplossing. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een nieuwe, ongeopende doos filtertips, er werden handschoenen gedragen en er werd ultra zuiver Nuclease free water gebruikt van Qiagen (zie vorige blz.) wat nog eens extra filter gesteriliseerd werd. Hierna werden nieuwe 20 μM werkstocks aangemaakt met hetzelfde ultra zuivere Nuclease free Qiagen water en deze werden vervolgens gebruikt om een nieuwe LAMP-reactie in te zetten met enkel negatieve stalen (een *E. coli* staal 1A, B0/1 en BB Svat Kit). Ook hier werd opnieuw hetzelfde resultaat verkregen: alle stalen waren positief (exponentiële amplificatiefase na ongeveer 9 min), behalve weeral het staal waar geen primermix aan toegevoegd werd.

Strips autoclaveren + nieuwe pipetten

De OptiGene strips van epjes werden geautoclaveerd om zeker te zijn dat de contaminatie niet afkomstig was van de strips zelf. Ook werden er andere micropipetten gebruikt welke nog niet in aanraking gekomen zijn met *E. amylovora*. Verder werd er nog een nieuwe microtube Isothermal Mastermix gebruikt welke nog niet geopend was. Om zeker te zijn dat de contaminatie niet aan de TE-buffer lag, werd er nu H_2O (eigen geautoclaveerd en gedestilleerd water) gebruikt voor de blanco in plaats van TE-buffer. Opnieuw werd er een test ingezet met enkel negatieve stalen, welke opnieuw allemaal een positief resultaat gaven (exponentiële amplificatiefase reeds na een tiental min). Hieruit kon geconcludeerd worden dat de contaminatie niet aan de TE-buffer of de Isothermal Mastermix te wijten was.

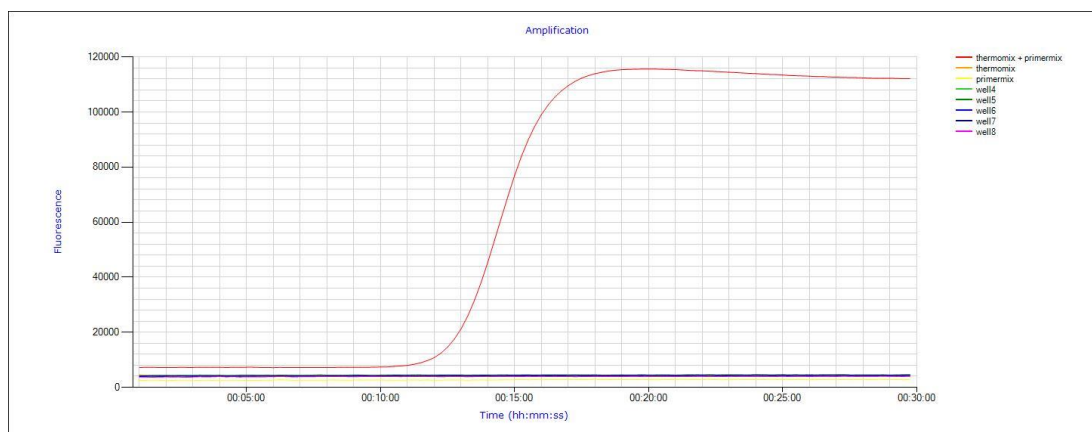
Een nieuwe test met de geautoclaveerde strips werd uitgevoerd in het gewone labo, en niet in het quarantaine labo. Er werden nu verschillende soorten water getest (geautoclaveerd en gedestilleerd water van de stagebegeleider, gedestilleerd water van student van vorig jaar, Qiagen ultra zuiver water) en PBS-buffer. Er werd dus 5 μl van elk type water toegevoegd aan het mengsel van een nieuwe primermix en Isothermal Mastermix (zelfde tube als vorig experiment) in de epjes. Ook dit resultaat kwam positief terug waaruit besloten kon worden dat de contaminatie ook niet afkomstig is van de strips zelf. Het is immers zeer onwaarschijnlijk dat alle verschillende soorten water en buffers gecontamineerd zijn met *E. amylovora* DNA.

In een volgend experiment worden de strips met epjes en micropipetten eerst behandeld onder UV-licht (in de laminaire airflowkast zonder de airflow aan te zetten) voor ongeveer 30 min.

Hierdoor wordt al het DNA wat eventueel aanwezig is afgebroken. Ook werd in de UV-behandelde zone vervolgens de primermix (aangemaakt in quarantaine labo) en de Isothermal Mastermix (nieuwe, ongeopende microtube) in de epjes gedaan, zo kan er met zekerheid gezegd worden dat de omgeving vrij is van DNA en dus ook mogelijk *E. amylovora* DNA. Opnieuw werd hiermee een LAMP-test ingezet. Vanaf nu worden er geen negatieve bacterie of plant DNA stalen meer meegenomen, de test bestaat telkens uit volgende 3 blanco's of negatieve stalen waarop LAMP wordt getest:

1. Isothermal Mastermix (nieuwe microtube) + verse primermix
2. Isothermal Mastermix (nieuwe microtube)
3. Primermix (vers)

Er werd dus zelfs geen TE-buffer of water meer toegevoegd aan deze negatieve stalen. Vanaf het moment dat de Isothermal Mastermix samen kwam met de primermix, werd er duidelijk amplificatie waargenomen waarbij de exponentiële amplificatie begon na een 12-tal min (Figuur 33).



Figuur 33 LAMP amplificatieplot verkregen met het Genie III LAMP toestel. In well 1 bevindt zich enkel primermix en Isothermal Mastermix, in well 2 enkel Isothermal Mastermix en in well 3 enkel de primermix. De rest van de wells zijn leeg. De amplificatie (Isothermal Mastermix + primermix) begint na een 12-tal min.

Dus (1) was positief, (2) en (3) waren negatief (Figuur 33). Voor negatief staal 2 is dit verwacht want zonder primermix kan er immers geen amplificatie gebeuren. Maar ook zonder Isothermal Mastermix kan er geen amplificatie gebeuren omdat daar al de nodige componenten inzitten zoals het DNA polymerase en de dNTPs. De enige mogelijkheid van contaminatie is nu de primermix of de omgeving (besmetting in het labo met *E. amylovora* en/of *E. amylovora* DNA).

qPCR

Om een fout van het LAMP-toestel te kunnen uitsluiten, werd het LAMP-protocol ook uitgevoerd op het qPCR-toestel (zie paragraaf 3.12.2.). De 96-well-plaat werd voor 30 min behandeld onder UV licht, hier werd vervolgens ook de microtube Isothermal Mastermix geopend en de 96-well-plaat gevuld. De primermix werd vers aangemaakt in het Q-labo. De amplificatieplot dat verkregen werd (niet getoond, amplificatieplot was analoog met Figuur 34), toont ook een duidelijk positief resultaat boven de 0,2 grenswaarde van amplificatie boven de achtergrond voor het mengsel van de Isothermal Mastermix met de primermix. Hieruit wordt besloten dat de fout niet aan het Genie III toestel lag.

