



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie – Cel- en Gentechnologie



MOLECULAIR BIOLOGISCHE DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN *ERWINIA AMYLOVORA*

Nathalie Thys

Promotoren:

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

Proefcentrum Fruitteelt
Proefcentrum Fruitteelt
Hogeschool PXL





Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie
Biotechnologie – Cel- en Gentechnologie



MOLECULAIR BIOLOGISCHE DETECTIE
EN KWANTIFICATIE VAN
ERWINIA AMYLOVORA

Nathalie Thys

Promotoren:

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

Proefcentrum Fruitteelt
Proefcentrum Fruitteelt
Hogeschool PXL



Voorwoord

Dit eindrapport vormt het sluitstuk van drie jaar studeren. Het is het resultaat van weken hard werken, slapeloze nachten, een lach en af en toe een traan. Door het uitvoeren van deze bachelorproef heb ik meer geleerd dan 100 lessen mij had kunnen bijbrengen. Niet enkel het samenwerken met een nieuwe groep mensen, maar ook het opstellen van experimenten en nog belangrijker de zelfstandigheid in het labo. Daarnaast werd ook het probleemoplossend vermogen op de proef gesteld aangezien niet alles van de eerste keer volgens plan verloopt.

Een voorwoord is meestal de ideale plaats om mensen te bedanken, ik zou hier dan ook graag gebruik van willen maken. Als eerste wil ik pcfruit vzw bedanken voor het toevertrouwen van een stukje van hun onderzoek. Ik heb de voorbije maanden deel mogen uitmaken van een toffe groep personeelsleden en heb met veel plezier elke dag bij jullie doorgebracht. Door het uitvoeren van twee projecten en deze bachelorproef heeft het bedrijf een speciaal plekje in mijn hart gekregen. In het bijzonder wil ik graag dr. Ir. Serge Remy en Ir. Hilde Schoofs bedanken. Ze stonden steeds voor mij klaar bij eventuele vragen of praktische obstakels. Jullie hadden het zelf heel druk maar maakten toch steeds eventjes tijd voor mij, daarom een welgemeende dankjewel! Ook aan iedereen in of buiten het labo, bedankt om mij verder te helpen bij vragen. Als tweede wil ik graag mijn PXL-promotor, dr. Ir. Tony Remans bedanken. Zonder zijn feedback zou deze thesis niet kunnen zijn zoals het nu is. Als laatste ook een woordje van dank naar mijn familie en vrienden. Ik was soms niet de gemakkelijkste persoon om mee samen te leven en heb jullie de afgelopen maanden wat minder vaak gezien dan zou moeten maar enorm bedankt voor jullie onvoorwaardelijke steun!

Nathalie Thys, Sint-Truiden, 14 mei 2017

Moleculair biologische detectie en kwantificatie van *Erwinia amylovora*

Nathalie Thys¹, Hilde Schoofs², Tony Remans¹, Serge Remy²

¹Hogeschool PXL, Diepenbeek, België

²Proefcentrum Fruitteelt vzw, Sint-Truiden, België

Abstract

In de fruitsector komen verschillende pathogenen voor die de opbrengst van de oogst drastisch kunnen verminderen. *Erwinia amylovora* is een van deze pathogenen. Het is een gramnegatieve bacterie die bacterievuur veroorzaakt, en dit vooral bij planten van de familie *Rosaceae*. De term bacterievuur komt van de typische symptomen nl. het zwart verkleuren van bladeren en bloesems, alsof ze door vuur verschroeid zijn. Elk jaar kunnen appel- en peertelers geconfronteerd worden met de nefaste gevolgen van deze bacterieziekte. Omwille van de snelle verspreiding van bacterievuur zijn moleculaire detectiemethodes zeer geschikt. De snelheid en de grote gevoeligheid van deze technieken zorgen ervoor dat bacterievuur al in een vroeg stadium gedetecteerd kan worden en dit op een relatief korte termijn. Dit heeft als gevolg dat er geen symptomen nodig zijn om een diagnose te stellen. Het doel van deze bachelorproef is het ontwikkelen van een LAMP- en qPCR-protocol waardoor er een snelle, betrouwbare en respectievelijk kwalitatieve en kwantitatieve detectie van *E. amylovora* mogelijk is. Tijdens het uitvoeren van het LAMP-protocol, ontstond er een probleem met de negatieve controles. Bij het uitvoeren van de LAMP-reactie vertoonde vaak één blanco in een reeks herhalingen van blanco's een positief resultaat. Verschillende opties werden geprobeerd om dit te voorkomen maar telkens dook hetzelfde probleem op. Daarom werd er besloten om het LAMP-protocol niet verder te optimaliseren. Het uitgewerkte qPCR-protocol werd getest op DNA geïsoleerd uit een reincultuur van *E. amylovora*, op spiked stalen (op DNA-niveau en op organisme-niveau) en op geïnfecteerde stalen. Deze testen bevestigden dat qPCR zeer geschikt is voor een kwantitatieve detectie van *E. amylovora*.

Sleutelwoorden: appel, DNA-extractie, *Erwinia amylovora*, bacterievuur, LAMP, peer, qPCR, real-time PCR, *Rosaceae*

Introductie

Het Proefcentrum voor Fruitteelt (pcfruit vzw) is een onderzoekscentrum dat samen met universiteiten en tal van andere instellingen onderzoek doet gerelateerd aan de fruitteelt. De informatie die ze uit hun onderzoeken halen, wordt gebruikt om aanbevelingen te geven aan fruittelers, o.a.

op het gebied van gewasbescherming, teelttechniek en bemesting. Er wordt binnen pcfruit vzw ook onderzoek gedaan naar plantenziektes en de detectie van de verschillende pathogenen die deze ziektes kunnen veroorzaken. Eén van de pathogenen waar momenteel onderzoek naar verricht wordt is *Erwinia amylovora*. In de fruitteelt komt het regelmatig voor dat een boom geïnfecteerd geraakt met een pathogeen.

Bij een bacterievuurinfectie is het noodzakelijk om de aangetaste planten sterk te snoeien tot een halve meter onder de overgang van ziek naar gezond weefsel of in het ergste geval zelfs volledig te rooien. Een infectie wordt vaak pas opgemerkt wanneer er al duidelijke symptomen waarneembaar zijn. Dit betekent dat de infectie in sommige gevallen reeds tot een ver stadium gevorderd is. Om dit te voorkomen, is het nodig de ziekte vroegtijdig te detecteren. Hiervoor zijn er zeer gevoelige detectiemethodes nodig.

Erwinia amylovora

Erwinia amylovora is een gramnegatieve bacterie en behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae*. Het is de enige bacterie die in staat is om bacterievuur te veroorzaken (Vanneste, 2000). *E. amylovora* is hoog-virulent en is in staat om zeer snel doorheen de gastheerplant te bewegen. Vooral bij planten van de rozenfamilie (*Rosaceae*) zoals o.a. appel- en perenbomen (Piqué *et al.*, 2015).

Onderzoek heeft geleid tot de identificatie van twee grote virulentiefactoren die bijdragen tot de infectie van een gastheerplant: het exopolysaccharide amylovoran en het Hrp type III secretiesysteem. Naast deze twee belangrijkste virulentiefactoren heeft onderzoek uitgewezen dat er nog andere factoren zijn die niet direct betrokken zijn bij de infectie maar de bacterie helpen om te overleven in de gastheer cel. Deze factoren zijn o.a. het sorbitolmetabolisme en 'two-component signal transduction' systemen (TCST) (Eastgate, 2000; Holtappels, 2015). Amylovoran is een polymeer bestaande uit een pentasaccharide herhalende unit. Deze unit bestaat meestal uit vier galactose-residu's en één glucuronzuur-residu. De *ams*-genen zijn de genen die betrokken zijn bij de biosynthese van amylovoran (Vanneste, 2000; Piqué *et al.*, 2015). De

synthese van amylovoran is noodzakelijk voor de vorming van een biofilm van *E. amylovora* bacteriën. Deze biofilm zorgt voor de kolonisatie van xyleemweefsel waardoor er een verminderde waterdoorstroom in de plant ontstaat. Als gevolg hiervan zullen de geïnfecteerde delen van de plant necrotiseren, een typisch symptoom van bacterievuurinfecties (Koczan *et al.*, 2008, 2009; Edmunds *et al.*, 2013).

Het type III secretiesysteem, ook wel T3SS genoemd, is een andere belangrijke virulentiefactor gebruikt door *E. amylovora*. Net zoals andere gramnegatieve fytopathogene bacteriën gebruikt *E. amylovora* dit systeem om effectorproteïnes te injecteren in het cytosol van de gastheerplant. Deze effectorproteïnes maken het voor de bacterie mogelijk om te overleven en zich te vermenigvuldigen in de gastheer cel door het verhinderen van de cellulaire processen (zoals de signaaltransductie) in de gastheer cel. T3SS wordt gevormd door een groot, cilindrisch macromolecule dat bestaat uit verschillende ring-achtige structuren. Bij de meeste plantpathogene bacteriën wordt T3SS gemaakt van Hrc-proteïnen, gecodeerd door de *Hrc*-genen en Hrp-proteïnen, gecodeerd door de *Hrp*-genen (Hueck, 1998; Vanneste, 2000; Coburn, Sekirov and Finlay, 2007; Piqué *et al.*, 2015; Zhao, 2016).

Bacterievuur

Bacterievuur is de naam van de ziekte die veroorzaakt wordt door de bacterie *Erwinia amylovora*. Het is een ziekte die al gedurende 30 jaar aanwezig is in de Belgische fruitteelt en die grote schade kan aanrichten zowel bij peer- als appelbomen (Schoofs and Deckers, 2014).

Alle bovengrondse delen van gastheerplanten kunnen geïnfecteerd geraken door de pathogeen.

De meest voorkomende en karakteriserende symptomen zijn: (a) verwelken en afsterven van bloemenclusters. De dode bloesems worden droog en kleuren donkerbruin tot zwart. (b) het zwart kleuren van bladeren. Geïnfecteerde bladeren vertonen necrotische vlekken op verschillende plaatsen afhankelijk van waar de infectie plaatsvond. (c) net zoals de bladeren zullen ook de geïnfecteerde vruchten uiteindelijk volledig zwart kleuren en verschrompelen. De vruchten blijven wel aan de takken gehecht wat zorgt voor een gemummificeerd uitzicht (d) het voorkomen van slijmdruppels op geïnfecteerde plantendelen, een symptoom dat zeer duidelijk naar voren komt wanneer de infectie verder gevorderd is (EPPO, no date; Vanneste, 2000).

De bacteriën overwinteren aan de rand van de kankers van het afgelopen seizoen op takken en boomstammen. Wanneer de temperatuur stijgt naar ongeveer 20°C, beginnen de bacteriën zich te vermenigvuldigen. Deze bacteriën worden zichtbaar wanneer ze zich aan de buitenkant van de kankers bevinden in de vorm van heldere tot amberkleurige slijmdruppels, die een hoge concentratie aan bacteriën en suikers bevatten (The Pennsylvania State University, 2017). Door regen, wind of insecten die aangetrokken worden door de suiker in deze druppels, kunnen de bacteriën worden verspreid. De bacteriën kunnen terechtkomen op de stampers van de bloemen waar ze zich opnieuw kunnen vermenigvuldigen wanneer de temperatuur hoog genoeg is. Bovendien kunnen de bacteriën gemakkelijk van bloem naar bloem getransfereerd worden door bijen en andere bloembezoekende insecten. Regen of dauw zorgen er daarna voor dat de bacteriën van de stamper afspoelen en in de bloembodem van de bloem terechtkomen. Via natuurlijke openingen zoals de nectarklieren kunnen de bacteriën de bloemen binnendringen. Een andere manier waarop bacterievuur de plant

kan binnendringen is via een wonde, bijvoorbeeld veroorzaakt door insecten met scherpe monddelen of wonden veroorzaakt door hagel. Op deze beschadigde vruchten kan *E. amylovora* zich snel vermenigvuldigen en worden er opnieuw slijmdruppels geproduceerd. Door verdere verspreiding van deze slijmdruppels kunnen er op korte tijd tal van nieuwe infecties gevormd worden (Wilcox, 1994; Schoofs and Deckers, 2014).

Huidige bestrijding en detectie van bacterievuurinfecties

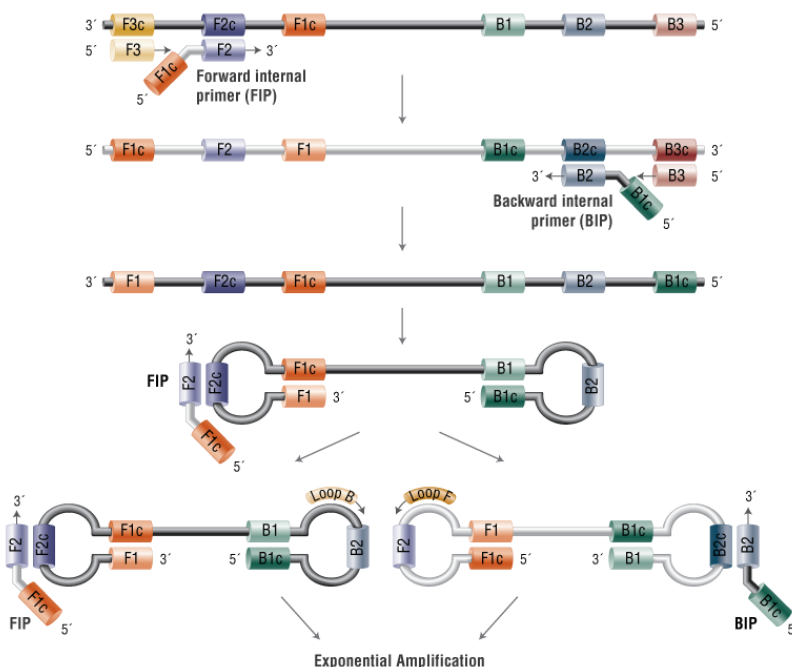
Tot ongeveer 10 jaar geleden was de voornaamste bestrijdingsmethode het gebruik van antibiotica zoals vb. streptomycine. Vanuit Europa wil men inzetten op een land- en tuinbouw zonder antibiotica. Dit heeft in 2005 gezorgd voor een verbod van streptomycine in België in de strijd tegen bacterievuur. Sinds het verbod op streptomycine zijn er verschillende strategieën onderzocht. Eén daarvan is het verbeteren van de weerstand van de plant. Dit kan door het toedienen van plantenversterkers zoals vb. Vacciplant (Laminarine) of Aliette (fosetyl-A). Een tweede strategie is het inzetten van bacteriën met een antagonistische werking tegen *E. amylovora* (Schoofs and Deckers, 2014). Het werkingsprincipe van deze bacteriën is gebaseerd op een competitie voor plaats en nutriënten (Johnson *et al.*, 1993). Uit het onderzoek naar bacterievuur komt duidelijk naar voren dat het probleem niet met één middel op te lossen is. Er is een hele strategie nodig in combinatie met verschillende bestrijdingsmiddelen (Schoofs and Deckers, 2013).

De detectie van *E. amylovora* kan opgedeeld worden in twee categorieën. Enerzijds de klassieke detectiemethodes en anderzijds de moleculaire detectiemethodes. Onder de klassieke detectiemethodes behoren het gebruik van semi-selectieve media en immunofluorescentietechnieken (Bereswill

et al., 1992). Bij het gebruik van semi-selectieve media worden de bacteriën uitgeplaat en na incubatie kan a.d.h.v. de kolonies de aan- of afwezigheid van de bacteriën aangetoond worden en de hoeveelheid bacteriële cellen bepaald worden. Zo zullen bijvoorbeeld kolonies van *E. amylovora* geel kleuren op 'minimal agar medium MM2' (Bereswill et al., 1998).

Bij immunofluorescentie gaat men gebruik maken van polyklonale antilichamen specifiek gericht tegen bepaalde antigenen. In dit geval dus antigenen van *E. amylovora* (McLaughlin, Chen and Wells, 1989). Een andere techniek waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen, is de techniek beschreven door Gorris et al. (1996). Hierbij wordt double antibody sandwich indirect ELISA (ELISA-DASI) gebruikt om *E. amylovora* te detecteren (Gorris et al., 1996). Net zoals bij selectieve media is het bij het gebruik van antilichamen ook mogelijk om de hoeveelheid bacteriën te kwantificeren.

Onder de moleculaire detectiemethodes behoren o.a. LAMP en qPCR. LAMP of loop mediated isothermal amplification is een kwalitatieve techniek die het DNA amplificeert zoals de klassieke PCR maar dit onder isothermale omstandigheden waardoor er op zeer korte tijd al resultaat bekomen kan worden. Deze techniek maakt gebruik van een set van vier speciaal ontworpen primers (twee primersets), wat zorgt voor een zeer specifieke binding. Het DNA-polymerase dat gebruikt wordt is het *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA-polymerase, wat als grote voordeel heeft dat het helicase-activiteit bezit. Hierdoor is er geen denaturerende stap nodig om het DNA enkelstrengig te maken zoals dat bij de klassieke PCR wel het geval is. De amplificatie kan nog versneld worden door het toevoegen van een derde primerset: de loop primers (Eiken Genome Site, no date; Notomi et al., 2000; Iwamoto, Sonobe and Hayashi, 2003). Op onderstaande figuur (Figuur 1) wordt het principe van LAMP weergegeven.



Figuur 1: Principe Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) (New England BioLabs, no date). De FIP, BIP, F3 en B3 primers binden aan het template-DNA waarna ketenverlenging optreedt. Als gevolg van complementaire regio's zullen er loop-structuren gevormd worden (F1 bindt aan F1c en B1 bindt aan B1c), op deze loop-structuren kunnen de primers (waaronder Loop F en Loop R) binden wat de basis vormt voor exponentiële amplificatie.

qPCR of real time PCR is een tweede techniek om DNA te amplificeren. Het grote voordeel van deze techniek is dat er een kwantitatieve detectie mogelijk is en een reductie in het aantal post-PCR handelingen aangezien er geen gelelektroforese dient uitgevoerd te worden na de amplificatie (Pirc *et al.*, 2009).