Hierna werd van de nieuwe 100 μM primers nieuwe werkoplossingen van 20 μM gemaakt (met ultra zuiver Nuclease free water van Qiagen) in de laminaire airflowkast behandelde met UV licht gedurende 30 min. Opnieuw werd een LAMP-reactie ingezet (LAMP Genie III toestel) met dezelfde negatieve stalen als gebruikt in de qPCR. Ook hier worden voorzorgsmaatregelen getroffen, de strip met epjes werd gevuld in de UV behandelde ruimte. Het resultaat met het Genie III LAMP toestel was opnieuw positief voor het mengsel Isothermal Mastermix + primermix.

Ontsmetting met javel

Pipetten, werkbank en het LAMP-toestel werden vervolgens ontsmet met een 10x verdunde javeloplossing (1,2% v/v NaOCl finale concentratie) om alle eventueel aanwezige bacteriën af te doden en DNA af te breken. Ook werd een primermix gebruikt die zich nog in de diepvries bevond van vorig jaar, waarmee toen wél de blanco negatief bleef. De Isothermal Mastermix die gebruikt werd is de microtube die enkel in de UV behandelde zone is geopend. Na het inzetten van een nieuwe LAMP-test (strip met epjes vullen onder UV behandelde zone) was het mengsel Isothermal Mastermix + primermix weer positief terwijl de Isothermal Mastermix alleen en de primermix alleen weer negatief waren. Gezien de primermix vorig jaar nog in orde was moet er tijdens het opzetten van de LAMP reactie ergens een *E. amylovora* DNA besmetting zijn opgetreden. Hierna werd besloten opnieuw een nieuwe primerset te bestellen.

Nieuwe stock primers 2

De nieuwe primers werden niet in het quarantaine labo gebracht maar opgeslagen in het groot labo van pcfruit. Om er zeker van te zijn dat deze niet opnieuw gecontamineerd werden met *E. amylovora*, werden de epjes met deze primers meegenomen naar de UHasselt om daar de 100 μM stockoplossingen van FIP en BIP aan te maken evenals de 20 μM werkoplossingen van al de primers. Ook werd milliQ water gebruikt van de UHasselt, wat nog eens extra filter gesteriliseerd werd, zodat zeker niets van het quarantaine labo in contact kwam met de primers.

Niet enkel de primerwerkoplossingen werden aangemaakt in de UHasselt, maar ook het LAMP Genie III toestel van pcfruit werd met een verdunde javeloplossing afgeveegd en meegenomen naar het UHasselt labo om daar de LAMP-reactie in te zetten en uit te voeren. Ook werd er weer een nieuwe, ongeopende microtube Isothermal Mastermix meegenomen naar het UHasselt labo.

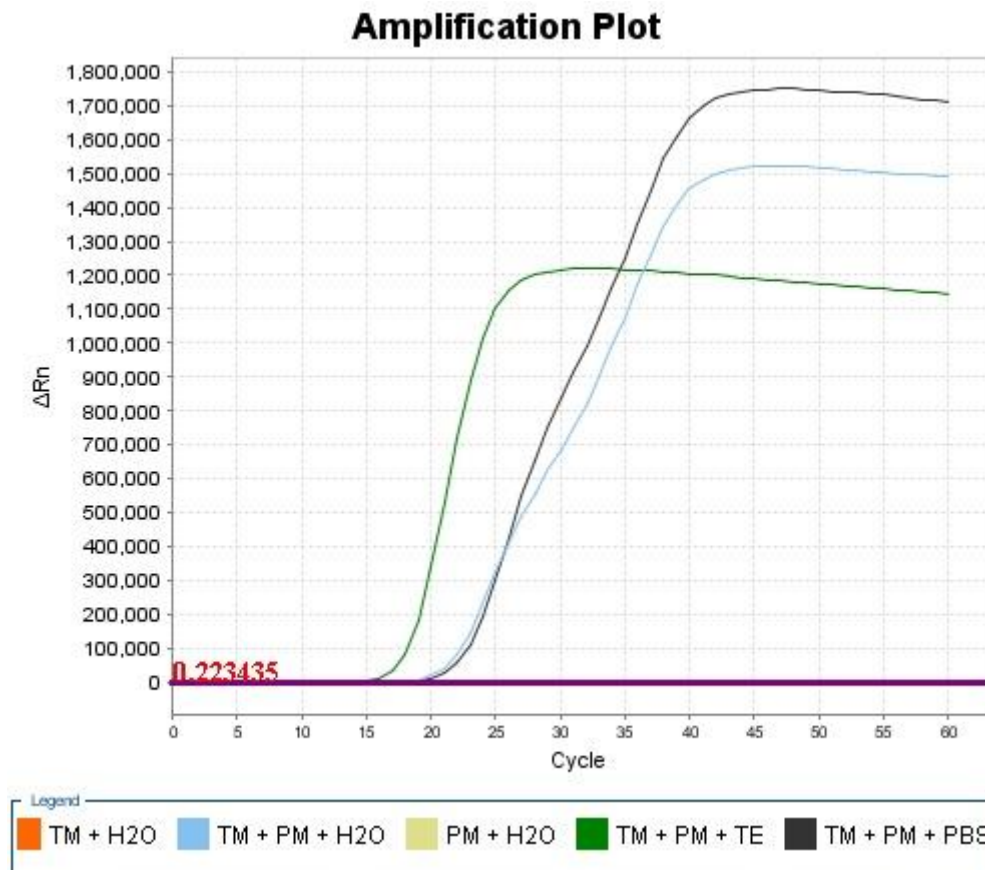
Opnieuw werd er een LAMP-test ingezet welke een positief resultaat gaf voor het mengsel Isothermal Mastermix + primermix. Voor dit staal is *E. amylovora* DNA of *E. amylovora* contaminatie eigenlijk zo goed als uitgesloten. Hierna werd er even nagedacht over primer dimeren en of deze de oorzaak zouden kunnen zijn van de vals positieve resultaten. Ook dit werd al snel uitgesloten omdat de smeltcurve dan een andere piek zou moeten geven dan 84°C, dit was niet het geval. De Isothermal Mastermix alleen en de primermix alleen waren zoals steeds weer negatief.

qPCR 2

Voor een extra confirmatie werd er opnieuw LAMP uitgevoerd op het qPCR-toestel. Weer werd de 96-well-plaat eerst behandeld met UV licht in de laminaire airflowkast. De componenten (Isothermal Mastermix en primermix en stalen) werden ook hier toegevoegd aan de 96-well-plaat. Bij deze qPCR werden de volgende stalen getest:

1. Isothermal Mastermix + primermix UHasselt + H₂O Qiagen
2. Isothermal Mastermix + H₂O Qiagen
3. Primermix UHasselt + H₂O Qiagen
4. Isothermal Mastermix + primermix UHasselt + PBS-buffer
5. Isothermal Mastermix + primermix UHasselt + TE-buffer

Het resultaat was weer positief zodra de Isothermal Mastermix en de primermix samen kwamen ongeacht of er extra water, TE of PBS werd bijgevoegd (Figuur 34). De amplificatie grenswaarde werd overschreden bij een Ct = 15-20 wat op een specifieke amplificatie duidt en dit wordt bevestigd door de smeltcurve (data niet getoond).

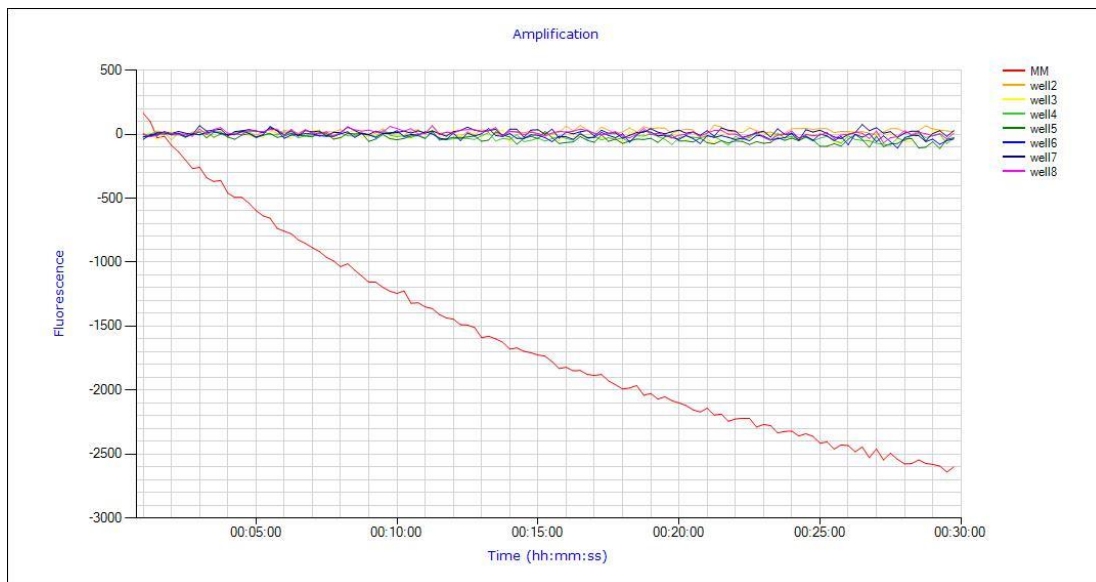


Figuur 34 Amplificatieplot verkregen na uitvoeringen van de tweede qPCR met de stalen welke in de legende onder de figuur aangegeven zijn. In de X-as staat het aantal cycli aangegeven en in de Y-as wordt de relatieve fluorescentie weergegeven. Het resultaat was positief wanneer de Isothermal Mastermix en de primermix samen gevoegd werden. Opnieuw was het staal zonder primers (TM + H₂O) en het staal zonder de Isothermal Mastermix (PM + H₂O) negatief.

Plant Health Specific Mastermix

Uiteindelijk werd er besloten door pcfruit om een volledig klaargemaakte (ready-to-go) mastermix te bestellen bij OptiGene (PK-E-Amylovora-25W) speciaal ontwikkeld voor de detectie van *E. amylovora*. Hierin zitten alle componenten nodig voor amplificatie van de bacterie, ook de primers. De primers moesten dus niet meer zelf verdund worden. Ook werd heel het quarantaine labo bij pcfruit ondertussen zeer grondig geпоetst met een 10x verdunde javeloplossing (1,2% v/v NaOCl) om de eventuele contaminaties te verwijderen.

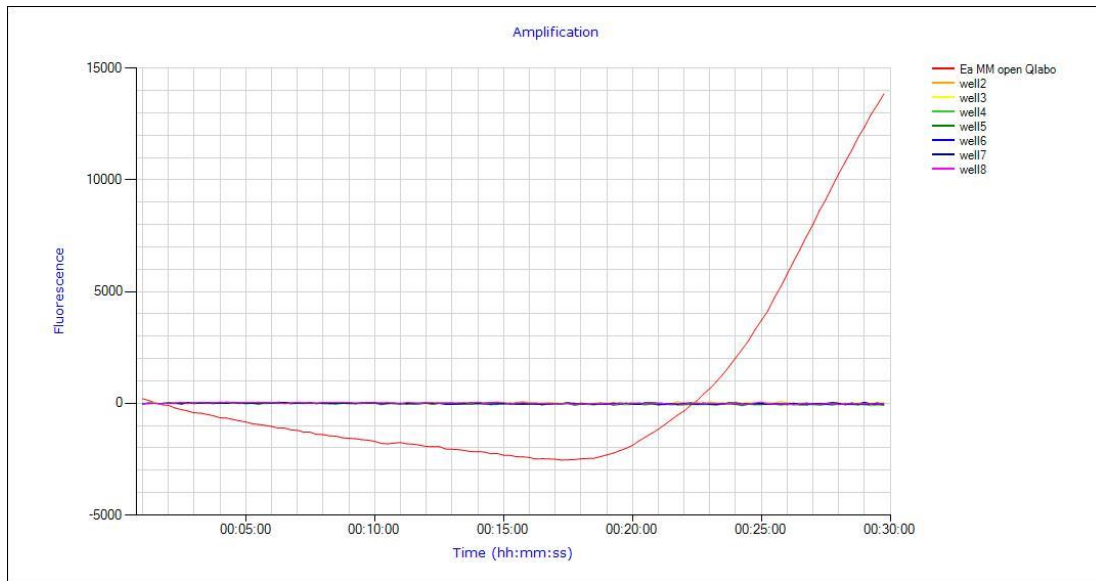
Met deze ready-to-go mastermix werd een LAMP-reactie ingezet in het grote, niet-quarantaine labo (enkel 20 μ l van de ready-to-go mastermix werd in het epje overgebracht met een filtertip, er werd geen template toegevoerd). Het stripje met epjes en de micropipetten werden wel eerst met UV licht behandeld in de laminaire flowkast in het quarantaine labo. De ready-to-go mastermix werd bewaard in de diepvriezer in het hetzelfde niet-quarantaine labo, en bovendien werd het LAMP-toestel na de kuis verplaatst naar dit niet-quarantaine labo. Dit gaf uiteindelijk wél een negatief resultaat (Figuur 35). Hieruit kan besloten worden dat er wel degelijk een *E. amylovora* en/of *E. amylovora* DNA contaminatie in het quarantaine labo aanwezig was.