Onderzoeksvraag/probleemstelling en doelstelling(en)

De hoofddoelstelling van deze bachelorproef is het uitwerken en optimaliseren van een LAMP- en qPCR-protocol dat gebruikt kan worden voor de detectie van *E. amylovora*, de fytopathogeen die bacterievuur veroorzaakt. Omwille van de snelle verspreiding en de grote gevolgen van deze plantenziekte is het noodzakelijk om bacterievuur op een efficiënte en specifieke manier te detecteren. Dit maakt dat moleculaire detectiemethodes zeer geschikt zijn omdat hierbij op een relatief korte termijn resultaten kunnen bekomen worden. Daarnaast zorgt de grote gevoeligheid van deze technieken ervoor dat bacterievuur al in een vroeg stadium gedetecteerd kan worden. Voor de uitvoering van die technieken is er eerst zuiver DNA nodig. De eerste specifieke doelstelling van deze bachelorproef was dan ook om de DNA-extractieprocedure te optimaliseren waardoor er één standaardprotocol ontstaat dat gebruikt kan worden voor de isolatie van DNA uit bacteriën en verschillende soorten plantenstalen. Bij het uitvoeren van deze bachelorproef is er bijkomende factor waarmee rekening dient gehouden te worden. Tijdens de bachelorproef die vorig jaar werd uitgevoerd door Saartje Swennen (2016), bleek er een contaminatie van *E. amylovora* aanwezig te zijn in het labo. Hierdoor vertoonden alle negatieve controles van de LAMP-reactie toch een positief resultaat. Om alle volgende

experimenten uit te kunnen voeren dienden maatregelen genomen te worden om de contaminatie te verwijderen en in de toekomst te vermijden. Daarom was de tweede specifieke doelstelling om na te gaan of deze contaminatie effectief verdwenen was. De derde specifieke doelstelling was het testen van LAMP en qPCR voor *E. amylovora* detectie op zuiver *E. amylovora*-DNA, spiked stalen en geïnfecteerde stalen.

Materialen & methoden

Staalname

De plantenstalen (bloemen in volle bloei) die gedurende deze bachelorproef gebruikt werden, zijn afkomstig van zowel geïnfecteerde als niet-geïnfecteerde perenbomen uit lopende serre-experimenten. De staalname gebeurde door middel van een pincet die tussen elke staalname ontsmet werd met ethanol (70% v/v). Bij enkele stalen werd er nog een extra wasstap en dissectiestap uitgevoerd. Dit protocol is te vinden in bijlage 3.1 op pagina 47.

Kunstmatige infectie plantenstalen

Perenbomen in pot worden op verschillende fenologische stadia kunstmatig geïnfecteerd met *E. amylovora* in de quarantaineserre. De infectie begint met het maken van een subcultuur van een E3 bacterievuurstam. Na een incubatieperiode van 24 uur wordt van deze subcultuur een suspensie gemaakt en verdund met 1x PBS (Phosphate buffered saline: 0,14 M NaCl; 2,68 mM KCl; 2 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1,47 mM KH₂PO₄) tot deze suspensie een turbiditeit van 35 bereikt. De bacteriesuspensie wordt verneveld over de

bloeiwijzen. De groeiomstandigheden in de serre bedragen een temperatuur van 23°C en een luchtvochtigheid van 60-70%.

DNA-extractie bacteriën volgens Cheng & Jiang (2006)

Genomisch DNA van bacteriën werd bekomen met behulp van een extractieprotocol volgens Cheng & Jiang (2006). Dit is een zeer snelle methode die gebruik maakt van een STE-extractiebuffer. STE-buffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0. 1 ml van een celsuspensie wordt gecentrifugeerd waarna de pellet opgelost wordt in 400 µl STE-buffer. Het protocol voor het uitvoeren van deze DNA-extractie is terug te vinden in bijlage 3.2 op pagina 50.

DNA-extractie plantenmateriaal volgens standaard CTAB-protocol

Om de LAMP en qPCR uit te kunnen voeren is er nood aan DNA-stalen van zowel planten als van de pathogeen *E. amylovora*. Tijdens de bachelorproef van vorig jaar werd er gebruik gemaakt van een DNA-extractieprotocol gebaseerd op het protocol van Khayat *et al.* (2004). Daarnaast hebben mijn groepsleden en ik tijdens het tweede bachelorjaar een CTAB-gebaseerd in-house protocol geoptimaliseerd (Aerts *et al.*, 2016). De voordelen van beide protocollen werden gecombineerd om zo een standaard CTAB-protocol op te stellen. Deze voordelen zijn het gebruik van fenol:chloroform:isoamylalcohol om de proteïnen te verwijderen en de RNase behandeling aan het begin van de DNA-isolatie.

Voor de extractie van bacteriële cellen worden de bacteriën opgelost in 800 µl CTAB-buffer (50 mM CTAB, 10 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1,4 M NaCl, 0,25 mM PVP40 Mw 40000). Daarna wordt het extractieprotocol vervolgd vanaf de eerste incubatiestap (30 min., 55°C). Voor de

extractie van plantenweefsel wordt er ongeveer 0,4 g plantenmateriaal verzameld en overgebracht in een crushzakje. Hieraan wordt 4 ml CTAB-buffer (50 mM CTAB, 10 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1,4 M NaCl, 0,25 mM PVP40 Mw 40000) toegevoegd. Na een incubatiestap van 5 min. op kamertemperatuur, worden de stalen gecrushed met een handcrusher (Sercolab, art. no. 4000010, Merksem, België) en wordt de vloeistof overgebracht in een microtube.

Na een incubatiestap van 30 min. bij 55°C worden de stalen behandeld met DNase-vrij RNase aan een eindconcentratie van 200 µg/ml. Hierna volgt opnieuw een incubatiestap van 30 min. bij 37°C. Aan elk staal wordt een gelijke hoeveelheid fenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) toegevoegd. Deze oplossing wordt gevortext en gecentrifugeerd gedurende 5 min. op 5000 rpm bij 4°C. De bovenste waterige fase wordt overgebracht in een nieuwe microtube waarna een gelijke hoeveelheid chloroform:isoamylalcohol (24:1) wordt toegevoegd. Deze oplossing wordt gevortext en gecentrifugeerd gedurende 5 min. op 5000 rpm bij 4°C. De bovenste waterige fase wordt overgebracht in een nieuwe microtube. Eventueel kan het toevoegen van de chloroform:isoamylalcohol (24:1) herhaald worden. Aan elk staal wordt ammoniumacetaat (7,5 M) toegevoegd tot een eindconcentratie van 2,5 M, gevolgd door 2 volumes ijskoude absolute ethanol (>99,8%). De oplossing wordt enkele keren geschud en daarna gecentrifugeerd gedurende 20 min. op 13000 rpm bij 4°C. Het supernatans wordt verwijderd en de DNA-pellet wordt gewassen met 200 µl 70% ijskoude ethanol waarna een centrifugatiestap wordt uitgevoerd gedurende 20 min. op 13000 rpm bij 4°C. Het supernatans wordt verwijderd waarna, na het drogen van de pellet aan de lucht, de pellet wordt opgelost in 50-100 µl TE-buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0)

Bepaling DNA-concentratie en DNA-zuiverheid met behulp van UV-spectrometrie

De concentratie en zuiverheid van het geïsoleerde DNA werd door middel van een UV-spectrofotometrische (230 nm; 260 nm; 280 nm) meting bepaald. Hiervoor werd er gebruik gemaakt van het toestel 'Multiskan Go' (ThermoFisher Scientific, art. nr. SN1510-01228, Merelbeke, België) in combinatie met een μ drop plaat (ThermoFisher Scientific, art. nr. N12391, Merelbeke, België). Als blanco werd er gebruik gemaakt van demi-water of TE-buffer afhankelijk van de vloeistof waarin het DNA is opgelost. Het protocol is terug te vinden in bijlage 3.4 op pagina 60.

Verdunningsreeksen, spiken, bepalen van kolonievormende eenheden (cfu) per ml

Het spiken of toevoegen van positief matrijs (template) DNA aan negatief controle-DNA waardoor een verwacht positief, in dit geval qPCR, resultaat wordt bekomen kan op twee manieren gebeuren, enerzijds op DNA-niveau en anderzijds op organisme-niveau. Voor het spiken op DNA-niveau wordt er gebruik gemaakt van DNA van *E. amylovora* dat tijdens de bachelorproef van vorig jaar en twee jaar geleden werd geëxtraheerd volgens een gemodificeerd Khayat *et al.* (2004) protocol of het protocol van Cheng & Jiang (2006). Het geëxtraheerde DNA van *E. amylovora* wordt tienvoudig verdund met nucleasevrij water of TE-buffer, afhankelijk van de vloeistof waarin het DNA is opgelost. Deze tienvoudige verdunningsreeks heeft een concentratiebereik van 100 ng/ μ l tot en met 0,1 fg/ μ l. Dit DNA van *E. amylovora* wordt dan telkens toegevoegd aan een gelijke hoeveelheid plant-DNA waarna de LAMP- of qPCR-reactie uitgevoerd wordt. Voor het spiken op organisme-niveau wordt

een cultuur van *E. amylovora* tienvoudig verdund. De beginconcentratie van deze cultuur wordt gemeten door middel van een turbiditeitsmeter (VWR International, art. nr. Merc1.18330.0001, Leuven, België). Dit toestel meet de troebelheid van een bacteriële suspensie, in het geval van een E3-stam van *E. amylovora* komt een waarde van 35 overeen met 10^8 CFU/ml. Wanneer een waarde van 35 bereikt wordt, wordt de cultuur tienvoudig verdund met PBS 1x (0,14 M NaCl; 2,68 mM KCl; 2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 1,47 mM KH_2PO_4). Deze verdunningsreeks heeft een concentratiebereik van 10^8 CFU/ml tot en met 10^1 CFU/ml. Van elke verdunning wordt een gelijke hoeveelheid (in dit geval 10 μ l) cultuur toegevoegd aan een bloemstaal (telkens 0,1 g bloem; gewicht is na het verwijderen van de petalen-kroonblaadjes) waarna een DNA-extractie uitgevoerd wordt. Dit komt dus overeen met een hoeveelheid CFU van 10^6 tot en met 0,1 per verdunning, respectievelijk. Het finale DNA-staal (dat dus zowel plant- als *E. amylovora*-DNA bevat) wordt vervolgens gebruikt als input voor de LAMP- of qPCR-reactie. Om na te gaan of de verdunningsreeks effectief het gewenste aantal CFU/ml bevat, wordt er een uitplating uitgevoerd. 100 μ l van elke verdunning wordt uitgeplaat op KingB-medium [2% (w/v) Protease Pepton; 1% (v/v) glycerol; 0,15% (w/v) K_2HPO_4 ; 0,15% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5% (w/v) agar; 0,025% (w/v) cycloheximide]. De geënte voedingsbodems worden geïncubeerd bij 24°C gedurende 48 uur. Na de incubatieperiode wordt het aantal kolonievormende eenheden aanwezig op de voedingsbodem geteld. Dit aantal wordt gedeeld door het product van de verdunning en de hoeveelheid staal op de voedingsbodem. Het resultaat van deze berekening is het aantal kolonievormende eenheden per ml (CFU/ml).

Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

De amplificatie van genomisch DNA kan op verschillende manier gebeuren. Eén van deze methoden is d.m.v. loop mediated isothermal amplification oftewel LAMP. LAMP is een techniek die gebruik maakt van een reactie die doorgaat op één temperatuur, waardoor er veel sneller resultaat bekomen kan worden. De gebruikte primers en het gebruikte temperatuurprofiel voor het uitvoeren van de LAMP zijn gebaseerd op het artikel van Bühlmann *et al.* (2013). In Tabel 1 is een overzicht te zien van de gebruikte primers.

Tabel 1: Overzicht gebruikte primers voor de amplificatie van *Erwinia amylovora* DNA d.m.v. LAMP; F3 en B3 = outer primers; FIP en BIP = inner primers; Loop F en R = loop primers; R in sequentie wijst op bindingsplaats voor purinebase (A of G)

Primer	Sequentie
F3 primer EAMY_3195	5'-TCAAGATCGTGTGGCTATG-3'
B3 primer EAMY_3195	5'-CTAAAAACCGGGCAAAC-3'
FIP primer EAMY_3195	5'-ACGRTTCTACCTTCCTGTC TACTTCTCTGGGTTTCAGTC-3'
BIP primer EAMY_3195	5'-ATGTCACCTGATTCTACAGCC GCAATC-3'
LoopF primer EAMY_3195	5'-ACATTAGCGCCGACCAA -3'
LoopR primer EAMY_3195	5'-CTRRTAAGATGGCATGCAGA-3'

De primermix van 5 µl per PCR-microtube bestond uit volgende primers (alle primers afkomstig van Eurogentec, Luik, België): 0,08 µM F3-primer; 0,08 µM B3-primer; 0,8 µM FIP-primer; 0,8 µM BIP-primer; 0,4 µM LoopF-primer en 2,4 µM LoopR-primer. Aan deze primermix wordt 15 µl IsoThermal Mastermix (OptiGene, Horsham, Verenigd Koninkrijk) en 5 µl template-DNA toegevoegd. Om contaminatie te vermijden wordt het pipetteren van de mastermix en het template-DNA uitgevoerd in een PCR-kabinet (VWR, art. no. 732-2541, Leuven,

België) waar eerst gedurende 30 min. een UV-lamp (254nm) gebrand heeft.

De reactie werd uitgevoerd in een OptiGene Genie III toestel (Vision4Care, art. nr. GEN3-1082, Zottegem, België) onder de volgende omstandigheden: amplificatie bij 65°C gedurende 30 min; opstellen dissociatiecurve: 98°C voor 1 min waarna de temperatuur daalt aan een snelheid van 0,05°C/s tot een temperatuur van 80°C wordt bereikt. Het gehele LAMP-protocol is terug te vinden op pagina 63 in bijlage 3.5.

Real time PCR (qPCR)

Een tweede methode om genomisch DNA te amplificeren is d.m.v. real-time PCR of qPCR. Dit is een kwantitatieve methode die gebruikt maakt van een fluorescentiesignaal, in dit geval uitgezonden door de Taqman-probe om de hoeveelheid gevormde PCR-producten te meten. De gebruikte primers en het gebruikte temperatuurprofiel zijn gebaseerd op een artikel van Lehman *et al.* (2008). In Tabel 2 is een overzicht te zien van de gebruikte primers.

Tabel 2: Overzicht gebruikte primers voor de amplificatie van *Erwinia amylovora* DNA d.m.v. qPCR; Ea = *Erwinia amylovora*; Isc = *levansucrase* (het geamplificeerde gen); Ea-IscF = forward primer; Ea-IscR = Reverse primer; Ea-IscP = probe

Primer	Sequentie
Ea-IscF	5'-CGCTAACAGCAGATCGCA-3'
Ea-IscR	5'-AAATACGCGCAGACCAT-3'
Ea-IscP	5'-(CY5)CTGATAATCCGCAATTCCA GGATC(IAbRQ)-3'

De reactiemix van 25 µl per well bestond uit 1x PCR-buffer (New England BioLabs, Massachusetts, Verenigde Staten); 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, Californië, Verenigde Staten); 0,2 mM dNTP's met UTP's (Applied Biosystems, Californië, Verenigde Staten); 0,1 µM CY5 fluorescent gelabelde Ea-IscP probe (Integrated DNA technologies, Leuven, België); 0,2 µM forward primer Ea-IscF (Integrated DNA technologies, Leuven,

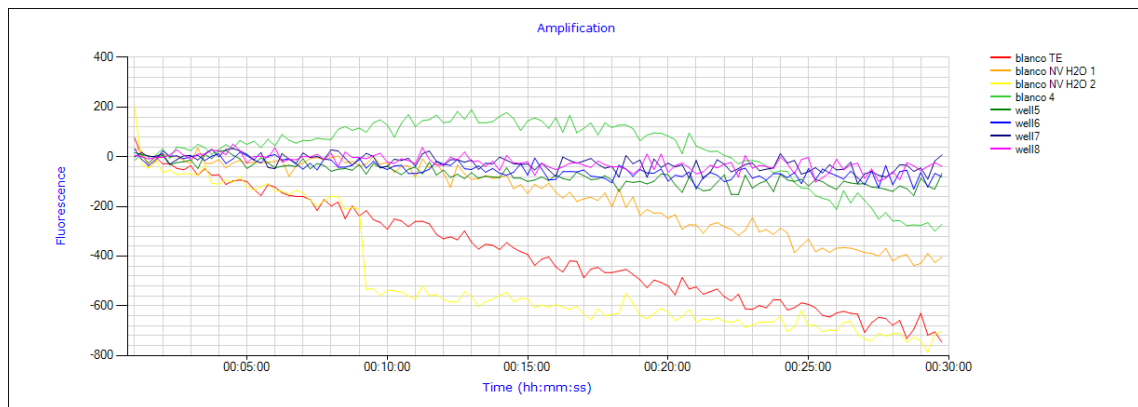
België); 0,2 µM reverse primer Ea-lscR (Integrated DNA technologies, Leuven, België); 1,5 U *Taq*-polymerase (Invitrogen, Californië, Verenigde Staten); 1 U/µl AmpErase (Applied Biosystems, Californië, Verenigde Staten); 5 µl template DNA en aanvullen tot 25 µl met steriel water. Om contaminatie te vermijden wordt het pipetteren van de mastermix en het template-DNA uitgevoerd in een PCR-kabinet (VWR, art. no. 732-2541, Leuven, België) waar eerst gedurende 30 min. een UV-lamp (254nm) gebrand heeft. De reactie werd uitgevoerd in een Applied Biosystems 7500 real time PCR-toestel (Applied Biosystems, art. nr. 7500, Lennik, België) onder de volgende omstandigheden: 50°C gedurende 2 min; 95°C gedurende 5 min; 40 cycli van 95°C gedurende 10 sec en 60°C gedurende 30 sec; 60°C gedurende 1 min. Het gehele qPCR-protocol is terug te vinden op pagina 72 in bijlage 3.7.

Resultaten & Discussie

Controle afwezigheid contaminatie

Tijdens de bachelorproef die vorig jaar werd uitgevoerd, bleek er een contaminatie van *E. amylovora* aanwezig te zijn in het labo. Dit had als gevolg dat alle negatieve controles van de LAMP-reacties toch een positief resultaat vertoonden. De exacte oorzaak/bron van de contaminatie werd niet gevonden. Aangezien natriumhypochloriet DNA verwijdert, werd het volledige labo gepoetst met javel [1/10 verdunning; 1,5% (w/v) NaClO] (Prince and Andrus, 1992). Om alle volgende experimenten uit te kunnen voeren, was het belangrijk om zeker te zijn dat de contaminatie nu verdwenen was. Hiervoor werden verschillende LAMP-reacties uitgevoerd waarbij geen template of

matrijs DNA werd toegevoegd maar water of TE-buffer. Ondanks dat er vanaf deze thesis gewerkt kon worden in twee UV-gesteriliseerde PCR-kabinetten (de eerste voor het aanmaken van de PCR-mastermix in het quarantainelabo en de tweede voor het toevoegen van het template DNA in het gewone labo), werd telkens op het hetzelfde probleem gestoten nl. een van de vier herhalingen van de blanco vertoonde een positief en specifiek *E. amylovora* resultaat. Vermoedelijk was dit te wijten aan het feit dat er toch nog ergens in het labo een ampliconcontaminatie aanwezig was. Aangezien niet alle blanco's een positief resultaat vertoonden, werden bepaalde opties zoals een contaminatie in de buffer, primerstockoplossingen of mastermix uitgesloten. Een verklaring waar ook rekening mee gehouden moet worden is dat er een contaminatie aanwezig kan zijn die zo klein is dat deze hoeveelheid zich op de rand van de detectielimiet bevindt en dus op bepaalde momenten wel en op bepaalde momenten niet wordt geamplificeerd. De resultaten van de belangrijkste LAMP-reacties zijn te vinden vanaf pagina 28 in de bijlagen. Na verschillende methodes om de mogelijke bron(nen) van contaminatie te omzeilen of te verwijderen te hebben uitgeprobeerd zoals vers steriel water, nieuwe tips, behandeling van het materiaal met javel enz., werd er toch een resultaat bekomen waarbij alle herhalingen van de blanco negatief waren (Figuur 2). Op de figuur is er enkel een lichte stijging te zien in de amplificatiecurve van blanco 4. Dit is echter zo'n kleine stijging dat dit te verwaarlozen is en bovendien is het een niet exponentiële toename wat eveneens duidt op een niet-specifieke amplificatie. Op de dissociatiecurve was er bij geen enkel staal een piek waarneembaar (resultaten niet getoond) wat de afwezigheid van *E. amylovora* bevestigt. De dissociatiecurve is te vinden in de bijlagen op pagina 31.