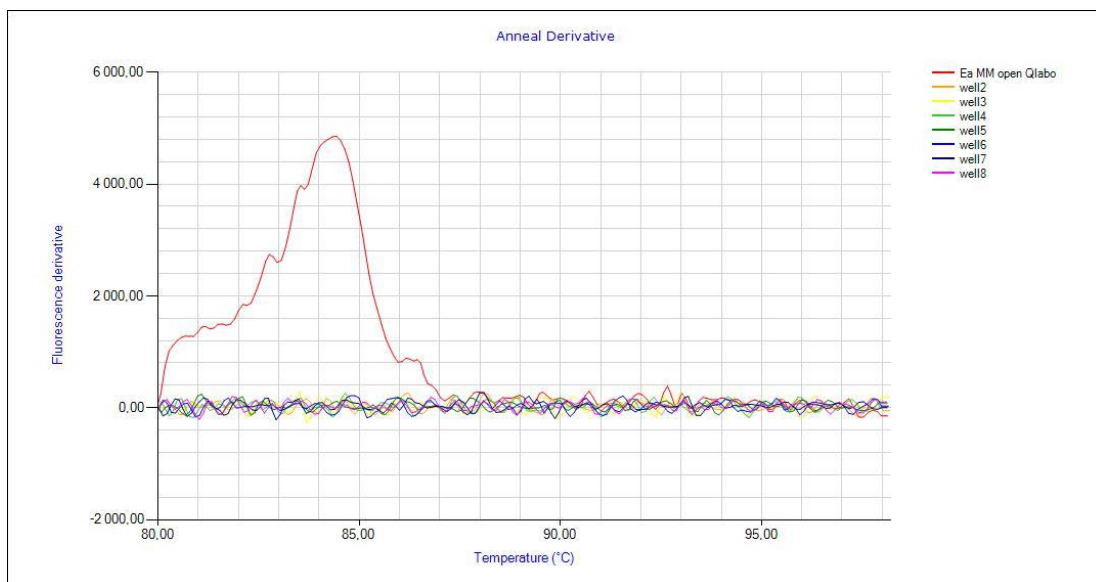
Figuur 35 LAMP amplificatieplot verkregen na uitvoering van LAMP op Genie III toestel met in de X-as de amplificatietijd en in de Y-as de fluorescentie. In well 1 bevindt zich enkel 20 μ l van de ready-to-go mastermix, zonder toevoeging van een template. De rest van de wells zijn leeg. Er wordt geen amplificatie verkregen, wat een correct resultaat is.

Om te bepalen of de contaminatie volledig verdwenen is na de grote kuis in het quarantaine labo werd opnieuw dezelfde test uitgevoerd. Enkel werd na toevoeging van de ready-to-go mastermix in het niet-quarantaine labo het UV-behandelde stripje met epjes terug naar het quarantaine labo gebracht waar het één min open gezet werd en dan gesloten alvorens de LAMP reactie in het niet-quarantaine labo op te starten.

Het toestel gaf aan dat het resultaat negatief was maar toch was er op de grafiek een curve te zien die omhoog ging na ongeveer 23 min (Figuur 36). Ook op de smeltcurve was een piek te zien bij ongeveer 84°C (specifiek voor het *E. amylovora* *hisZ* amplificatieproduct; Figuur 37). Hieruit blijkt dat er toch nog een (te) kleine contaminatie aanwezig is in het quarantaine labo, maar het toestel geeft het toch aan als een negatief resultaat.

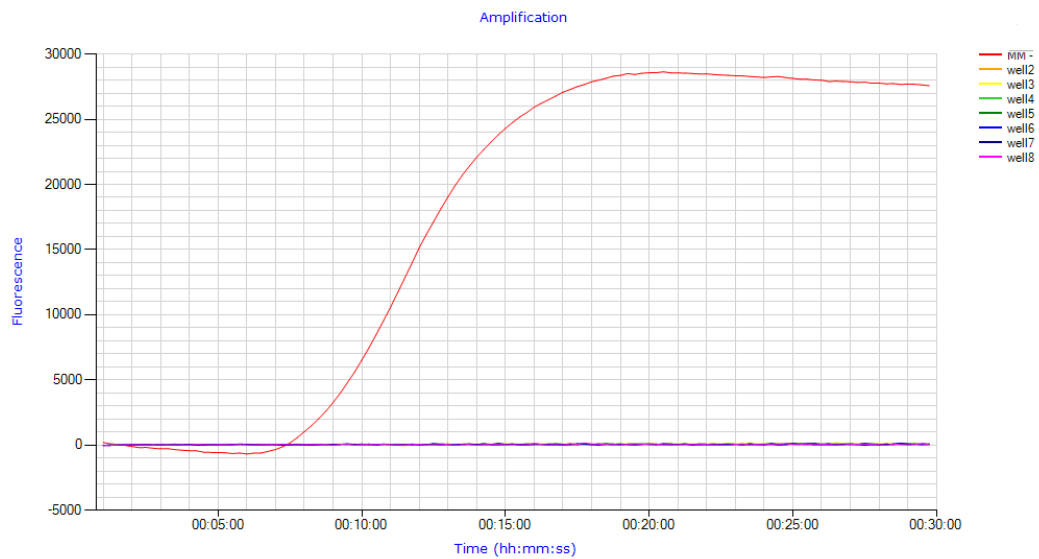


Figuur 36 Amplificatieplot verkregen na uitvoering van LAMP op het Genie III toestel met in de X-as de amplificatietijd en in de Y-as de fluorescentie. Het staal bevindt zich in well 1, de ready-to-go mastermix werd één min opengezet in het quarantaine labo en vervolgens weer gesloten. De rest van de wells zijn leeg.