Figuur 2: LAMP amplificatiecurve van de controle van de afwezigheid van ampliconcontaminatie met enkel buffer in de mastermix en geen template-DNA; X-as = tijd (u:min:s); Y-as = fluorescentieniveau; blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l IsoThermal Mastermix; Well 1: blanco met TE-buffer (5 μ l); Well 2: blanco met nucleasevrij H₂O (5 μ l) dat ook gebruikt werd voor de primermix; Well 3: blanco met nucleasevrij H₂O (5 μ l; epje nog niet eerder geopend); Well 4: blanco enkel bestaande uit 5 μ l primermix en 15 μ l IsoThermal Mastermix; Well 5-8: leeg

Omdat deze bachelorproef niet enkel de detectie van *E. amylovora* d.m.v. LAMP omvat, werd ook de afwezigheid van contaminatie getest met behulp van het qPCR-protocol. Deze qPCR-reactie had het gewenste resultaat en alle negatieve controles vertoonden ook effectief geen amplificatie. Het resultaat van deze qPCR-reactie is te vinden in de bijlagen op pagina 32. Om er zeker van te zijn dat er in de toekomst ook geen ampliconcontaminatie zou opduiken, werd er besloten om bij alle volgende qPCR-reacties gebruik te maken van AmpErase® (Uracil N-glycosylase). Dit enzym zorgt ervoor dat reeds aanwezige PCR-producten worden afgebroken alvorens het nieuwe amplicon wordt gevormd.

DNA-extracties uitgevoerd met standaard CTAB-protocol

Om de LAMP en qPCR uit te kunnen voeren is er nood aan DNA-stalen van zowel planten als van de pathogeen *E. amylovora*. Dit DNA werd bekomen door het uitvoeren van een standaard CTAB-protocol op niet-geïnfecteerde bloemen, kunstmatig geïnfecteerde bloemen en spiked stalen op organisme-niveau. In onderstaande tabel is het resultaat te zien van de DNA-extractie uit bloemstalen die niet kunstmatig geïnfecteerd werden en dus fungeren als negatieve controle of gespiked kunnen worden bij het uitvoeren van qPCR op spiked samples (DNA-niveau).

Tabel 3: Overzicht spectrofotometrisch bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 26/4/2017 na dissectie van bloemen; de stalen (1,2,3 en 4) zijn afkomstig van proef 17PerwiAmConfSerreRes07; staal 1,2,3 en 4 werden telkens na homogenisatie onderverdeeld in meerdere substalen; elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waarden zijn de gemiddeldes van elke meting

Staal	Concentratie (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
Staal 1.1	397,84	1,95	2,03
Staal 1.2	447,88	1,98	2,10
Staal 1.3	366,44	2,01	2,12
Staal 2.1	419,26	1,99	2,13
Staal 2.2	276,74	2,01	2,10
Staal 2.3	441,59	2,00	2,16
Staal 3.1	525,78	2,02	2,14
Staal 3.2	398,09	2,17	2,17
Staal 3.3	530,54	2,04	2,19

Staal 4.1	501,57	2,01	2,17
Staal 4.2	301,52	2,02	2,14
Staal 4.3	325,49	2,01	2,13

De resultaten van alle uitgevoerde DNA-extracties zijn te vinden in de bijlagen vanaf pagina 32.

Detectie van *E. amylovora* d.m.v. LAMP

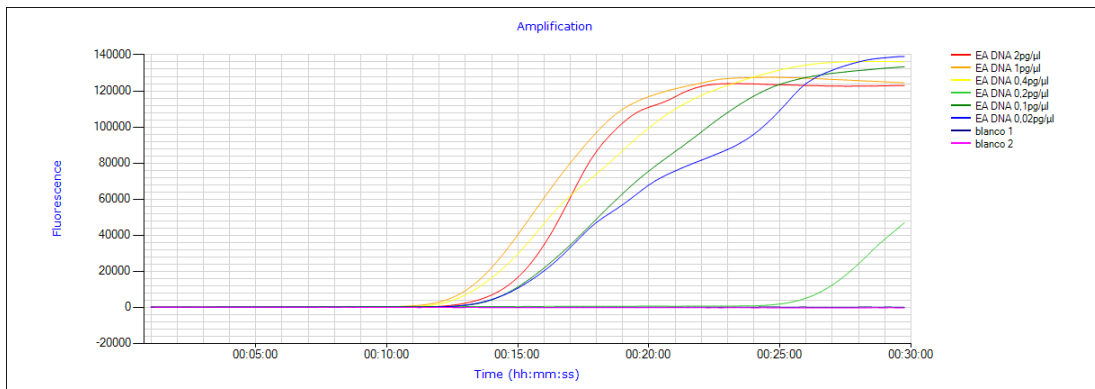
De detectie van *E. amylovora* kan op verschillende manier gebeuren. Eén van deze methodes is LAMP. Ondanks het terugkerend probleem van een *E. amylovora* contaminatie (zie paragraaf 'Controle afwezigheid contaminatie') werd LAMP toegepast op twee soorten DNA-stalen. Enerzijds DNA van een *E. amylovora* reïncultuur en anderzijds spiked stalen op DNA-niveau.

Bepaling detectielimiet van *E. amylovora* DNA afkomstig van een reïncultuur

De detectielimiet werd in eerste instantie bepaald voor zuiver DNA van *E. amylovora*. Er werd een LAMP-reactie uitgevoerd met een verdunningsreeks van DNA van *E. amylovora* gaande van 10 pg (2 pg/μl) tot en met 0,1 pg (0,02 pg/μl). Dit DNA werd geëxtraheerd door Saartje Swennen volgens

het aangepaste Khayat *et al.* (2004) protocol (Swennen, 2016).

Er is een duidelijke amplificatie zichtbaar vanaf ongeveer 12 min bij de stalen met een input van 10 pg; 5 pg; 2 pg; 0,5 pg en 0,1 pg *E. amylovora*-DNA (Figuur 3). Bij een input van 1 pg is er een kleine stijging van de curve te zien na 25 min. Dit is echter een atypisch resultaat aangezien de grotere verdunningen 0,5 pg (0,1 pg/μl) en 0,1 pg (0,02 pg/μl) wel een amplificatiecurve opleveren die start rond 15 min. Vermoedelijk komt dit doordat de detectielimiet rond een DNA-input van 1 pg ligt en er zich dan af en toe wel amplificatie voordoet bij een input die lager ligt. Wat wel opvalt is dat er bij 0,5 pg en 0,1 pg op hetzelfde moment amplificatie optreedt en dit terwijl de reactie van 0,1 pg vijf keer minder DNA bevat. Daarnaast vertoont de curve van 0,1 pg een knik ter hoogte van 20 à 25 min. Beide blanco's (TE-buffer) vertonen bovendien geen amplificatie en zijn dus zoals verwacht negatief wat de resultaten van deze LAMP-run betrouwbaar maakt. De dissociatiecurve van deze reactie is te vinden in de bijlagen op pagina 32.



Figuur 3: LAMP amplificatiecurve ter bepaling van de detectielimiet van *Erwinia amylovora* DNA afkomstig van een reïncultuur; X-as = tijd (u:min:s); Y-as = fluorescentieniveau; EA = *Erwinia amylovora*; aan elk staal werd 5 μl DNA toegevoegd; blanco = 5 μl primermix + 5 μl TE-buffer + 15 μl IsoThermal Mastermix

Bepaling detectielimiet spiked samples op DNA-niveau

Tijdens de vorige reacties werd er enkel DNA van *E. amylovora* toegevoegd aan de reactiemix. In de praktijk zal dit echter niet het geval zijn en zal de reactiemix ook DNA van het plantenmateriaal en eventuele onzuiverheden afkomstig van de cel of de DNA-extractieprocedure bevatten. Om deze situatie na te bootsen, werden de plantenstalen gespiket. Dit kan op twee manieren, nl. door het toevoegen van DNA van *E. amylovora* aan planten-DNA of door het toevoegen van *E. amylovora* bacteriën aan plantenmateriaal waarna er een DNA-extractie uitgevoerd wordt. Eerst werd de detectielimiet bepaald voor de stalen gespiket op DNA-niveau.

Tijdens deze LAMP-reacties werd op het oude probleem gestoten nl. één van de blanco's vertoonde een positief resultaat voor *E. amylovora*. Er werd besloten om een stap terug te zetten en LAMP-reacties uit te voeren die enkel plant-DNA bevatten. Ook hier vertoonden een aantal stalen (zowel blanco's als stalen met plant-DNA) een positief resultaat. Een resultaat wat natuurlijk niet zou mogen aangezien de reacties uitsluitend plant-DNA bevatten. Zelfs binnen technische herhalingen van een staal was er geen consistentie wat betreft het voorkomen van vals positieve resultaten. De resultaten van de belangrijkste LAMP-reacties zijn te vinden in de bijlagen op pagina 39. Op basis van deze resultaten werd besloten om het uitvoeren van het LAMP-gedeelte van deze bachelorproef on-hold te zetten.

Detectie van *E. amylovora* d.m.v. qPCR

Een tweede manier waarop de detectie van *E. amylovora* kan gebeuren is d.m.v. qPCR, een kwantitatieve methode. Allereerst werd er een standaardcurve van *E. amylovora*-DNA in TE-buffer opgesteld waarna het

qPCR-protocol getest werd op spiked samples (op DNA- en organismeniveau). Ten slotte werd de qPCR ook uitgevoerd op geïnfecteerde stalen.

Standaardcurve

Om de hoeveelheid *E. amylovora* in een staal te kunnen bepalen, werd er een standaardcurve opgesteld. Daarnaast kan op deze manier de detectielimiet bepaald worden voor zuiver DNA van *E. amylovora*. Er werd gebruik gemaakt van een tienvoudige verdunningsreeks met een bereik gaande van 750 ng/reactie tot en met 7,5 fg/reactie. De standaardcurve die bekomen werd heeft een correlatiecoëfficiënt van 0,9981 wat de lineariteit tussen de verdunningen aantoont (Figuur 4). De grootste verdunning (7,5 fg/reactie) werd niet geamplificeerd. Vermoedelijk is dit te wijten aan het feit dat de detectielimiet zich tussen een input van 75 fg per reactie en 7,5 fg per reactie bevindt. Voor het opstellen van de standaardcurve op Figuur 4 werd gebruik gemaakt van gemiddelde waarden van drie technische herhalingen. De originele standaardcurve met de onafhankelijke meetpunten geproduceerd door het toestel is te vinden in de bijlagen op pagina 41.

Bepaling detectielimiet spiked samples op DNA-niveau

Tijdens de vorige reactie werd er enkel zuiver DNA van *E. amylovora* toegevoegd aan de mastermix. Net zoals bij de LAMP-procedure werd dit qPCR-protocol ook getest op spiked stalen. Als eerste werd dit uitgevoerd met spiked samples op DNA-niveau. Een standaardcurve van *E. amylovora*-DNA in een achtergrond van peer-DNA werd bekomen door qPCR (Figuur 5). De correlatiecoëfficiënt die door middel van deze standaardcurve bekomen wordt, is relatief laag nl. 0,9231. Vanaf een input van 0,00001 ng of 10 fg werd de spreiding tussen de technische herhalingen groter, daarom bevat onderstaande standaardcurve slechts

de eerste zeven verdunningen. Daarnaast werden er ook twee outliers weggelaten (één technische herhaling van 5 ng en één technische herhaling van 0,05 ng). Vermoedelijk is dit te wijten aan het feit dat de pipet niet naar behoren functioneerde en niet altijd de volledige hoeveelheid vloeistof uitduwde. Een tweede mogelijke verklaring is dat het qPCR-toestel niet perfect het vooropgestelde temperatuurprofiel gevolgd heeft waardoor de annealing en amplificatie verstoord werden. Desalniettemin wordt uit deze figuur besloten dat de detectielimiet zich bevindt rond 0,1 pg *E. amylovora* DNA per reactie. Wanneer de reactie een kleinere hoeveelheid DNA bevat zijn de resultaten minder betrouwbaar aangezien de spreiding tussen de verschillende herhalingen groter wordt. Voor het opstellen van de standaardcurve in Figuur 5 werd gebruik gemaakt van gemiddelde waarden van drie technische herhalingen. De originele standaardcurve met de onafhankelijke meetpunten geproduceerd door het toestel is te vinden in de bijlagen op pagina 42.

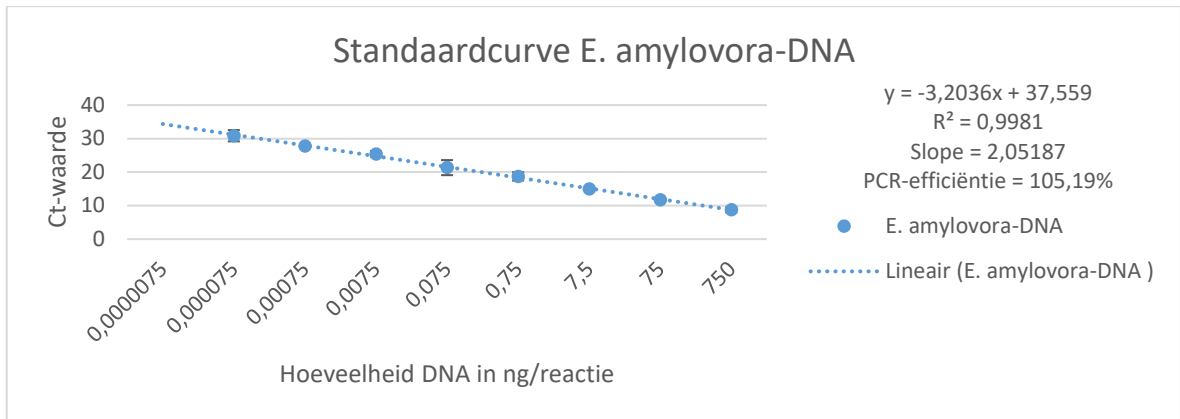
Bepaling detectielimiet spiked samples op organisme-niveau

In Figuur 6 is het resultaat te zien van de qPCR-reactie van spiked samples op organisme-niveau waarbij *E. amylovora* bacteriën werden toegevoegd aan het plantenmateriaal en vervolgens een DNA-extractie en qPCR werd uitgevoerd. De correlatiecoëfficiënt die door middel van de standaardcurve bekomen wordt is aan de relatief lage kant nl. 0,9456. Daarnaast is de standaardafwijking bij 10^3 CFU zeer groot, vermoedelijk is er hier een fout opgetreden tijdens het pipetteren. Vanaf een hoeveelheid van 1 CFU per reactie werd de spreiding tussen de technische herhalingen groter, daarom bevat onderstaande standaardcurve slechts de eerste zes verdunningen. Hieruit kan besloten worden dat de detectielimiet zich bevindt rond 10^1 CFU per reactie. Wanneer de reactie een kleinere hoeveelheid bacteriële cellen bevat

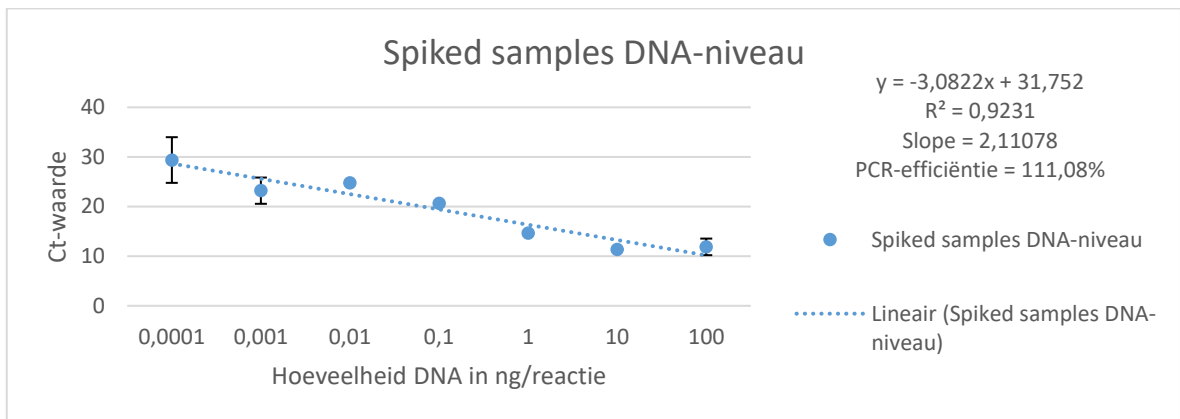
zijn de resultaten minder betrouwbaar aangezien de spreiding tussen de verschillende herhalingen groter wordt. Deze detectielimiet kan best geverifieerd worden door het herhalen van de reactie met meerdere herhalingen om zo een grotere correlatiecoëfficiënt te bekomen. Voor het opstellen van de standaardcurve op Figuur 6 werd gebruik gemaakt van gemiddelde waarden van drie technische herhalingen. De originele standaardcurve met de onafhankelijke meetpunten geproduceerd door het toestel is te vinden in de bijlagen op pagina 43.

Detectie van *E. amylovora* d.m.v. qPCR in geïnfecteerde stalen.

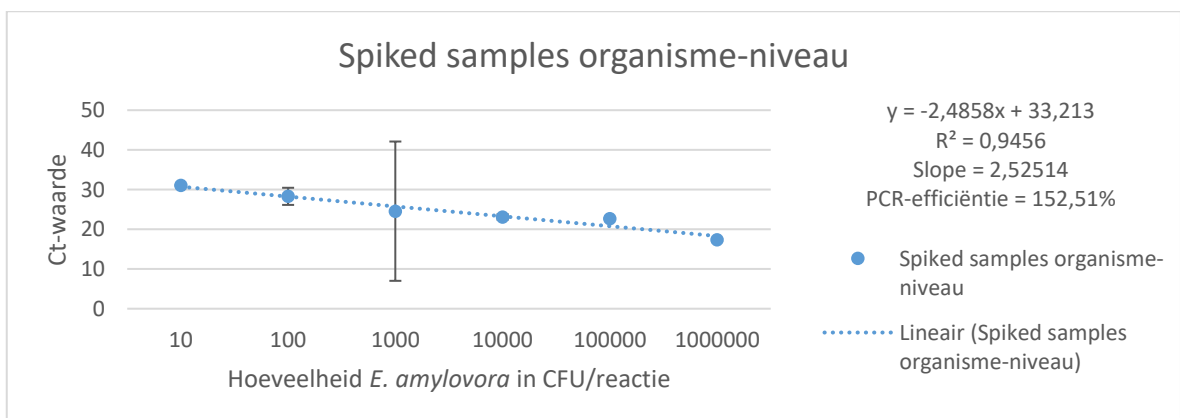
De laatste stap in het testen van het qPCR-protocol voor de detectie van *E. amylovora* tijdens dit thesiswerk was de reactie uitvoeren op kunstmatig *E. amylovora* geïnfecteerde stalen. Op de amplificatiecurve die tijdens deze qPCR-reactie bekomen werd, is er een zeer duidelijk amplificatie zichtbaar bij 6 van de 7 stalen (Figuur 7). Enkel bij staal 1 van bloemen na wassing trad er geen amplificatie op. Nochtans was er bij de staalname duidelijke necrose aanwezig van de bloemstelen, de meeldraden en het vruchtbeginsel, wat zou vermoeden dat er wel degelijk een bacterievuurinfectie aanwezig is. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat er een pipetteerfout optrad waardoor er dus geen DNA van dit staal werd toegevoegd aan de qPCR-reactie. Bovendien was dit staal ook vrij onzuiver ($A_{260}/A_{230} = 1,17$) waardoor het mogelijk te veel PCR-inhibitoren bevat. De bijhorende standaardcurve van zuiver *E. amylovora*-DNA met aanduiding van de geïnfecteerde stalen en de uitwerking om het aantal bacteriële cellen te bepalen is te vinden in de bijlagen op pagina 44. De waarden die bekomen werden voor de hoeveelheid bacteriële cellen lagen tussen $1,25 \times 10^6$ en $1,72 \times 10^7$ CFU per bloem.



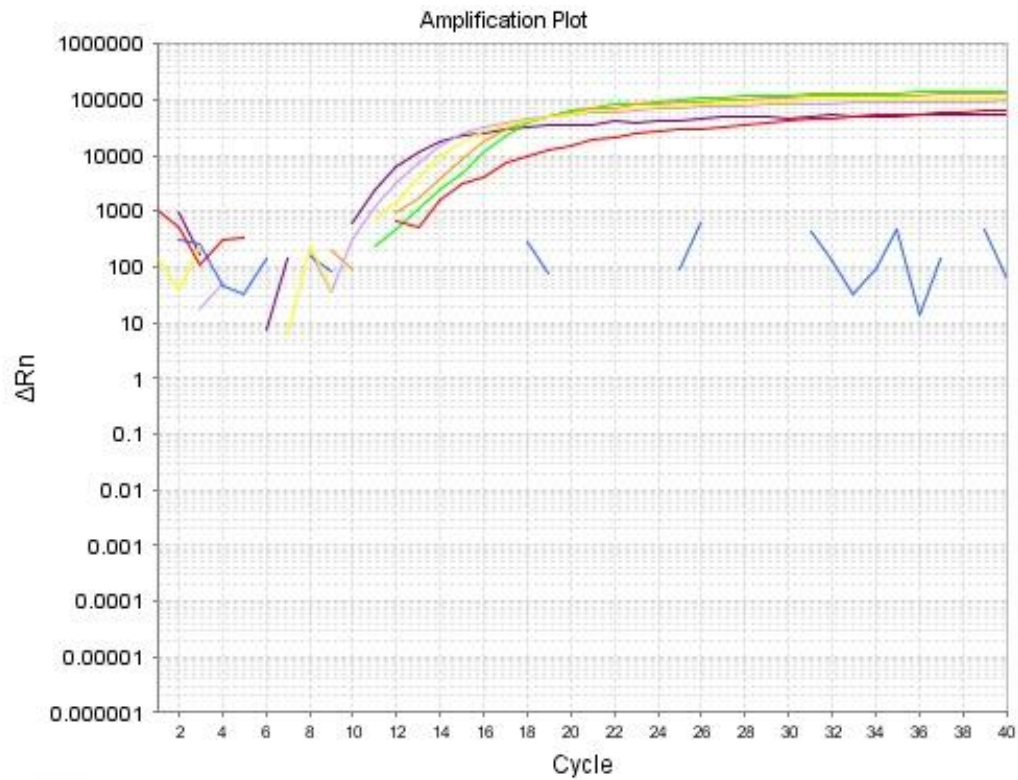
Figuur 4: qPCR standaardcurve van zuiver E. amylovora DNA met een startconcentratie van 750ng/reactie; elk punt is het gemiddelde (\pm standaardafwijking) van drie technische herhalingen; DNA van E. amylovora werd geëxtraheerd in 2016 (Swennen, 2016) volgens Cheng & Jiang (2006) met aanpassingen; Ea-Isc F en Ea Isc R primer gebruikt ter amplificatie van het levensucrase gen; X-as = DNA concentratie in ng/reactie; Y-as = Ct-waarde



Figuur 5: qPCR standaardcurve spiked samples E. amylovora DNA met een startconcentratie van 100ng/reactie en in een tienvoudige verdunningsreeks toegevoegd aan plant-DNA; elk punt is het gemiddelde (\pm standaardafwijking) van twee technische herhalingen; DNA van E. amylovora werd geëxtraheerd in 2016 (Swennen, 2016) volgens Cheng & Jiang (2006) met aanpassingen; DNA van 'Conférence' bloemen geëxtraheerd in 2017 volgens standaard CTAB-protocol; elke reactie bevat 3 μ l plant-DNA (5 ng/ μ l) en 2 μ l DNA van E. amylovora; Ea-Isc F en Ea Isc R primer gebruikt ter amplificatie van het levensucrase gen; X-as = hoeveelheid DNA in ng/reactie; Y-as = Ct-waarde



Figuur 6: qPCR standaardcurve spiked samples op organisme-niveau; E. amylovora bacteriën werden in een tienvoudige verdunningsreeks (10^6 tot en met 0,1CFU per reactie) toegevoegd aan 100mg Conférence bloem materiaal; zonder twee laatste verdunningen; elk punt is het gemiddelde (\pm standaardafwijking) van twee technische herhalingen; DNA van spiked samples geëxtraheerd volgens het standaard CTAB DNA-extractieprotocol; Ea-Isc F en Ea Isc R primer gebruikt ter amplificatie van het levensucrase gen; X-as = hoeveelheid E. amylovora in CFU per reactie; Y-as = Ct-waarde



Figuur 7: qPCR amplificatiecurves voor detectie van *E. amylovora* in kunstmatig *E. amylovora* geïnfecteerde bloemen van 'Conference' serre potbomen; Bloemen van potbomen werden geïnfecteerd met een *E. amylovora* suspensie (10^8 CFU/ml) en 6 (bloemen na wassing) en 7 (volledige bloemen) dagen later geoogst. Per staal werden 4 bloemen verzameld met verschillende gradaties in symptomen; DNA werd geïsoleerd met het standaard CTAB DNA-extractieprotocol; blanco = 5 μ l TE-buffer + 20 μ l mastermix; rood = staal 1 volledige bloemen; oranje = staal 2.2 volledige bloemen; geel = staal 3.1 volledige bloemen; groen = staal 4.2 volledige bloemen; blauw = staal 1 bloemen na wassing; licht paars = staal 3.2 bloemen na wassing; donkerpaars = staal 4.2 bloemen na wassing; X-as = cyclusnummer; Y-as = ΔRn

Algemene discussie

Controle afwezigheid contaminatie

Tijdens de bachelorproef van vorig jaar werd er op een probleem gestoten, er bleek een contaminatie van *E. amylovora* aanwezig te zijn in het labo. Dit kon gaan om bacteriële cellen, zijn DNA of een amplicon, met als gevolg dat alle negatieve controles van de LAMP-reacties toch een positief resultaat vertoonden. Voor aanvang van deze bachelorproef werd het labo gepoetst met een 1/10 verdunde javeloplossing [1,5% (w/v) NaClO]. Daarnaast werd er ook een PCR-kabinet aangekocht waarbij d.m.v. een UV-lamp het contaminerend DNA afgebroken kan worden (Cone and Fairfax, 1993).

Om de afwezigheid van contaminatie te verifiëren, werden er verschillende LAMP-reacties uitgevoerd. Maar vaak vertoonde één van de blanco's (geen matrijs DNA, enkel buffer) een positief en specifiek *E. amylovora* signaal. Na verschillende opties te hebben uitgeprobeerd, zoals nieuwe tips, buffers en een javelbehandeling, werd er toch een resultaat bekomen waarbij alle blanco's een negatief resultaat vertoonden.

Aangezien het qPCR-protocol ook deel uitmaakt van deze bachelorproef werd er een qPCR-reactie uitgevoerd met enkel blanco's. Deze reactie had het gewenste resultaat en er trad dan ook geen amplificatie op bij de negatieve controles. Om ervoor te zorgen dat dit in de toekomst ook nog het geval zou zijn, werd er gebruik gemaakt van Uracil N-glycosylase, bekend onder de commerciële naam AmpErase® (Gamboa *et al.*, 1998). Reeds aanwezige PCR-producten worden afgebroken waardoor er geen ampliconcontaminatie kan optreden en m.a.w. de negatieve controles ook negatief blijven.

DNA-extracties

Voor het uitvoeren van de LAMP- en qPCR-reacties is er nood aan zuiver DNA van zowel plantenstalen als van de bacterie *E. amylovora*. Daarom werd er een CTAB-protocol opgesteld op basis van twee bestaande protocollen. Dit protocol werd gebruikt voor de isolatie van DNA uit peerstalen. Deze stalen zijn niet-geïnfecteerde bloemen, kunstmatig geïnfecteerde bloemen en spiked stalen op organisme niveau. Wanneer de zuiverheid en concentratie van het geëxtraheerde DNA gemeten wordt, valt het op dat bij bijna alle stalen de waarde voor A260/A280 redelijk hoog is. Deze waarde bedraagt meestal ± 2 terwijl dit 1,8 zou moeten bedragen. Dit is te wijten aan de aanwezigheid van de RNA in de stalen. Om zeker te zijn dat dit afkomstig is van RNA kan het nuttig zijn om een agarosegelelektroforese uit te voeren of bij een volgende extractie de concentratie RNase te verhogen (Oxford Gene Technology, 2011).

Detectie van *E. amylovora* d.m.v.

LAMP

Bepaling detectielimiet reincultuur

De voorbije jaren is er al heel wat onderzoek gebeurd naar de detectie van *E. amylovora* d.m.v. LAMP. In een onderzoek van Temple & Johnson (2011) werd de detectielimiet van het LAMP-protocol bepaald. De detectie gebeurde d.m.v. het meten van de optische dichtheid van de gevormde de LAMP-producten.

De detectielimiet die in dat onderzoek bekomen werd, bedroeg 500 fg/ μ l oftewel 0,5 pg/ μ l (Temple and Johnson, 2011). Deze waarde ligt in de buurt van de 0,2 pg/ μ l die in deze bachelorproef bekomen werd. Hierbij moet wel de kanttekening gemaakt worden dat de detectie door middel van een intercalerende dye en een fluorescentiesignaal een stuk gevoeliger is dan het meten van optische dichtheid

waardoor het ook verwacht werd dat de detectielimiet van dit LAMP-protocol lager zou liggen.

Bepaling detectielimiet spiked samples op DNA-niveau

Tijdens het uitvoeren van de LAMP-reacties met gespikete stalen op DNA-niveau, werd op het oude probleem gestoten nl. één van de blanco's vertoonden een positief resultaat. Na overleg met het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO) bleek dat het voorkomen van vals positieve resultaten bij de LAMP-procedure wel vaker voorkomt en niet enkel bij *E. amylovora* maar ook bij de detectie van andere micro-organismen. Dit zou mogelijk te wijten zijn aan het achterblijven van pathogeen DNA op het deksel van het LAMP-toestel na een LAMP-reactie. Een optie die in de toekomst nog geprobeerd kan worden is het gebruik van microtubes zonder deze eerst te autoclavieren. De mogelijkheid bestaat namelijk dat de ampliconcontaminatie aanwezig is in de autoclaaf en op deze manier ervoor zorgt dat er positieve resultaten blijven opduiken.

Detectie van *E. amylovora* d.m.v. qPCR

Standaardcurve

Op basis van de standaardcurve kan al een eerste idee van de detectielimiet van deze methode verkregen worden. In een onderzoek van De Bellis *et al.* (2007) werd de detectielimiet bepaald van een tienvoudige verdunningsreeks van *E. amylovora*-DNA. De detectielimiet die hierbij bekomen werd bedroeg 1 pg per reactie voor Scorpion-PCR en 1 fg per reactie voor nested-Scorpion-PCR. De waarde die in deze bachelorproef bekomen werd, bevond zich tussen 75 fg (= 0,75 pg) en 7,5 fg. Ondanks dat dit een andere PCR-techniek is, kan wel besloten worden dat dit een plausibele uitkomst is. De PCR-efficiëntie van deze reactie bedroeg 105,19%. Dit is wat aan de hoge kant maar

ligt toch nog binnen de ideale waarden van 90%-110% (Taylor *et al.*, 2010).

Bepaling detectielimiet spiked samples op DNA-niveau

De detectielimiet die bekomen werd bij de qPCR-reactie van gespikete stalen op DNA-niveau bedroeg 0,1pg oftewel 100fg per reactie. Wanneer de detectielimiet van spiked samples vergeleken wordt met de literatuur, ligt deze tussen de waarden van 1 pg en 1 fg die bekomen werden als detectielimiet in het onderzoek van De Bellis *et al.* (2007) bij zuiver DNA van *E. amylovora*. In vergelijking met de detectielimiet van zuiver DNA van *E. amylovora* bekomen in deze bachelorproef, ligt de detectielimiet ietwat hoger bij de gespikete stalen (respectievelijk 75-7,5fg vs. 100 fg). Dit kan te wijten zijn aan de aanwezigheid van het planten-DNA dat mogelijk PCR-inhiberende componenten bevat. Dit heeft als gevolg dat de reactie minder gevoelig is en de detectielimiet dus hoger ligt. Ook de correlatiecoëfficiënt ligt een stukje lager (0,9231 vs. 0,9981, respectievelijk). Daarnaast is de PCR-efficiëntie hoger bij de gespikete stalen dan bij het zuiver DNA van *E. amylovora* (respectievelijk 111,08% vs. 105,19%). Dit is te wijten aan primerdimers of de vorming van niet-specifieke PCR-producten ten gevolge van de aanwezigheid van het plant-DNA (Taylor *et al.*, 2010).

Bepaling detectielimiet spiked samples op organisme-niveau

Een tweede manier waarop spiked samples tot stand kunnen komen is op organisme niveau. Er werd een qPCR-reactie uitgevoerd waarbij *E. amylovora* werd toegevoegd aan plantenstalen. Uit de standaardcurve die daarbij bekomen werd, kon afgeleid worden dat de detectielimiet zich bevindt rond 10^1 CFU/reactie. In een onderzoek van Pirc *et al.* (2009) werd er reeds de detectielimiet bepaald van verschillende qPCR-assays waarbij gebruik werd gemaakt van spiked samples. De detectielimiet die hierbij

bekomen werd bedroeg 4 CFU/reactie wat ietwat lager ligt dan de 10^1 CFU/reactie die in deze bachelorproef bekomen werd. Wanneer deze standaardcurve vergeleken wordt met de standaardcurve van zuiver *E. amylovora*-DNA, valt vooral op dat er een minder grote stijging is tussen de Ct-waardes van de kleinste en grootste verdunning. Dit kan te wijten zijn aan de aanwezigheid van het plant-DNA-extract dat mogelijk PCR-inhiberende componenten bevat. Een andere mogelijke oorzaak hiervan is dat de DNA-extractie van de spiked samples niet bij elk staal exact hetzelfde verloopt en er dus variatie gecreëerd wordt. Daarnaast is de PCR-efficiëntie ook heel wat hoger bij de gespikete stalen op organismeniveau dan bij de gespikete stalen op DNA-niveau het zuiver DNA van *E. amylovora* (respectievelijk 152,51% vs. 111,08% vs. 105,19%). Dit is te wijten aan primerdimers of de vorming van niet-specifieke PCR-producten ten gevolge van de aanwezigheid van het plant-DNA (Taylor *et al.*, 2010). Vanaf een hoeveelheid van 4×10^3 CFU per bloem treedt er symptoomontwikkeling op, waarbij vanaf 10^5 CFU per bloem de symptomen duidelijk zichtbaar zijn in de boomgaard (S. Remy, persoonlijke mededeling). Aangezien de detectielimiet zich hier bevindt rond een hoeveelheid van 10^1 CFU per bloem (er werd telkens 1 bloem gespiket), kan besloten worden dat het mogelijk zou zijn om *E. amylovora* te detecteren alvorens er symptomen opduiken. Hierbij moet wel de kanttekening gemaakt worden dat 10^1 CFU een zeer lage detectielimiet is en dat de reactie best herhaald wordt met meerdere technische herhalingen.

Detectie van *E. amylovora* d.m.v. qPCR in geïnfecteerde stalen

Wanneer de qPCR-reactie wordt uitgevoerd op geïnfecteerde stalen valt meteen dat er een duidelijke amplificatie optrad bij 6 van de 7 stalen. Een onderzoek van Salm & Geider (2004) bewees eerder al dat het mogelijk is om *E. amylovora* te detecteren

d.m.v. qPCR. In dit artikel werd ook de overeenkomende hoeveelheid bacteriële cellen bepaald. De waarden die hiervoor bekomen werden, lagen tussen $0,4 \times 10^7$ en $3,0 \times 10^7$ bacteriële cellen per bloem. De in deze bachelorproef bekomen waarden lagen tussen $1,25 \times 10^6$ en $1,72 \times 10^7$ bacteriële cellen per bloem. Hieruit kan dus besloten worden dat dit een plausibel resultaat is. De hoogste concentraties aan bacteriële cellen werden gemeten in stalen waarbij er duidelijk slijmdruppels aanwezig zijn, maar er nog geen necrose is opgetreden. Wat daarnaast ook opviel is dat er een groot aantal bacteriële cellen aanwezig was op bloemstalen waarbij geen duidelijke symptomen zichtbaar waren. Mogelijk is dit te wijten aan het feit dat de stalen genomen zijn net op het moment voor dat er infectiesymptomen zichtbaar zouden zijn. Een andere verklaring is dat er kruiscontaminatie optrad tijdens de DNA-extractie van de verschillende geïnfecteerde stalen.

Op basis van bovenstaande resultaten kan besloten worden dat het qPCR-protocol momenteel het meest geschikt is voor de detectie van *E. amylovora*. In een volgend onderzoek kan het handig zijn om de standaardcurves van gespikete stalen te optimaliseren zodat hier een hogere correlatiecoëfficiënt bekomen wordt.