Figuur 37 Smeltcurve verkregen na uitvoering LAMP met het Genie III toestel met in de X-as de temperatuur en in de Y-as de fluorescentie afgeleide. Er wordt een piek verkregen bij ongeveer 84°C. Het staal bevindt zich in well 1 en is enkel de ready-to-go mastermix zonder template. Het stripje met epjes werd na toevoeging van deze mastermix één min opengezet in het quarantaine labo en vervolgens weer gesloten.

Hierna werd opnieuw de eerste test met de ready-to-go mastermix die een negatief resultaat gaf voor deze mastermix herhaald (Figuur 35). De ready-to-go mastermix werd gewoon toegevoegd in het epje (nieuwe strip met epjes en micropipetten werden eerst behandeld met UV licht) in het gewone niet-quarantaine labo en direct ingezet (geen template, niet in contact met quarantaine labo). Het resultaat was positief met een duidelijk amplificatiecurve die al omhoog kwam na ongeveer acht min (Figuur 38). Tenzij ook het groot labo met *E. amylovora* DNA en/of *E. amylovora* besmet is, wat uiteraard niet zou mogen, is hier momenteel geen verklaring voor.



Figuur 38 Amplificatiecurve verkregen met het LAMP Genie III toestel met in de X-as de amplificatietijd en in de Y-as de fluorescentie. In well 1 bevindt zich enkel de ready-to-go mastermix, de rest van de wells zijn leeg. De amplificatiecurve start reeds al na ongeveer 10 min.

5. Conclusie

Erwinia amylovora is de veroorzaker van de vernietigende plantenziekte bacterievuur. Door zijn enorme snelle verspreiding kan dit grote verliezen betekenen voor de fruitteelt. Daarom is het uiterst belangrijk dat deze ziekte snel gedetecteerd kan worden. Hiervoor wil men bij Proefcentrum Fruitteelt vzw beroep doen op de LAMP-techniek welke momenteel nog in de testfase zit. In combinatie met snelle DNA-isolatie protocollen kan dit zorgen voor een zeer snelle diagnose.

In deze scriptie werden dan ook, zowel voor zuivere bacteriestalen als voor plantenstalen, telkens twee DNA-isolatie methodes vergeleken om zo de beste te bepalen. Voor de bacteriestalen gaf het protocol gebaseerd op CTAB-DTT dat oorspronkelijk voor DNA isolatie uit bladweefsel is ontworpen een hogere DNA-opbrengst en ook een betere DNA-zuiverheid. Vermits dit zelfde CTAB-DTT protocol ook succesvol gebruikt wordt voor DNA extractie uit de appel en peer plantstalen (zie hieronder), kan deze extractie methode later gebruikt worden voor *E. amylovora* DNA extractie uit geïnfecteerde appel en peer plantenstalen. Het tweede geteste bacterie DNA isolatie protocol volgens Cheng & Jiang (2006) wat ongeveer 2 uur sneller is, geeft nog steeds een voldoende DNA-opbrengst en zuiverheid om LAMP mee uit te voeren.

Hetzelfde gold voor de plantenstalen. Ook hier gaf het langere CTAB-DTT protocol (Khayat *et al.*, 2004) een hogere opbrengst en zuiverheid dan de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene. Maar net doordat de LAMP-techniek zo robuust en gevoelig is, kan er mogelijk met deze stalen gewerkt worden. Uiteraard is het doel om snellere, minder arbeidsintensieve DNA-isolatie protocollen te gebruiken in de praktijk voor het uitvoeren van de LAMP. Dit zorgt voor snellere en goedkopere diagnoses wat uiteindelijk het hoofddoel is van de ontwikkeling van LAMP.

Na het vinden van de ideale DNA-isolatie protocollen werd tijdens de bachelorstage ook LAMP zelf uitgevoerd. Hier hebben zich heel wat problemen voorgedaan. Er werden, op de eerste run na, altijd vals positieve resultaten verkregen. Na heel wat testen gedaan te hebben inclusief het volledig wassen van het quarantaine laboratorium met javel en het testen van een ready-to-go mastermix, werd er samen met de stagebegeleider besloten om te stoppen met het zoeken naar de bron van de contaminatie omdat de bachelorstage op zijn einde gelopen was. Er werd dus tot op heden geen verklaring gevonden voor de vals positieve resultaten. Naast een contaminatie in het quarantaine labo wordt er gedacht dat er ook een contaminatie in het gewone grote labo aanwezig kan zijn. Een eventuele oplossing kan zijn dat ook dit labo helemaal gekuist wordt met javel.

LAMP heeft de mogelijkheid een goed, snel alternatief te worden voor qPCR aangezien in combinatie met de snellere DNA-isolatie protocollen, resultaten al verkregen kunnen worden in ongeveer twee uur.

Bibliografie

- [1] A. Bühlmann, „Erwinia amylovora loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight,” *Journal of Microbiological Methods*, nr. 92, pp. 1-8, 2013.
- [2] Cabi, „Erwinia amylovora (fireblight),” 15 februari 2008. [Online]. Available: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/21908>. [Geopend 16 februari 2016].
- [3] A. Palacio-Bielsa, „Erwinia spp. from pome fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species,” Springer-Verlag, 2012.
- [4] T. van der Zwet, N. Orolaza-Halbrendt en W. Zeller, Fire Blight history, biology and management, vol. 6 Growth and Physiology of Erwinia amylovora, St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2012, pp. 83-108.
- [5] T. D. Charles de Schaetzen, „bacterievuur,” [Online]. Available: http://www.pcfruit.be/nl/system/files/attachments/ftn_bacterievuur.pdf. [Geopend 5 februari 2016].
- [6] FAVV, „Bacterievuur,” december 2008. [Online]. Available: http://www.afsca.be/thematischepublicaties/_documents/2008-12_bacterievuur_nl.pdf. [Geopend 5 februari 2016].
- [7] C. O. S. University, „Fire blight of apple and pear,” APS, 2005. [Online]. Available: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx>. [Geopend 16 februari 2016].
- [8] T. van der Zwet, N. Orolaza-Halbrendt en W. Zeller, Fire Blight history, biology and management, vol. 10 The Disease Cycle of Fire Blight, St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2012, pp. 155-182.
- [9] pcfruit, „Bacterievuur,” pcfruit, [Online]. Available: <http://www.pcfruit.be/nl/ziekten-en-plagen/bacterievuur>. [Geopend 5 februari 2016].
- [10] H. Schoofs, T. Deckers, W. Verjans en D. Bylemans, „Fire blight control strategy in Belgium,” *Acta Hort*, nr. 1056, pp. 57-64.
- [11] B. Staatsblad, „Besluit van de Vlaamse regering betreffende de milieuvergunning, en van het besluit van de Vlaamse regering houdende algemene en sectorale bepalingen inzake milieuhygiëne,” Belgisch Staatsblad, Brussel, 2004.
- [12] Microbiologie, „Werking selectieve voedingsbodems,” [Online]. Available: <http://www.microbiologie.info/Werking%20selectieve%20voedingsbodems.html>. [Geopend 17 februari 2016].
- [13] B. Kiewnick, „A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of Erwinia amylovora and on-site fire blight diagnosis,” *Journal of Microbiological methods*, pp. 1-9, 2011.