Conclusie

De eerste specifieke doelstelling was het optimaliseren van het DNA-extractie-protocol. Er werd een DNA-extractieprotocol op basis van CTAB en fenol:chloroform: isoamylalcohol opgesteld wat zorgt voor DNA-stalen met een hoge kwaliteit en opbrengst. De tweede specifieke doelstelling was om na te gaan of de contaminatie nu effectief verdwenen was. Uiteindelijk lukte het om een LAMP-reactie uit te voeren waarbij alle negatieve controles negatief

bleven. De derde specifieke doelstelling was het testen van LAMP en qPCR voor *E. amylovora* detectie. Omwille van blijvende problemen met vals positieve resultaten is het LAMP-protocol momenteel nog niet geschikt voor detectie van *E. amylovora*. qPCR daarentegen is wel zeer geschikt voor de detectie en kwantificatie van *E. amylovora* en dit in zuivere DNA-stalen van de bacterie, spiked stalen en geïnfecteerde stalen.

Bibliografie

- Aerts, A.-S., Fransen, J., Karabayir, B., Landuyt, N., Thys, N. and Van Gestel, D. (2016) *Optimalisatie van DNA-extractie uit appel- en peer bloem(bot)stalen (voor detectie van Pseudomonas syringae pv. syringae)*. PXL.
- De Bellis, P., Schena, L. and Cariddi, C. (2007) 'Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of Erwinia amylovora on pear leaves and flowers', *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), pp. 11–22. doi: 10.1007/s10658-006-9078-4.
- Bereswill, S., Jock, S., Bellemann, P. and Geider, K. (1998) 'Identification of Erwinia amylovora by Growth Morphology on Agar Containing Copper Sulfate and by Capsule Staining with Lectin', *Plant Disease*, 82(2), pp. 158–164.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K. (1992) 'Sensitive and Species-Specific Detection of Erwinia amylovora by Polymerase Chain Reaction Analysis', *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 58(11), pp. 3523–3526.
- Bühlmann, A., Pothier, J. F., Rezzonico, F., Smits, T. H. M., Andreou, M., Boonham, N., Duffy, B. and Frey, J. E. (2013) 'Erwinia amylovora loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight', *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 92(3), pp. 332–339. doi: 10.1016/j.mimet.2012.12.017.
- Cheng, H.-R. and Jiang, N. (2006) 'Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts', *Biotechnology Letters*, 28, pp. 55–59. doi: 10.1007/s10529-005-4688-z.
- Coburn, B., Sekirov, I. and Finlay, B. B. (2007) 'Type III secretion systems and disease.', *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology (ASM), 20(4), pp. 535–49. doi: 10.1128/CMR.00013-07.
- Cone, R. W. and Fairfax, M. R. (1993) 'Protocol for Ultraviolet Irradiation of Surfaces to Reduce PCR Contamination', *Cold Spring Harbor Laboratory*, p. 4. Available at: <http://genome.cshlp.org/content/3/3/S15.full.pdf> (Accessed: 8 May 2017).
- Eastgate, J. A. (2000) 'Erwinia amylovora: the molecular basis of fireblight disease', *Molecular Plant Pathology*, 1(6), pp. 325–329. doi: 10.1046/j.1364-3703.2000.00044.x.
- Edmunds, A. C., Castiblanco, L. F., Sundin, G. W. and Waters, C. M. (2013) 'Cyclic Di-GMP modulates the disease progression of erwinia amylovora', *Journal of Bacteriology*, 195(10), pp. 2155–2165. doi: 10.1128/JB.02068-12.
- Eiken Genome Site (no date) *The principle of LAMP method*. Available at: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/> (Accessed: 7 May 2017).
- EPPO (no date) *European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)*. Available at: https://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/about_eppo.htm (Accessed: 30 March 2017).
- Gamboa, F., Manterola, J. M., Lonca, J., Matas, L., Cardona, P. J., Padilla, E., Viñado, B., Domínguez, J., Hernández, A. and Ausina, V. (1998) 'Comparative evaluation of two commercial assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Springer-Verlag, 17(3), pp. 151–157. doi: 10.1007/BF01691110.
- Gorris, M. T., Cambra, M., Llop, P., López, M. M., Lecomte, P., Chartier, R. and Paulin, J.-P. (1996) 'A sensitive and specific detection of Erwinia amylovora based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies', *Acta Horticulturae*, (411), pp. 41–46. doi: 10.17660/ActaHortic.1996.411.10.
- Holtappels, M. (2015) *Virulence of the plant pathogen Erwinia amylovora: a proteomic*

approach. UHasselt.

Hueck, C. J. (1998) 'Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 62(2), pp. 379–433. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618447> (Accessed: 4 June 2017).

Iwamoto, T., Sonobe, T. and Hayashi, K. (2003) 'Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M.', *Journal of clinical microbiology*, 41(6), pp. 2616–2622. doi: 10.1128/JCM.41.6.2616.

Johnson, K. B., Stockwell, V. O., McLaughlin, R. J., Sugar, D., Loper, J. E. and Roberts, R. G. (1993) 'Effect of Antagonistic Bacteria on Establishment of Honey Bee-Dispersed Erwinia amylovora in Pear Blossoms and on Fire Blight Control', *Phytopathology*, 83(9), pp. 995–1002. Available at: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n09_995.PDF (Accessed: 4 June 2017).

Khayat, E., Duvdevani, A., Lahav, E. and Ballesteros, B. A. (2004) 'Somaclonal variation in banana (Musa acuminata cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency and application', *Science Publishers Inc*.

Koczan, J. M., Mcgrath, M. J., Zhao, Y. and Sundin, G. W. (2009) 'Contribution of Erwinia amylovora Exopolysaccharides Amylovoran and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity', 99(11).

Koczan, J., McGrath, M., Sundin, G. W. and Zhao, Y. (2008) 'BIOFILM FORMATION IN ERWINIA AMYLOVORA: IMPLICATIONS IN PATHOGENICITY', *Acta Horticulturae*, (793), pp. 67–71. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.793.6.

Lehman, S. M., Kim, W.-S., Castle, A. J. and Svircev, A. M. (2008) 'Duplex real-time polymerase chain reaction reveals competition between Erwinia amylovora and E-pyrifoliae on pear blossoms', *Phytopathology*, 98(6), pp. 673–679. doi: 10.1094/PHYTO-98-6-0673.

McLaughlin, R. J., Chen, T. A. and Wells, J. M. (1989) 'Monoclonal antibodies against Erwinia amylovora: characterization and evaluation of a mixture for detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Phytopathology*, 79, pp. 610–613.

New England BioLabs (no date) *Isothermal Amplification*. Available at: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr/isothermal-amplification> (Accessed: 17 May 2017).

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) 'Loop-mediated isothermal amplification of DNA', *Nucleic Acids Research*, 28(12).

Oxford Gene Technology (2011) *Understanding and measuring variations in DNA sample quality*. Available at: https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality (Accessed: 14 May 2017).

Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S. and Tomás, J. M. (2015) 'Virulence Factors of Erwinia amylovora: A Review', *Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci*, 16, pp. 12836–12854. doi: 10.3390/ijms160612836.

Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. and Dreo, T. (2009) 'Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of Erwinia amylovora chromosomal DNA', *Plant Pathology*, 58(5), pp. 872–881. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02083.x.

Prince, A. M. and Andrus, L. (1992) 'PCR: how to kill unwanted DNA.', *BioTechniques*, 12(3), pp. 358–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1571142> (Accessed: 4 May 2017).

- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P. and Costa, J.-M. (2003) 'Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes', *BMC Infectious Diseases*, 3(7). Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/7> (Accessed: 25 May 2017).
- Salm, H. and Geider, K. (2004) 'Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight', *Plant Pathology*. Blackwell Science Ltd, 53(5), pp. 602–610. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01066.x.
- Schoofs, H. and Deckers, T. (2013) 'De bestrijdingsstrategie van bacterievuur', *Fruittelnieuws*, October, pp. 4–7.
- Schoofs, H. and Deckers, T. (2014) 'De ziektecyclus van bacterievuur', *Fruittelnieuws*, May, pp. 26–28.
- Smits, T. H. M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E. and Duffy, B. (2010) 'Complete Genome Sequence of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and Comparison to Other *Erwinia* spp', *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 384(4), pp. 384–393. doi: 10.1094.
- Swennen, S. (2016) *Optimalisatie LAMP-protocol voor detectie van bacterievuur*. Hogeschool PXL.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. and Nguyen, M. (2010) 'A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines', *Methods*, 50(4), pp. S1–S5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- Temple, T. N. and Johnson, K. B. (2011) 'Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of *Erwinia amylovora* on Pear and Apple Fruit Flowers', *Plant Disease*, 95(4), pp. 423–430. doi: 10.1094/PDIS-09-10-0636.
- The Pennsylvania State University (2017) *Fire Blight Disease Cycle*. Available at: <http://extension.psu.edu/plants/gardening/fphg/pome/diseases/fire-blight/disease-cycle> (Accessed: 18 March 2017).
- Vanneste, J. L. (2000) *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia Amylovora*. Wallingford: CABI.
- Wilcox, W. F. (1994) 'Fire Blight', p. 4.
- Zhao, Y. (2016) *Understanding the regulatory circuit of type III secretion system in Erwinia amylovora - UNIVERSITY OF ILLINOIS, United States Department of Agriculture*. Available at: <http://portal.nifa.usda.gov/web/crisproject/pages/1008448-understanding-the-regulatory-circuit-of-type-iii-secretion-system-in-erwinia-amylovora.html> (Accessed: 7 February 2017).

Figurenlijst

Figuur 1: Principe Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	6
Figuur 2: LAMP amplificatiecurve van de controle van de afwezigheid van ampliconcontaminatie met enkel buffer in de mastermix en geen template-DNA	12
Figuur 3: LAMP amplificatiecurve ter bepaling van de detectielimiet van <i>Erwinia amylovora</i> DNA afkomstig van een reïncultuur	13
Figuur 4: qPCR standaardcurve van zuiver <i>E. amylovora</i> DNA	16
Figuur 5: qPCR standaardcurve spiked samples <i>E. amylovora</i> DNA	16
Figuur 6: qPCR standaardcurve spiked samples op organisme-niveau	16
Figuur 7: qPCR amplificatiecurves voor detectie van <i>E. amylovora</i> in kunstmatig <i>E. amylovora</i> geïnfecteerde bloemen van 'Conference' serre potbomen	17

Tabellenlijst

Tabel 1: Overzicht gebruikte primers voor de amplificatie van <i>Erwinia amylovora</i> DNA d.m.v. LAMP	10
Tabel 2: Overzicht gebruikte primers voor de amplificatie van <i>Erwinia amylovora</i> DNA d.m.v. qPCR	10
Tabel 3: Overzicht spectrofotometrisch bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol	12

Bijlagen

Bijlage 1: Foto's kunstmatige infectie

Op onderstaande foto's is het effect zichtbaar van de kunstmatige infectie van Conférence bomen, gaande van het moment voor infectie tot na de staalname.



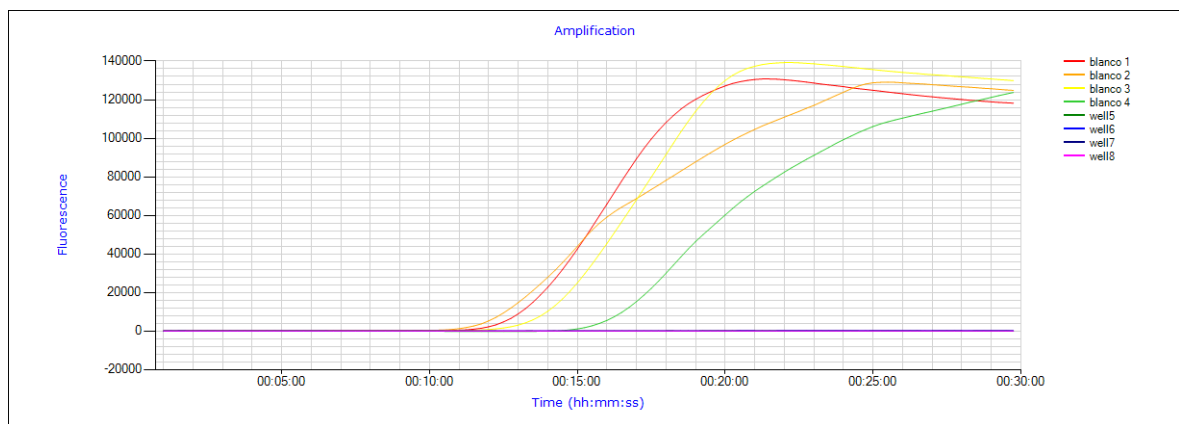
Figuur 8: Proces kunstmatige infectie Conférence perenbomen

Een aantal resultaten zijn te uitgebreid om te vermelden in het resultatenhoofdstuk van dit artikel. Deze worden hieronder weergegeven.

Bijlage 2: Uitgebreide resultaten

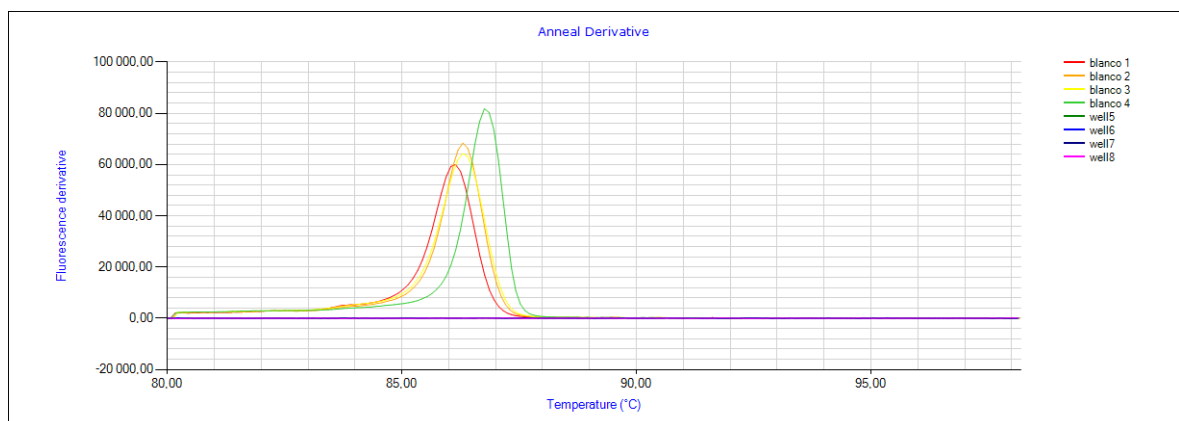
Controle afwezigheid contaminatie

Tijdens de vorige bachelorproef werd er op een probleem gestoten, er was nl. een contaminatie aanwezig in het quarantainelabo. Om er zeker van te zijn dat de contaminatie nu verdwenen was, werd er een LAMP uitgevoerd met enkel blanco's. Deze bevatten 5 μ l primermix en 15 μ l IsoThermal Mastermix van OptiGene. Op Figuur 9 is het resultaat te zien van deze reactie. Op deze figuur is een duidelijke amplificatie zichtbaar van alle vier de stalen vanaf 10 minuten. Dit wijst op de aanwezigheid van *E. amylovora* in de stalen. M.a.w. de contaminatie was nog aanwezig. Well 5 tot en met 8 was leeg.



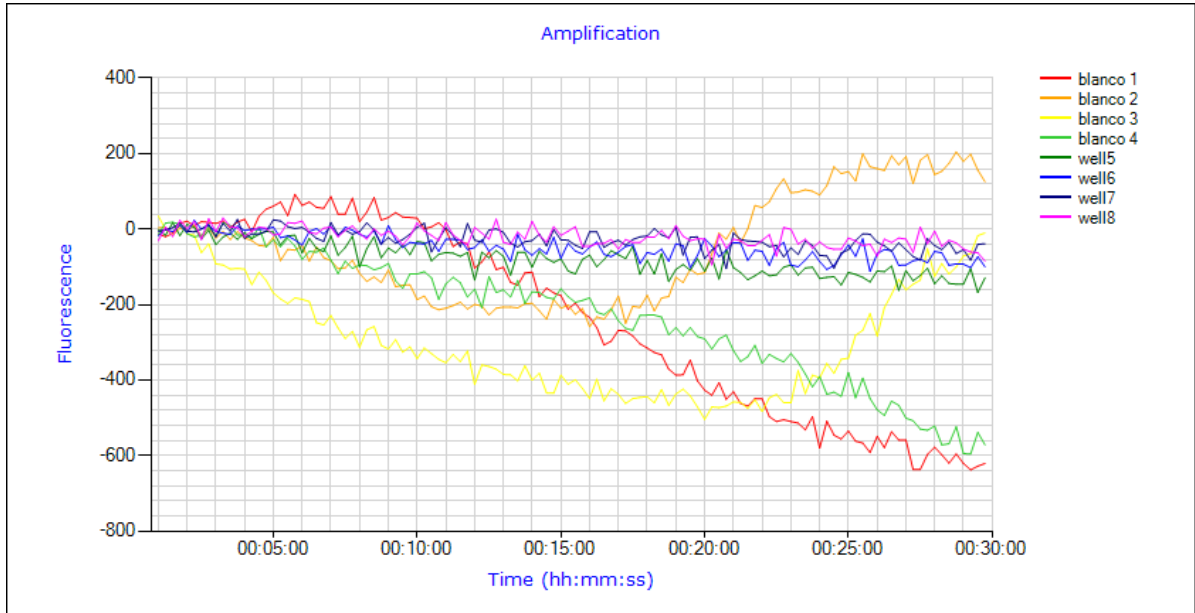
Figuur 9: Amplificatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 1; X-as = tijd, Y-as = fluorescentieniveau Well 1-4: blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l isothermal mastermix; Well 5-8 zijn leeg

Op Figuur 10 is de dissociatiecurve van deze LAMP-reactie te zien. Er is een duidelijke piek waarneembaar bij ongeveer 86°C wat de aanwezigheid van *E. amylovora* in het staal bevestigt.