- [14] J. Versalovic en J. R. Lupski, „Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers,” *Trends in Microbiology*, vol. 10, nr. 10, 2002.
- [15] M. Laboratory, „Modes of energy transfer between fluorophores and quenchers,” 2016. [Online]. Available: http://www.molecular-beacons.org/toto/Marras_energy_transfer.html. [Geopend 1 maart 2016].
- [16] S. Eeckelaerts, *Real-time PCR*, Diepenbeek: PXL, 2015.
- [17] J. A. Tomlinson, „Rapid detection of phytophthora ramorum and P. kernoviae by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device,” UK, 2010.
- [18] T. N. Tempe en K. B. Johnson, „Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Erwinia amylovora on pear and apple fruit flowers,” Oregon State University, Corvallis, Oregon, 2011.
- [19] N. Varij, *LAMP (loop Mediated Isothermal Amplification)*, 2013.
- [20] E. C. Co, „The principle of LAMP method,” 2005. [Online]. Available: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>. [Geopend 3 maart 2016].
- [21] N. J. Hai-Rong Cheng, „Extremely rapid DNA extraction from bacteria and yeasts,” *Biotechnologie Letters*, nr. 28, pp. 55-59, 2006.
- [22] E. Khayat, A. Duydevani, E. Lahav en B. Ballesteros, „Somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency, and application as a tool for clonal selection,” Science Publishers Inc, Plymouth, UK, 2004.
- [23] W. Lab, „Test protocol 1: modified from the CTAB-DTT based banana leaf DNA isolation protocol and the CTAB based Micromonas (algae species) DNA isolation protocol,” Worden Lab, 2009.
- [24] OptiGene, Plant Material Lysis Kit, UK: OptiGene Ltd..
- [25] R. Das, Ontwikkeling van een op LAMP-gebaseerde detectietechniek voor bacterievuur, Diepenbeek, Limburg: PXL, 2015.
- [26] FAVV, „Bericht aan de producten van waardplanten van bacterievuur,” FAVV, 2010.
- [27] B. Staatsblad, „Koninklijk Besluit betreffende de maatregelen om het binnenbrengen en het verspreiden van bacterievuur (*Erwinia amylovora*) te voorkomen,” Belgisch Staatsblad, Brussel, 2008.
- [28] B. B. SERVER, „Besluit van de Vlaamse regering houdende algemene en sectorale bepalingen inzake milieuhygiëne,” Belgisch Staatsblad, 31 juli 1995. [Online]. Available: http://www.biosafety.be/CU/Archives/ArrVG95_NL/MenuVL.html. [Geopend 22 februari 2016].
- [29] d. J. R. Mekkes, „IMMUNOFLUORESCENTIE MICROSCOPIE (IF),” huidziekten.nl, 10 augustus 2015. [Online]. Available:

<http://www.huidziekten.nl/zakboek/dermatosen/itxt/Immunofluorescentie.htm>.
[Geopend 22 februari 2016].

- [30] NCBI, „Polymerase Chain Reaction (PCR),” NCBI, 26 september 2014. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>. [Geopend 25 februari 2016].
- [31] C. Y. M. J. Cheng S., „Template integrity is essential for PCR amplification 20-30 kb sequences from genomic DNA,” *PCR methods*, nr. 4, pp. 294-298, 1995.
- [32] EPPO, „Data Sheets on Quarantine Pests: *Erwinia amylovora*,” CABI, 1992.
- [33] O. S. University, „Molecular detection of pathogens,” [Online]. Available: <http://bpp.oregonstate.edu/files/bpp/webfm/pdf/bot552/Molcular%20pathogen%20detection.pdf>. [Geopend 3 maart 2016].

Figurenlijst

Figuur 1 Elektronen microscoop opname van een Erwinia bacteriecel met duidelijk waarneembare flagella. Lijn komt overeen met 1 μm . [7]	9
Figuur 2 Vorming van slijmdruppels (links en rechtsonder) en slijmraden (rechtsboven) door Erwinia amylovora in het begin van de lente [5].	9
Figuur 3 Ziektecyclus van Erwinia amylovora [7].	10
Figuur 4 Ooze droplets gevormd door E. amylovora	11
Figuur 5 Voorbeeld van kolonievorming na uitplating (streepenting).....	13
Figuur 6 Amplificatieplot verkregen met qPCR. Door middel van fluorescentie wordt na elke cyclus de hoeveelheid DNA gemeten. Door middel van ijklijnen kan de originele hoeveelheid in een staal bepaald worden.....	16
Figuur 7 De verschillende stappen van de LAMP-methode [33].....	17
Figuur 8 LAMP stap 1: FIP-primer bindt; ds DNA wordt ss DNA.	18
Figuur 9 LAMP stap 2: synthese complementaire DNA streng.	18
Figuur 10 LAMP stap 3-5: 3. F3-primer bindt; 4. nieuwe complementaire streng wordt gevormd (ds DNA); 5. streng met FIP komt vrij als enkelstreng.....	18
Figuur 11 LAMP stap 6-7: 6. Binding van de BIP en B3-primers; 7. Dubbelstrengs DNA wordt gevormd.	19
Figuur 12 LAMP stap 8: vorming van de loops aan beide uiteindes. Complementaire regio's (F1c en F1 / B1c en B1) gaan binden ter vorming van lussen.....	19
Figuur 13 De amplificatiecyclus van LAMP.....	20
Figuur 14 Flowschema bachelorproef. Tussen haakjes is het desbetreffende paragraaf nummer aangegeven waar de gebruikte materialen en methoden kunnen worden geraadpleegd.	21
Figuur 15 Overnacht groei op 28°C van 100 μl uitplating van E. amylovora op LPGA voedingsmedium.....	50
Figuur 16 Overnacht groei op 28°C van een streepenting van E. amylovora op LPGA voedingsmedium.....	51
Figuur 17 Standaardcurve verkregen door een verdunningsreeks aan te leggen van Lamda-DNA met een gekende concentratie van 482 ng/ μl . Dit werd gemeten met de spectrofotometer Multiskan GO.....	52
Figuur 18 Vergelijking gemiddelde (n=3) DNA-opbrengsten verkregen uit Erwinia amylovora stalen met het Cheng & Jiang 2006 protocol en het CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004). Voor elk staal werd DNA geïsoleerd uit 3 substalen met het Cheng & Jiang 2006 protocol en 3 substalen met het CTAB-DTT protocol. Elk substaal bestond uit 1 ml van een verzadigde E. amylovora suspensie bekomen na het oogsten van een geïncubeerde (24u, 28°C) Petriplaat met LPGA medium. Na centrifugatie (5 min, 8000 g, 4°C) en verwijdering van het supernatans werd DNA uit de bacteriële pellet geïsoleerd. Een T-toets werd uitgevoerd voor elk staal. Een sterretje boven de gegevens geeft aan dat er een significant verschil is (p<0,05) tussen de gemiddelde opbrengsten bekomen met beide DNA extractiemethoden.	57
Figuur 19 Vergelijking DNA-zuiverheid wat betreft organische componenten (A_{260}/A_{230}) Cheng & Jiang 2006 protocol met CTAB-DTT protocol (Khayat et al.,2004).	58
Figuur 20 Vergelijking DNA-zuiverheid wat betreft eiwit- en/of RNA-contaminanten (A_{260}/A_{280}) Cheng & Jiang 2006 protocol met CTAB-DTT protocol (Khayat et al., 2004).	58
Figuur 21 Resultaat gelelektroforese bacterie DNA stalen. Een selectie van zeven bacterie DNA stalen waarvan één E. coli DNA staal werden geladen in de slotjes van een 0.8% (w/v) TAE gel. De gel werd gedurende 45 minuten bij 80V gelopen. Van elk staal werd 3 μl geladen. De slotnummers en namen van de bijhorende stalen zijn bovenaan de gel weergegeven. De DNA-	