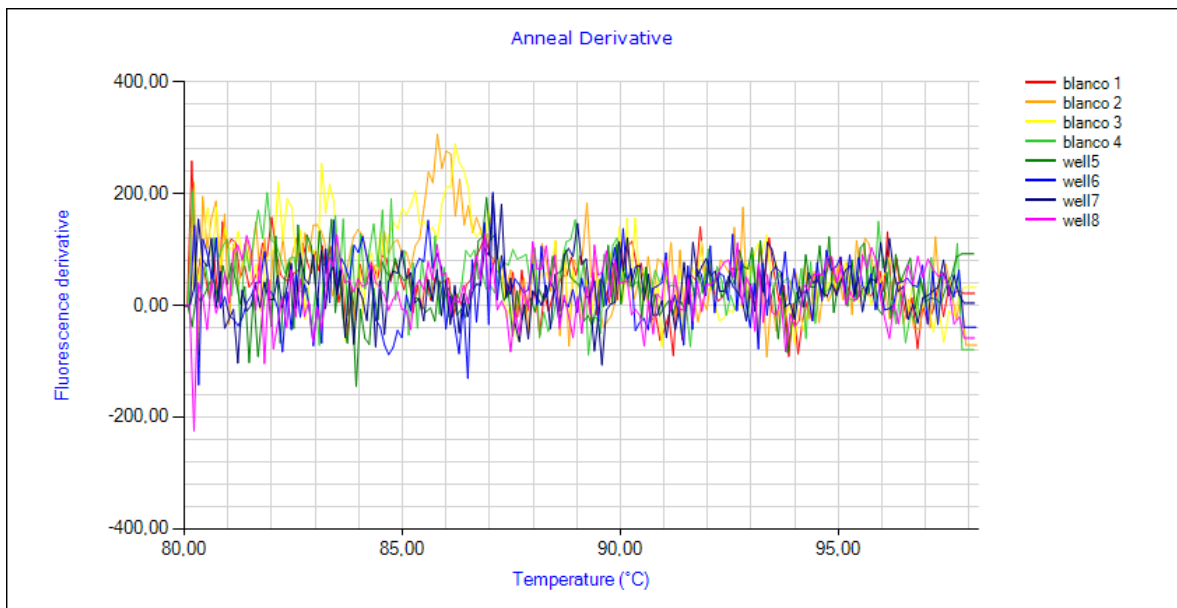
Figuur 10: Dissociatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 1; X-as = temperatuur, Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; Well 1-4: blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l isothermal mastermix; Well 5-8: leeg

Omdat in de vorige LAMP-reactie gebruik gemaakt werd van de werkoplossingen van de primers van vorig jaar, werd er besloten om nieuwe werkoplossingen te maken. Deze primers werden gebruikt in dezelfde LAMP-reactie als hierboven. Op Figuur 11 is het resultaat te zien van deze reactie. Op deze figuur is er een kleine amplificatie zichtbaar van blanco 2 en blanco 3 vanaf 20 minuten. Blanco 1 en 4 zijn volledig negatief. Well 5 tot en met 8 was leeg.



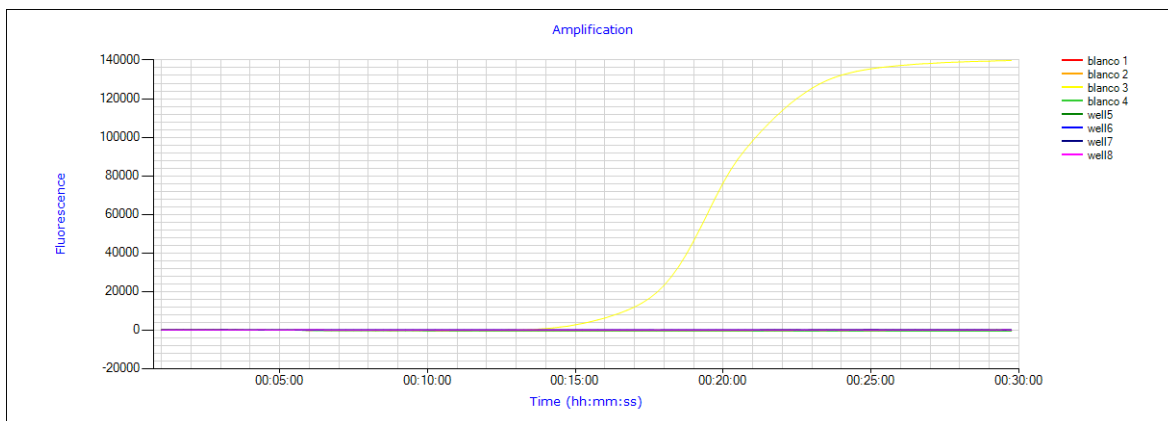
Figuur 11: Amplificatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 2; X-as = tijd, Y-as = fluorescentieniveau Well 1-4: Blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l isothermal mastermix; Well 5-8: leeg

Op de dissociatiecurve was er een kleine verhoging van de curve te zien ter hoogte van 86°C bij de stalen blanco 2 en blanco 3. De stalen blanco 1 en blanco 4 vertonen geen verhoging. De dissociatiecurve is te zien op Figuur 12.



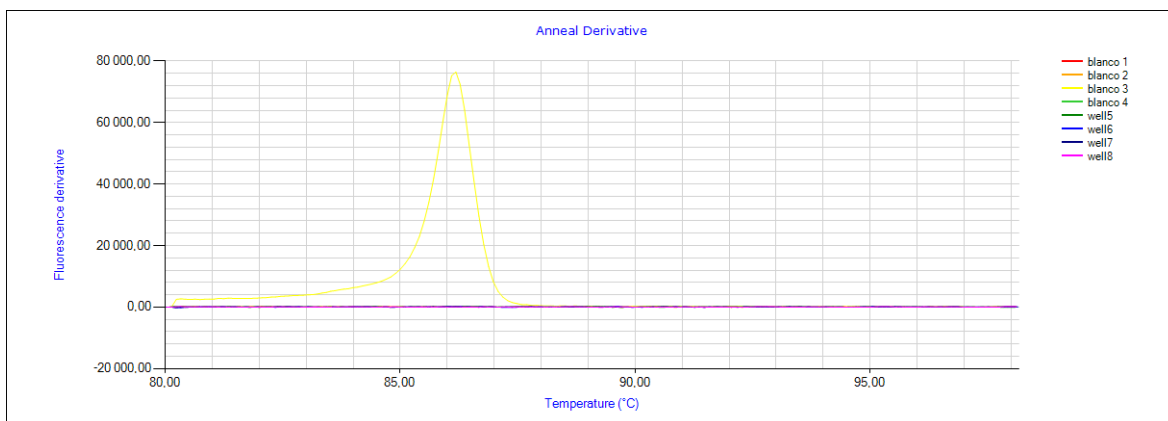
Figuur 12: Dissociatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 2; X-as = temperatuur, Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; Well 1-4: blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l Isothermal mastermix; Well 5-8: leeg

Om zeker te zijn dat deze kleine amplificatie niet het gevolg zou zijn van contaminatie, werd bovenstaande LAMP-reactie nog eens opnieuw uitgevoerd met dezelfde werkoplossingen van de primers. Het resultaat hiervan is te zien op Figuur 13. Op deze figuur is er een duidelijke amplificatie te zien van blanco 3 vanaf 15 à 20 min. Dit wijst dus op de aanwezigheid van *E. amylovora* in het staal, er is dus m.a.w. contaminatie aanwezig. Blanco 1, 2 en 4 zijn negatief. Well 5 tot en met 8 was leeg.



Figuur 13: Amplificatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 3; X-as = tijd, Y-as = fluorescentieniveau
Well 1-4: Blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l isothermal mastermix; Well 5-8: leeg

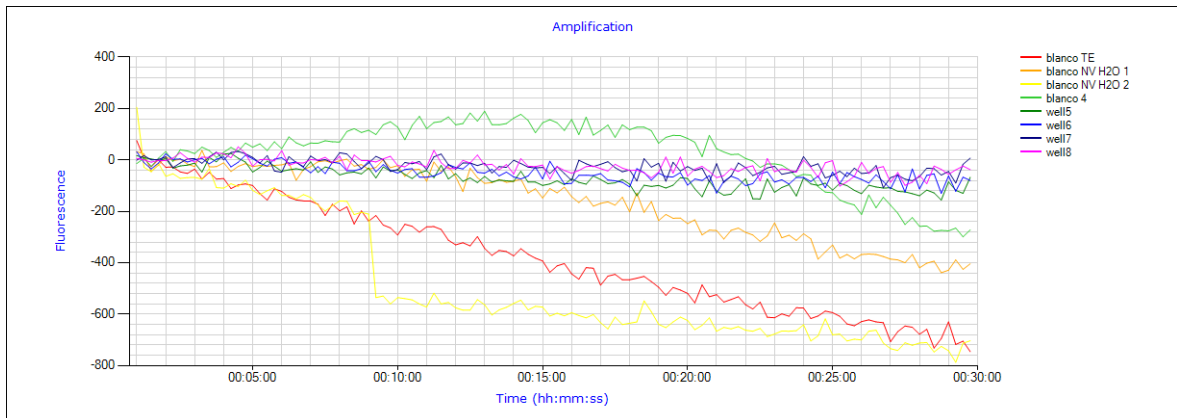
Op de dissociatiecurve is er bij blanco 3 een duidelijke piek waarneembaar bij 86°C wat de aanwezigheid van *E. amylovora* in het staal bevestigt. Blanco 1,2 en 4 vertonen geen piek. De dissociatiecurve is te zien op Figuur 14.



Figuur 14: Dissociatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 3; X-as = temperatuur, Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; Well 1-4: Blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l isothermal mastermix; Well 5-8: leeg

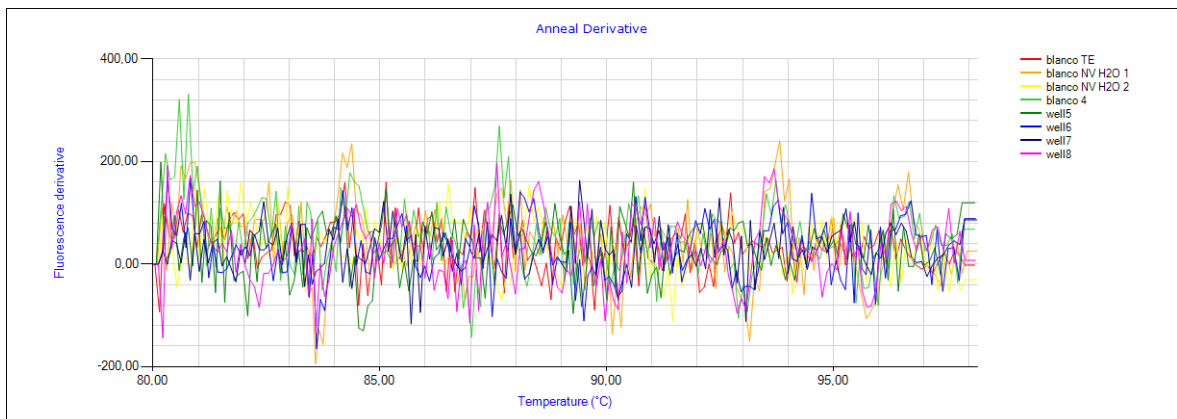
Bij de vorige LAMP-reacties werd er telkens gebruik gemaakt van een reactiemengsel dat enkel primermix en IsoThermal Mastermix bevatte. Bij een standaard LAMP-reactie wordt er hier dan nog een bepaalde hoeveelheid template-DNA toegevoegd, of in het geval van een negatieve controle een buffer (de buffer of de vloeistof waarin het template-DNA is opgelost). Om dit scenario uit te testen werd er een LAMP-reactie uitgevoerd waarbij er TE-buffer en nucleasevrij water werd toegevoegd aan de master- en primermix.

Op Figuur 15 is het resultaat te zien van deze LAMP-reactie. Zoals te zien op de figuur heeft er nergens amplificatie plaatsgevonden, buiten een lichte stijging van blanco 4, wat erop wijst dat er geen *E. amylovora* aanwezig is in de wells. Well 5 tot en met 8 was leeg.



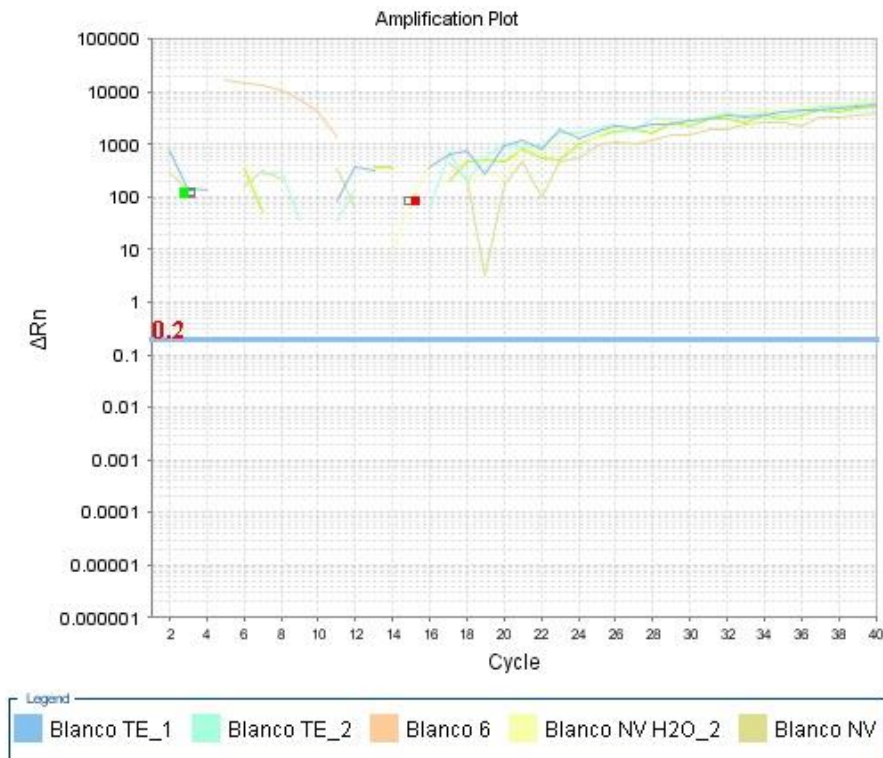
Figuur 15: Amplificatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 2 buffers; X-as = tijd; Y-as = fluorescentieniveau; blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l IsoThermal Mastermix; Well 1: blanco met TE-buffer; Well 2: blanco met nucleasevrij H₂O dat ook gebruikt werd voor de primermix; Well 3: blanco met nucleasevrij H₂O (epje nog niet geopend); Well 4: blanco enkel bestaande uit 5 μ l primermix en 15 μ l IsoThermal Mastermix; Well 5-8: leeg

Op de dissociatiecurve is er bij geen enkele temperatuur een piek waarneembaar wat de afwezigheid van *E. amylovora* bevestigt. De kleine verhoging van de curve van blanco vier is dus verwaarloosbaar. De dissociatiecurve is te zien op Figuur 16.



Figuur 16: Dissociatiecurve controle afwezigheid contaminatie poging 2 buffers; X-as = temperatuur; Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; blanco = 5 μ l primermix + 15 μ l IsoThermal Mastermix; Well 1: blanco met TE-buffer; Well 2: blanco met nucleasevrij H₂O dat ook gebruikt werd voor de primermix; Well 3: blanco met nucleasevrij H₂O (epje nog niet geopend); Well 4: blanco enkel bestaande uit 5 μ l primermix en 15 μ l IsoThermal Mastermix; Well 5-8: leeg

Aangezien het qPCR-protocol ook een deel van deze bachelorproef is, werd er ook bij dit toestel een reactie uitgevoerd om de aan- of afwezigheid van contaminatie van *E. amylovora* te bevestigen. Op Figuur 17 is de amplificatiecurve te zien van de qPCR-reactie die uitgevoerd werd met verschillende blanco's. Zoals te zien op deze figuur heeft er bij geen enkel staal amplificatie opgetreden waaruit geconcludeerd kan worden dat er geen *E. amylovora* aanwezig was in de stalen en er dus geen contaminatie is.

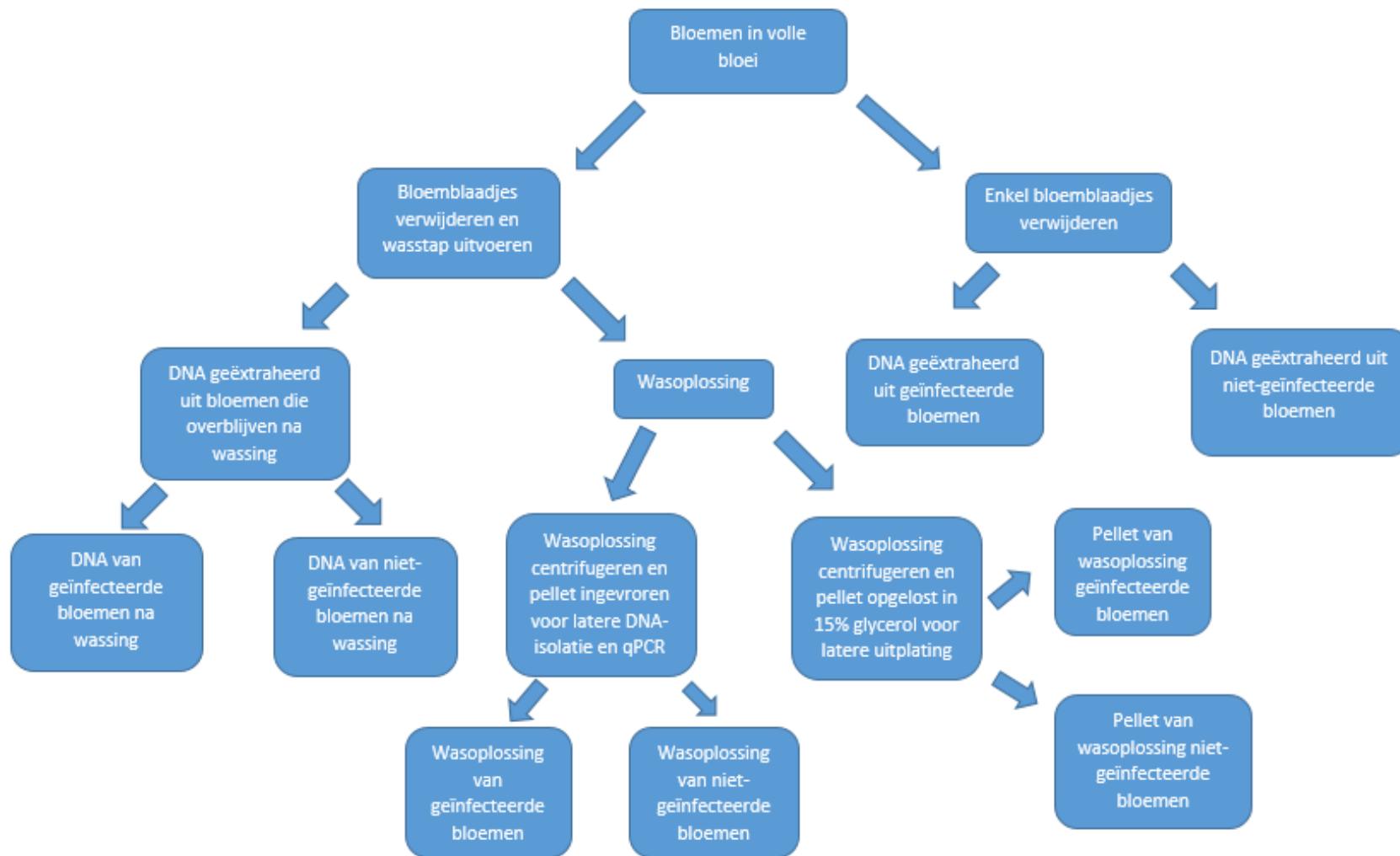


Figuur 17: Amplificatieplot controle afwezigheid qPCR; X-as = cyclusnummer; Y-as = ΔRn ; Blanco TE= mastermix met TE-buffer; Blanco NV H2O = mastermix met nucleasenvrij water Blanco 6 = enkel mastermix

DNA-extractie plantenmateriaal volgens standaard CTAB-protocol

Om de LAMP en qPCR-reacties uit te kunnen voeren is er nood aan DNA-stalen zowel van planten als van de pathogeen *E. amylovora*. Daarom werd er een DNA-isolatie uitgevoerd van verschillende stalen waarbij er gebruik gemaakt werd van een standaard CTAB-DNA-extractieprotocol gebaseerd op Khayat *et al.* (2004).

Op onderstaande figuur (Figuur 18) is een schematische voorstelling te zien van de verschillende DNA-stalen die bekomen werden.



Figuur 18: Schematische voorstelling DNA-stalen

Om het plantenmateriaal te spiken op DNA-niveau werd er DNA geëxtraheerd uit plantenstalen die niet kunstmatig werden geïnfecteerd. De kroonbladeren en meeldraden werden verwijderd waarna het bloempje gewassen werd met een wasbuffer en het DNA geëxtraheerd werd uit het bloempje dat overbleef na wassing. In Tabel 4 zijn de spectrofotometrische resultaten te zien van deze DNA-isolatie.

Tabel 4: Overzicht spectrofotometrische bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 24/4/2017 na wassing en dissectie van bloemen; de stalen (1,2,3 en 4) zijn afkomstig van proef 17PERwiAmConfSerreRes07; staal 1,2,3 en 4 werden telkens na homogenisatie onderverdeeld in meerdere substalen; elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waardes zijn de gemiddeldes van elke meting

Staal	Concentratie (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Staal 1.1	123,28	1,96	1,85
Staal 1.2	150,20	2,00	2,09
Staal 1.3	182,30	1,99	2,10
Staal 2.1	120,88	2,02	2,12
Staal 2.2	141,91	2,00	2,08
Staal 2.3	85,15	2,01	2,13
Staal 3.1	111,47	2,10	2,27
Staal 3.2	109,31	2,12	2,36
Staal 3.3	97,89	2,06	2,22
Staal 4.1	192,06	2,05	2,22
Staal 4.2	109,71	2,06	2,19
Staal 4.3	165,44	2,04	2,20

Als extra spiking-stalen werd er ook DNA geëxtraheerd uit plantenstalen die niet kunstmatig werden geïnfecteerd en waarbij de kroonbladeren werden verwijderd. Hier werd er geen spoeling uitgevoerd. In Tabel 5 zijn de spectrofotometrische resultaten te zien van deze DNA-isolatie.

Tabel 5: Overzicht spectrofotometrische bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 26/4/2017 na dissectie van bloemen; de stalen (1,2,3 en 4) zijn afkomstig van proef 17PERwiAmConfSerreRes07; staal 1,2,3 en 4 werden telkens na homogenisatie onderverdeeld in meerdere substalen; elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waardes zijn de gemiddeldes van elke meting

Staal	Concentratie (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Staal 1.1	397,84	1,95	2,03
Staal 1.2	447,88	1,98	2,10
Staal 1.3	366,44	2,01	2,12
Staal 2.1	419,26	1,99	2,13
Staal 2.2	276,74	2,01	2,10
Staal 2.3	441,59	2,00	2,16
Staal 3.1	525,78	2,02	2,14
Staal 3.2	398,09	2,17	2,17
Staal 3.3	530,54	2,04	2,19
Staal 4.1	501,57	2,01	2,17
Staal 4.2	301,52	2,02	2,14
Staal 4.3	325,49	2,01	2,13

Een tweede manier waarop plantenstalen gespiket kunnen worden is op organisme-niveau. Hierbij wordt er een suspensie gemaakt van een reïncultuur van *E. amylovora*, waarna een verdunningsreeks wordt opgesteld. Aan elk bloemetje wordt dan een gelijk volume van deze suspensie toegevoegd. Om deze stalen als input voor qPCR te kunnen gebruiken werd er eerst een DNA-isolatie uitgevoerd. In Tabel 6 zijn de spectrofotometrische resultaten te zien van deze DNA-isolatie.

Tabel 6: Overzicht spectrofotometrische bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 27/4/2017 na spiking op organisme-niveau; de stalen (1,2,3 en 4) zijn afkomstig van proef 17PERwiAmConfSerreRes07; staal 1,2,3 en 4 werden telkens na homogenisatie onderverdeeld in meerdere substalen; elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waardes zijn de gemiddeldes van elke meting

Staal	Concentratie (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Staal 1.1	268,87	2,06	2,16
Staal 1.2	521,76	2,08	2,14
Staal 2.1	728,92	2,14	2,13
Staal 2.2	635,39	2,14	2,22
Staal 3.1	383,77	2,10	2,18
Staal 3.2	155,20	2,10	2,14
Staal 4.1	70,00	1,86	2,06
Staal 4.2	346,67	2,05	2,25
Staal 5.1	200,64	2,04	2,34
Staal 5.2	672,12	2,06	2,25
Staal 6.1	203,24	2,04	2,43
Staal 6.2	410,83	2,06	2,26
Staal 7.1	250,05	2,03	2,13
Staal 7.2	215,44	2,06	2,13
Staal 8.1	245,59	1,98	2,06
Staal 8.2	264,12	1,97	2,12

In de praktijk zal de detectie van *E. amylovora* gebeuren op geïnfecteerde stalen. Daarom werd er DNA geëxtraheerd uit kunstmatig geïnfecteerde bloemen na het verwijderen van de kroonbladeren en meeldraden en na spoeling met een wasbuffer. In Tabel 7 zijn de spectrofotometrische resultaten te zien van deze DNA-isolatie.

Tabel 7: Overzicht spectrofotometrische bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 19/4/2017 na wassing en dissectie van bloemen; de stalen (1,2,3 en 4) zijn kunstmatig geïnfecteerde stalen van proef 17PERwiAmConfSerreOri48; staal 2,3 en 4 werden telkens na homogenisatie onderverdeeld in meerdere substalen; elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waardes zijn de gemiddeldes van elke meting

Staal	Concentratie (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Staal 1	305,54	1,59	1,17
Staal 2.1	174,90	1,80	1,57
Staal 2.2	318,82	1,83	1,59
Staal 2.3	252,70	1,73	1,55
Staal 3.1	596,67	1,78	1,32
Staal 3.2	393,14	1,86	1,65
Staal 4.1	313,63	1,85	1,60
Staal 4.2	224,66	1,82	1,61

Daarna werd er DNA geëxtraheerd uit kunstmatig geïnfecteerde bloemen na het verwijderen van de kroonbladeren. Hier werd er geen spoeling uitgevoerd waardoor zowel de epifytische als de endocriene bacteriën geëxtraheerd werden. In Tabel 8 zijn de spectrofotometrische resultaten te zien van deze DNA-isolatie.

Tabel 8: Overzicht spectrofotometrische bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 20/4/2017 na dissectie van bloemen; de stalen (1,2,3 en 4) zijn kunstmatig geïnfecteerde stalen van proef 17PErwiAmConfSerreOri48; staal 2,3 en 4 werden telkens na homogenisatie onderverdeeld in meerdere substalen: elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waardes zijn de gemiddeldes van elke meting

Staal	Concentratie (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Staal 1	61,91	1,39	0,77
Staal 2.1	158,24	1,74	1,23
Staal 2.2	36,57	1,78	1,85
Staal 2.3	72,94	1,85	1,75
Staal 3.1	60,29	1,74	1,48
Staal 3.2	270,15	1,66	1,09
Staal 4.1	50,34	2,01	1,94
Staal 4.2	48,09	1,99	2,24
Staal 4.3	61,62	2,00	2,21
Staal 4.4	34,71	1,98	2,52

Omwillen van de grote effecten van bacterievuurinfecties wordt er voortdurend onderzoek gedaan naar methoden en middelen om o.a. de gevoeligheid van de planten voor *E. amylovora* te verminderen. Een van deze methodes is het gebruik van een “yeast-like fungus” nl. *Aureobasidium pullulans*, ook wel bekend onder de productnaam BlossomProtect. Ook op pcfruit wordt er onderzoek gedaan naar deze schimmel. Bepaalde fruitbomen worden behandeld met BlossomProtect. Na staalverwerking zal de analyse d.m.v. qPCR uitgevoerd worden door een firma in Duitsland. Om een idee te hebben van de kwaliteit van het qPCR-protocol hier op pcfruit werden er ook stalen genomen van deze met BlossomProtect behandelde bomen waarna een DNA-extractie werd uitgevoerd. In Tabel 9 zijn de spectrofotometrische resultaten te zien van deze DNA-extractie.

Tabel 9: Overzicht spectrofotometrische bepaling kwaliteit en concentratie DNA-extracten geëxtraheerd volgens standaard CTAB-protocol op 27/4/2017 na dissectie van bloemen; de stalen (VG4, CTRL en BP) zijn afkomstig van proef 17PERwiAmConfJeroenDRes36 en proef 17PERwiAmConfP4Res46; VG4 = bloemen afkomstig van perceel VeGi4; CTRL = bloemen afkomstig van controlebomen op proefperceel Doucet; BP = bloemen gespoten met BlossomProtect op proefperceel Doucet; van elk soort staal werden 2 substalen gemaakt nl. X1 en X2; deze stalen werden op hun beurt na homogenisatie onderverdeeld in 2 substalen nl. X1.1 en X1.2; elke meting werd in duplo uitgevoerd, onderstaande waardes zijn de gemiddeldes van elke meting

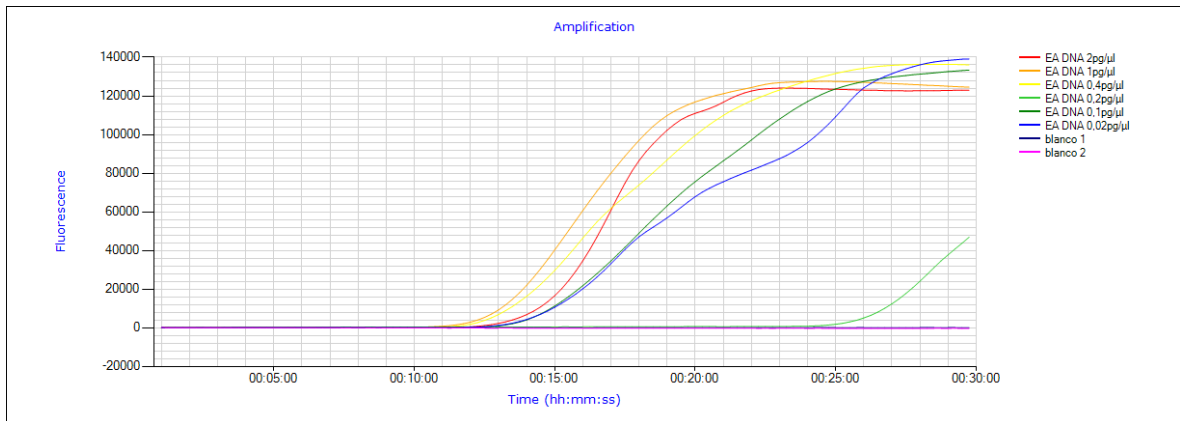
Staal	Concentratie (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
VG4 1.1	433,73	2,03	2,02
VG4 1.2	486,62	2,10	2,10
VG4 2.1	560,25	1,99	1,99
VG4 2.2	365,74	1,95	1,95
CTRL 1.1	639,12	2,06	2,06
CTRL 1.2	655,69	2,04	2,01
CTRL 2.1	682,11	2,04	2,07
CTRL 2.2	646,03	2,09	2,16
BP 1.1	923,33	2,07	2,06
BP 1.2	753,04	2,08	2,11
BP 2.1	767,11	2,03	2,00
BP 2.2	848,53	2,06	2,07

Uit bovenstaande tabellen kan geconcludeerd worden dat het geëxtraheerde DNA van een goede kwaliteit was. Wanneer het DNA zuiver is, zou de verhouding A260/A230 tussen 2,0 en 2,2 moet liggen. Dit is bij de meeste stalen het geval waaruit geconcludeerd kan worden dat er zeer weinig tot zo goed als geen organische contaminatie aanwezig is. De verhouding A260/A280 zou rond 1,80 moeten liggen bij zuiver DNA. Deze waarde ligt echter bij de meeste stalen veel hoger (meestal 2). Dit kan te wijten zijn aan de aanwezigheid van RNA in het geëxtraheerde DNA (Oxford Gene Technology, 2011). Er werd bij de DNA-extractie wel een behandeling met RNase uitgevoerd maar mogelijk was deze behandeling niet voldoende. De concentratie van de DNA-stalen is bij alle stalen hoog genoeg om mee verder te werken. Een constante die zich wel voordoet is dat wanneer de stalen zwaar geïnfecteerd en volledige genecrotiseerd zijn (staal 1 bij geïnfecteerde stalen), de opbrengst en zuiverheid heel wat minder is. Dit is te wijten aan het feit dat deze stalen zeer moeilijk te crushen zijn met de handhomogenisator.

Detectielimiet LAMP-protocol

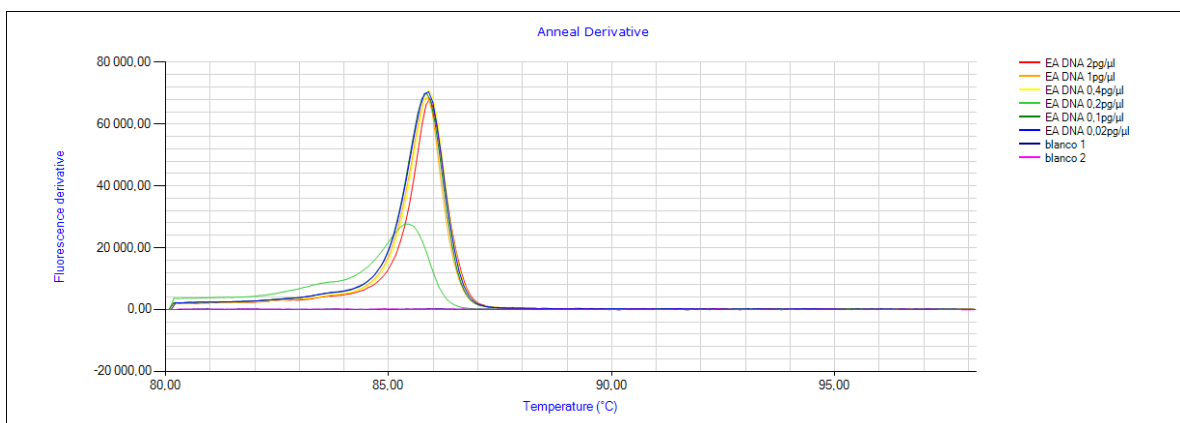
Om de detectielimiet van het LAMP-protocol te kunnen bepalen werd er een LAMP-reactie uitgevoerd met verschillende hoeveelheden DNA van de reincultuur van *E. amylovora*. Dit DNA werd geëxtraheerd door Saartje Swennen volgens Khayat *et al.* (2004).

Op Figuur 19 is het resultaat te zien van deze LAMP-reactie. Er is een duidelijke amplificatie zichtbaar vanaf ongeveer 12 minuten bij de stalen met een input van 2 pg/μl; 1pg/μl; 0,4 pg/μl; 0,1 pg/μl en 0,02 pg/μl *E. amylovora*-DNA. Bij een input van 0,2 pg/μl is er een kleine stijging van de curve te zien na 25 minuten. Dit is echter een atypisch resultaat aangezien een grotere verdunning wel een amplificatiecurve oplevert. Vermoedelijk komt dit doordat de detectielimiet rond een DNA-input van 2 pg/μl ligt en er zich dan af en toe wel amplificatie voordoet bij een input die lager ligt. Beide blanco's vertonen geen amplificatie en zijn dus zoals verwacht negatief.



Figuur 19: Amplificatiecurve bepaling detectielimiet LAMP met reïncultuur *Ea*-DNA; X-as = tijd; Y-as = fluorescentieniveau; EA = *Erwinia amylovora*; aan elk staal werd 5 μ l *Ea*-DNA toegevoegd; blanco = 5 μ l primermix + 5 μ l TE-buffer + 15 μ l IsoThermal Mastermix;

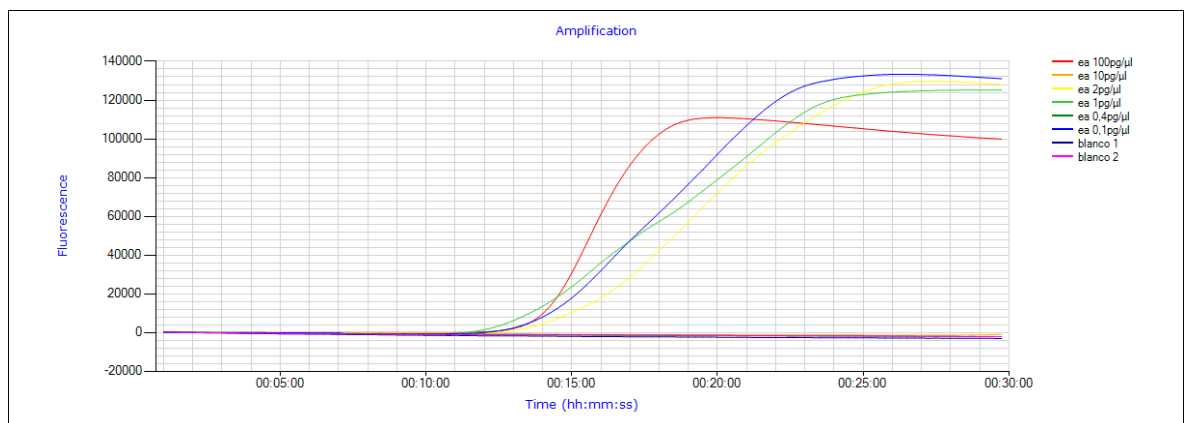
Op de dissociatiecurve is er een duidelijke piek waarneembaar bij ongeveer 86°C bij de stalen met een input van 2 pg/ μ l; 1 pg/ μ l; 0,4 pg/ μ l; 0,1 pg/ μ l en 0,02 pg/ μ l *E. amylovora*-DNA. Dit wijst dus op een specifieke amplificatie van *E. amylovora*. Bij een input van 0,2 pg/ μ l is er een kleine piek te zien ter hoogte van 85°C wat overeenkomt met de kleine stijging die op de amplificatiecurve te zien was. Beide blanco's vertonen geen piek en zijn dus negatief. De dissociatiecurve is te zien op Figuur 20.