concentraties kunnen teruggevonden worden in Tabel 43 en 44. Bv. Cheng & Jiang 3 =	
Extractie 3 van Cheng & Jiang protocol.....	59
Figuur 22 Vergelijking gemiddelde DNA-opbrengsten (n=4) verkregen met de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene en met het CTAB-DTT (Khayat et al., 2004) protocol uit niet-geïnficeerde bloemstalen afkomstig van potbomen. Elk staal bestond uit 400 mg plantenweefsel. Een T-toets werd uitgevoerd: een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil is tussen beide DNA extractiemethodes.	65
Figuur 23 Vergelijking van de DNA-zuiverheid wat betreft organische contaminanten (A_{260}/A_{230}) met de Plant Material DNA Extraction Kit en het CTAB-DTT (Khayat et al., 2004) protocol van niet-geïnficeerde plantenstalen. Een T-toets werd uitgevoerd: een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil is tussen beide DNA extractiemethodes.	66
Figuur 24 Vergelijking van de DNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280}) met de Plant Material DNA Extraction Kit en het CTAB-DTT (Khayat et al.,2004) protocol van niet-geïnficeerde plantenstalen. Een T-toets werd uitgevoerd: een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil is tussen beide DNA extractiemethodes.....	66
Figuur 25 Gelelektroforese van DNA geïsoleerd uit niet-geïnficeerde plantenstalen (BB = bloembot, BL = open bloem, S = schors van 1- of 2-jarig hout) van drie rassen ('Conference', 'Jonagold' en 'Svatana'). De corresponderende stalen kunnen terug gevonden worden in Tabel 46 en 47. CTAB 4 staat bv. voor de vierde extractie van het CTAB-DTT protocol. De stalen werden geladen in de slotjes van een 0.8% (w/v) TAE gel. De gel werd gedurende 45 minuten bij 80V gelopen. Van elk staal werd 3 μ l geladen.	67
Figuur 26 Tweede gelelektroforese van DNA geïsoleerd uit niet-geïnficeerde plantenstalen. De stalen werden geladen in de slotjes van een 0.8% (w/v) TAE gel. De gel werd gedurende 45 minuten bij 80V gelopen. Van elk staal werd 3 μ l geladen.	68
Figuur 27 Vergelijking van de gemiddelde (n=3) DNA-opbrengsten van met E. amylovora geïnficeerde bloemenstalen. Er werd voor elk staal een T-toets uitgevoerd. Een sterretje boven de gegevens betekent dat er een significant verschil bestaat tussen beide DNA extractie methodes.	70
Figuur 28 Vergelijking van de DNA-zuiverheid wat betreft organische contaminanten (A_{260}/A_{230}) van geïnficeerde bloemenstalen	71
Figuur 29 Vergelijking van de DNA-zuiverheid (A_{260}/A_{280}) van geïnficeerde plantenstalen.	71
Figuur 30 LAMP amplificatieplot van experiment 1 met positieve bacteriestalen en een negatieve controle (TE-buffer) verkregen met het Genie III toestel door een LAMP reactie volgens Bühlmann et al., 2013 met op de X-as de amplificatietijd en op de Y-as de fluorescentie. De LAMP werd uitgevoerd zoals beschreven in 3.12.2. Stalen Rob E3 400 – E3 40 en E3 30 zijn stalen van vorig jaar. Het betreft een verdunning van E. amylovora staal. De C&J stalen slaan op stalen (E. amylovora) welke tijdens deze bachelorproef geëxtraheerd werden met behulp van het Cheng & Jiang (2006) protocol.	72
Figuur 31 LAMP smeltcurve experiment 1 met positieve bacteriestalen en een negatieve controle (TE-buffer) verkregen met het Genie III toestel door een LAMP reactie volgens Bühlmann et al., 2013 met op de X-as de temperatuur en op de Y-as de fluorescentie afgeleide. De stalen zijn dezelfde als in Figuur 30.	72
Figuur 32 LAMP amplificatieplot met positieve bacteriestalen en vals positieve blanco als resultaat verkregen met het Genie III toestel. Er werd een verdunningsreeks meegenomen van staal 160202-3A alsook een negatieve controle (TE-buffer). Well 8 was leeg.	73
Figuur 33 LAMP amplificatieplot verkregen met het Genie III LAMP toestel. In well 1 bevindt zich enkel primermix en Isothermal Mastermix, in well 2 enkel Isothermal Mastermix en in well	

3 enkel de primermix. De rest van de wells zijn leeg. De amplificatie (Isothermal Mastermix + primermix) begint na een 12-tal min.	76
Figuur 34 Amplificatieplot verkregen na uitvoeringen van de tweede qPCR met de stalen welke in de legende onder de figuur aangegeven zijn. In de X-as staat het aantal cycli aangegeven en in de Y-as wordt de relatieve fluorescentie weergegeven. Het resultaat was positief wanneer de Isothermal Mastermix en de primermix samen gevoegd werden. Opnieuw was het staal zonder primers (TM + H ₂ O) en het staal zonder de Isothermal Mastermix (PM + H ₂ O) negatief.	78
Figuur 35 LAMP amplificatieplot verkregen na uitvoering van LAMP op Genie III toestel met in de X-as de amplificatietijd en in de Y-as de fluorescentie. In well 1 bevindt zich enkel 20 µl van de ready-to-go mastermix, zonder toevoeging van een template. De rest van de wells zijn leeg. Er wordt geen amplificatie verkregen, wat een correct resultaat is.....	79
Figuur 36 Amplificatieplot verkregen na uitvoering van LAMP op het Genie III toestel met in de X-as de amplificatietijd en in de Y-as de fluorescentie. Het staal bevindt zich in well 1, de ready-to-go mastermix werd één min opengezet in het quarantaine labo en vervolgens weer gesloten. De rest van de wells zijn leeg.	80
Figuur 37 Smeltcurve verkregen na uitvoering LAMP met het Genie III toestel met in de X-as de temperatuur en in de Y-as de fluorescentie afgeleide. Er wordt een piek verkregen bij ongeveer 84°C. Het staal bevindt zich in well 1 en is enkel de ready-to-go mastermix zonder template. Het stripje met epjes werd na toevoeging van deze mastermix één min opengezet in het quarantaine labo en vervolgens weer gesloten.....	80
Figuur 38 Amplificatiecurve verkregen met het LAMP Genie III toestel met in de X-as de amplificatietijd en in de Y-as de fluorescentie. In well 1 bevindt zich enkel de ready-to-go mastermix, de rest van de wells zijn leeg. De amplificatiecurve start reeds al na ongeveer 10 min.	81

Tabellenlijst

Tabel 1	Overzicht gebruikte primers voor LAMP	17
Tabel 2	Overzicht gebruikte apparatuur aanmaak LPGA voedingsmedium	21
Tabel 3	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor aanmaak LPGA voedingsmedium	21
Tabel 4	overzicht gebruikte stoffen en oplossingen aanmaak LPGA voedingsmedium	22
Tabel 5	Overzicht gebruikte apparatuur voor subculturen bacteriën	22
Tabel 6	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor subculturen bacteriën.....	23
Tabel 7	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor subculturen bacteriën.....	23
Tabel 8	Overzicht gebruikte apparatuur voor bacteriële DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006.....	24
Tabel 9	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor bacteriële DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006.....	25
Tabel 10	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor bacteriële DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006.....	25
Tabel 11	Overzicht gebruikte bacteriestalen voor DNA-extractie volgens Cheng & Jiang 2006	26
Tabel 12	Overzicht gebruikte apparatuur voor bacteriële DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol.....	28
Tabel 13	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor bacteriële DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol.....	28
Tabel 14	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor bacteriële DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol.....	28
Tabel 15	Overzicht gebruikte bacteriestalen voor DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol .	30
Tabel 16	Aanmaak CTAB-DTT extractiebuffer.....	30
Tabel 17	Overzicht gebruikte apparatuur nodig voor staalname geïnfecteerde bloemenstalen.....	32
Tabel 18	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor staalname geïnfecteerde bloemenstalen.....	32
Tabel 19	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor staalname geïnfecteerde bloemenstalen.....	32
Tabel 20	Overzicht van de genomen geïnfecteerde bloemenstalen met oorsprong en identificatie.	33
Tabel 21	Overzicht gebruikte apparatuur voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens CTAB-DTT protocol.....	34
Tabel 22	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens CTAB-DTT protocol.....	34
Tabel 23	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens Khayat	34
Tabel 24	Overzicht gebruikte plantenstalen voor DNA-extractie volgens CTAB-DTT protocol ..	36
Tabel 25	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens de Plant Material DNA Extraction Kit.....	37
Tabel 26	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor DNA-extractie plantenmateriaal volgens de Plant Material DNA Extraction Kit.....	37
Tabel 27	Overzicht gebruikte apparatuur voor het spiken van stalen.....	38
Tabel 28	Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor het spiken van stalen	38
Tabel 29	Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor het spiken van stalen	38
Tabel 30	Overzicht gebruikte apparatuur nodig voor DNA-concentratie en zuiverheid meting met de Multiskan GO	39

Tabel 31 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor DNA-concentratie en zuiverheid meting met Multiskan GO	40
Tabel 32 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor DNA-concentratie en zuiverheid meting met Multiskan GO	40
Tabel 33 Overzicht gebruikte apparatuur voor gelelektroforese	42
Tabel 34 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor gelelektroforese.....	42
Tabel 35 Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor gelelektroforese	43
Tabel 36 Overzicht gebruikte apparatuur voor uitvoering LAMP op Genie III toestel	44
Tabel 37 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor uitvoering LAMP op Genie III toestel	44
Tabel 38 Overzicht gebruikte stoffen en oplossing voor uitvoering LAMP op Genie III toestel .	45
Tabel 39 Overzicht gebruikte primers voor uitvoering LAMP gebaseerd op Bühlmann et al 2012.....	45
Tabel 40 Overzicht primermix volgens Bühlmann et al 2012 [1]	46
Tabel 41 Overzicht gebruikte apparatuur voor uitvoering LAMP op qPCR toestel	47
Tabel 42 Overzicht gebruikt glaswerk en disposables voor uitvoering LAMP op qPCR toestel..	47
Tabel 43 Overzicht nodige materialen voor uitvoeren van een T-toets in Microsoft Excel.....	49
Tabel 44 Ruwe resultaten DNA-extracties (bacterie) volgens Cheng & Jiang (2006)	53
Tabel 45 Ruwe resultaten bacterieel DNA-extractie via CTAB-DTT protocol	54
Tabel 46 Ruwe resultaten DNA-extractie plantstalen via CTAB-DTT protocol (Khayat et al 2004)	61
Tabel 47 Resultaten van DNA-extracties m.b.v. de Plant Material DNA Extraction Kit van OptiGene	63
Tabel 48 Resultaten van DNA-extractie van geïnfecteerde bloemenstalen volgens het CTAB-DTT (Khayat et al., 2004) protocol	69
Tabel 49 Resultaten van DNA-extractie van geïnfecteerde bloemenstalen volgens de Plant Material DNA Extraction Kit	69