Figuur 20: Dissociatiecurve bepaling detectielimiet LAMP met reïncultuur *Ea*-DNA; X-as = temperatuur; Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; EA = *Erwinia amylovora*; aan elk staal werd 5 μ l *Ea*-DNA toegevoegd; blanco = 5 μ l primermix + 5 μ l TE-buffer + 15 μ l IsoThermal Mastermix

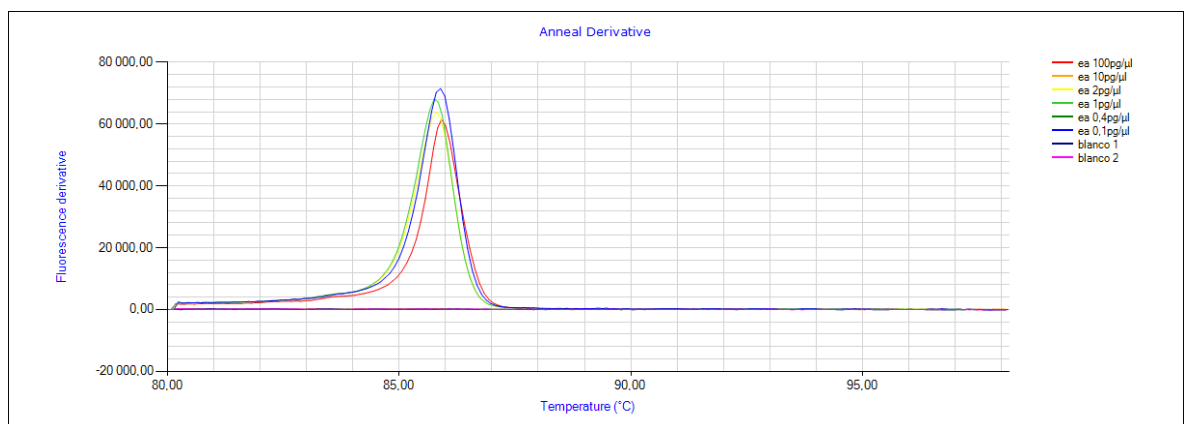
Detectielimiet LAMP-protocol spiked samples

Tijdens het technisch project van het tweede jaar Biotechnologie, werd er in opdracht van pcfruit vzw een DNA-extractieprotocol opgesteld en geoptimaliseerd voor de DNA-extractie uit bloem(bot) (Aerts *et al.*, 2016). Deze DNA-stalen zijn zeker vrij van *E. amylovora*. Er werd dan ook besloten om deze stalen de spiken met *E. amylovora*. Op Figuur 21 is het resultaat te zien van deze LAMP-reactie. Er is een duidelijke amplificatie zichtbaar vanaf ongeveer 12 minuten bij de stalen waaraan volgende hoeveelheden DNA van *E. amylovora* werd toegevoegd: 100 pg/ μ l; 2 pg/ μ l; 1 pg/ μ l en 0,1 pg/ μ l. Bij de stalen waaraan 10 en 0,4 pg/ μ l werd toegevoegd is er geen amplificatie te zien. Beide blanco's vertonen geen amplificatie en zijn dus zoals verwacht negatief.



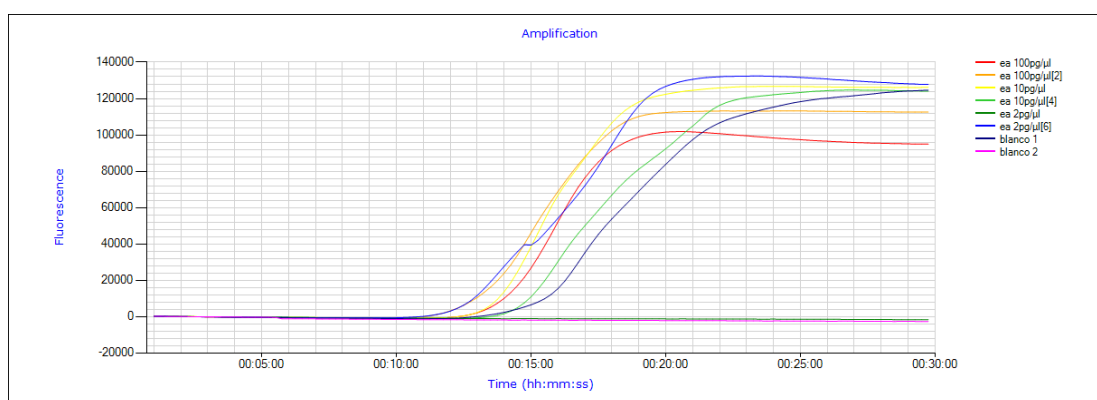
Figuur 21: Amplificatiecurve bepaling detectielimiet spiked samples uitgevoerd op staal J14maa3; X-as = tijd; Y-as = fluorescentieniveau; ea = Erwinia amylovora; aan elk staal werd 4 μ l planten-DNA en 1 μ l Ea-DNA toegevoegd; blanco = 5 μ l primermix + 5 μ l DNA van J14maa3 + 15 μ l IsoThermal Mastermix

Op de dissociatiecurve is er een duidelijke piek waarneembaar bij ongeveer 86°C bij de stalen waaraan volgende hoeveelheden DNA van *E. amylovora* werd toegevoegd: 100 pg/ μ l; 2 pg/ μ l; 1 pg/ μ l en 0,1 pg/ μ l. Dit wijst dus op een specifieke amplificatie van *E. amylovora*. Bij de stalen waaraan 10 en 0,4 pg/ μ l werd toegevoegd is er geen piek te zien. Beide blanco's vertonen geen piek en zijn dus zoals verwacht negatief. De dissociatiecurve is te zien op Figuur 22.



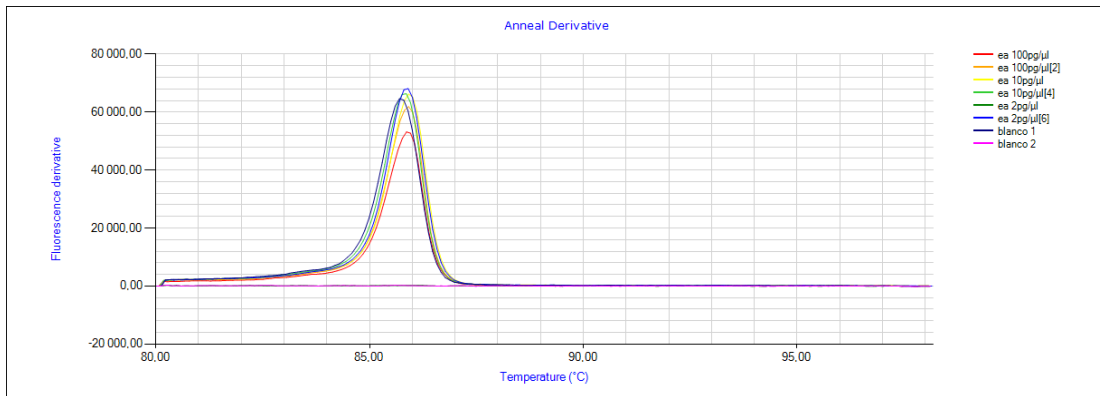
Figuur 22: Dissociatiecurve bepaling detectielimiet spiked samples uitgevoerd op staal J14maa3; X-as = temperatuur; Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; ea = Erwinia amylovora; aan elk staal werd 4 μ l planten-DNA en 1 μ l Ea-DNA toegevoegd; blanco = 5 μ l primermix + 5 μ l DNA van J14maa3 + 15 μ l IsoThermal Mastermix

Normaal zou er een duidelijk verband moeten zijn tussen de hoeveelheid DNA in de reactie en het aantal minuten totdat er amplificatie optreedt. In de vorige reactie was dit niet het geval, daarnaast trad er bij bepaalde verdunningen geen amplificatie op. Om meer duidelijkheid hierin te krijgen, werd er besloten om bovenstaande LAMP-reactie te herhalen maar met elke verdunning in tweevoud als technische herhaling. Op Figuur 23 is het resultaat te zien van deze LAMP-reactie. Er is een duidelijke amplificatie zichtbaar vanaf ongeveer 12 minuten bij alle stalen waaraan DNA van *E. amylovora* werd toegevoegd, enkel bij het tweede staal van 2 pg/ μ l is er geen amplificatie zichtbaar. Tijdens deze reactie werd ook op een oud probleem gestoten, één van de blanco's vertoonde namelijk een positief resultaat. Wat ook opvalt is dat de curves van de technische herhalingen niet met elkaar overeenkomen, normaal zouden vb. de curves van 100 pg/ μ l perfect op elkaar moeten liggen. Dit kan te wijten zijn aan pipetteerfouten of aan het feit dat de LAMP-reactie geen perfect kwantitatieve reactie is.



Figuur 23: Amplificatiecurve bepaling detectielimiet spiked samples met technische herhalingen uitgevoerd op staal J14maa3; X-as = tijd; Y-as = fluorescentieniveau; ea = Erwinia amylovora; aan elk staal werd 4 μ l planten-DNA en 1 μ l Ea-DNA toegevoegd; blanco = 5 μ l primermix + 5 μ l DNA van J14maa3 + 15 μ l IsoThermal Mastermix; well 5 en 6 = 0,2 pg/ μ l i.p.v. 2 pg/ μ l

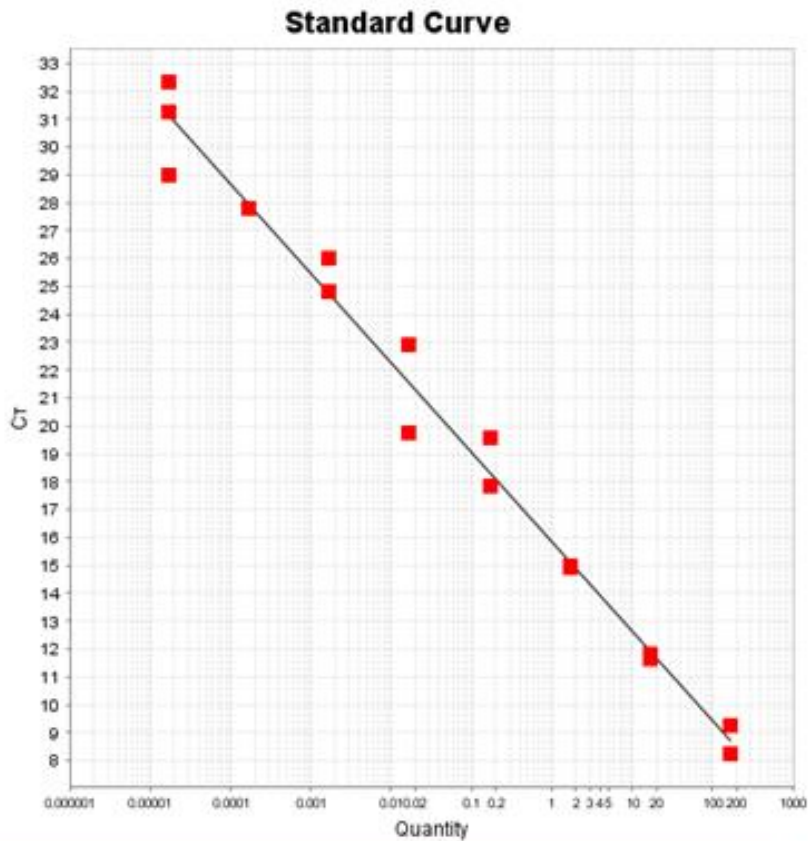
Op de dissociatiecurve is er een duidelijke piek waarneembaar bij ongeveer 86°C bij alle stalen waaraan *E. amylovora*-DNA werd toegevoegd, enkel bij het tweede staal van 2 pg/ μ l is er geen piek zichtbaar. Dit wijst dus op een specifieke amplificatie van *E. amylovora*. Bij één van de blanco's is er ook een piek te zien ter hoogte van 86°C, de curve valt ook perfect samen met de curves van het *E. amylovora*-DNA. Hieruit kan dus besloten worden dat er in één van de blanco's DNA van *E. amylovora* aanwezig was. De dissociatiecurve is te zien op Figuur 24.



Figuur 24: Dissociatiecurve bepaling detectielimiet spiked samples met technische herhalingen uitgevoerd op staal J14maa3; X-as = temperatuur; Y-as = afgeleide fluorescentieniveau; ea = Erwinia amylovora; aan elk staal werd 4μl planten-DNA en 1μl Ea-DNA toegevoegd; blanco = 5 μl primermix + 5 μl DNA van J14maa3 + 15 μl IsoThermal Mastermix; well 5 en 6 = 0,2 pg/μl i.p.v. 2pg/μl

Standaardcurve qPCR *E. amylovora*-DNA

Door het opstellen van een standaardcurve kan er bepaald worden hoeveel bacteriën er in een bepaald staal aanwezig zijn. Daarnaast geeft een standaardcurve ook een eerste idee van de detectielimiet van dit qPCR-protocol. Op Figuur 25 is het resultaat zichtbaar van deze standaardcurve. De correlatiecoëfficiënt die hierbij bereikt wordt, bedraagt 0,984.



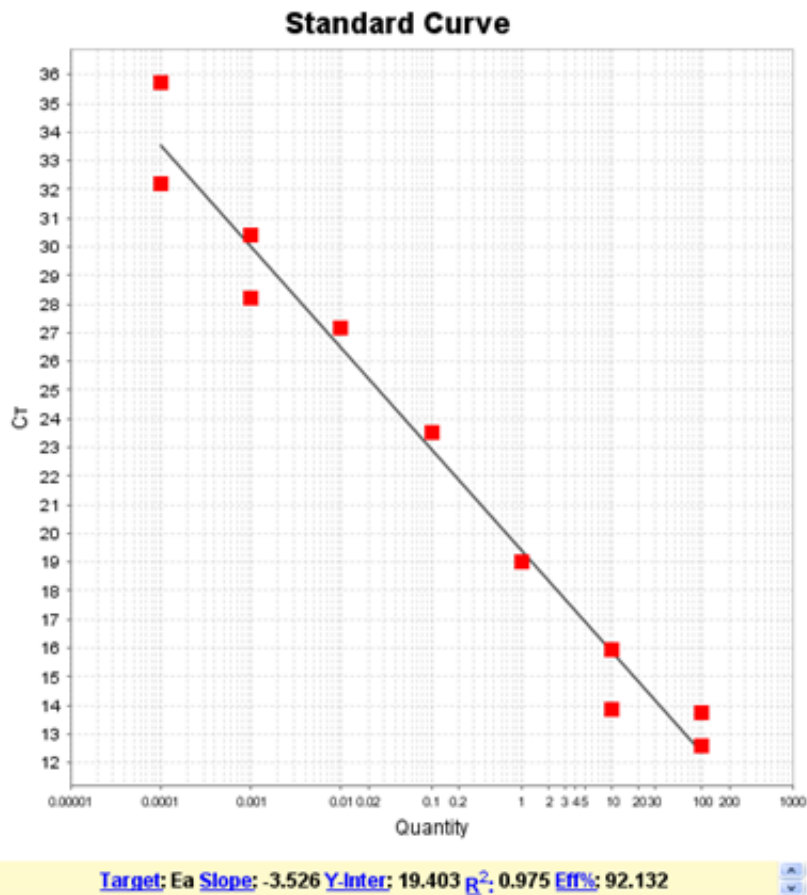
Target: Ea Slope: -3.197 Y-Inter: 15.857 R²: 0.984 Eff%: 105.505

Figuur 25: qPCR standaardcurve *E. amylovora* DNA (startconcentratie = 150 ng/μl) DNA van *E. amylovora* geëxtraheerd door Saartje Swennen volgens Cheng & Jiang met aanpassingen; X-as = hoeveelheid DNA in ng/μl; Y-as = Ct-waarde

Standaardcurve qPCR spiked samples DNA-niveau

Tijdens de vorige reacties werd er enkel DNA van *E. amylovora* toegevoegd aan de reactiemix. In de praktijk zal dit echter niet het geval zijn en zal de reactiemix ook DNA afkomstig van plantenmateriaal bevatten. Om deze situatie na te bootsen, worden de plantenstalen gespiket. Dit kan op twee manieren, nl. door het toevoegen van DNA van *E. amylovora* aan planten-DNA of door het toevoegen van *E. amylovora* aan plantenmateriaal waarna er een DNA-extractie uitgevoerd werd. Eerst gebeurde de bepaling van de detectielimiet waarbij de stalen gespiket werden op DNA-niveau

Wanneer de standaardcurve opnieuw bepaald wordt zonder de laatste drie verdunningen en twee outliers ontstaat een standaardcurve met een acceptabele correlatiecoëfficiënt nl. 0,975. Deze standaardcurve is te zien op Figuur 26.

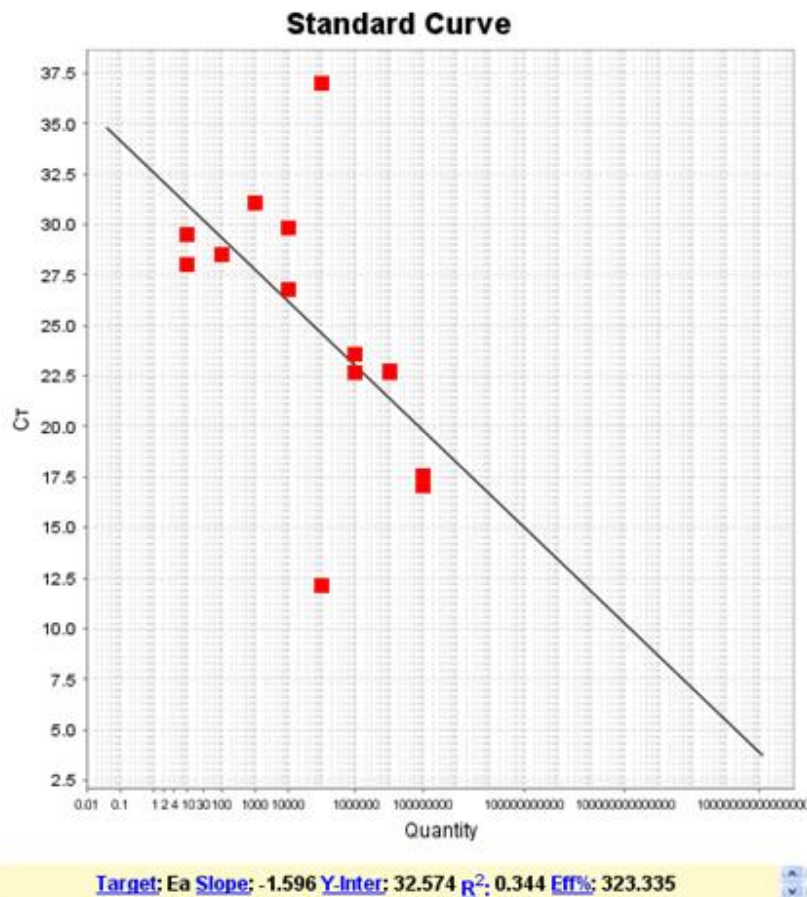


Figuur 26: qPCR standaardcurve spiked samples *E. amylovora* DNA zonder drie laatste verdunningen en twee outliers (startconcentratie = 100 ng; DNA van *E. amylovora* geëxtraheerd door Saartje Swennen volgens Cheng & Jiang met aanpassingen; DNA van Conférence geëxtraheerd door Nathalie Thys volgens standaard CTAB-protocol; elke wel bevat 3µl plant-DNA (5ng/µl) en 2µl DNA van *E. amylovora*; X-as = hoeveelheid DNA in ng; Y-as = Ct-waarde

Standaardcurve qPCR spiked samples organisme-niveau

Een tweede manier waarop stalen gespiket kunnen worden is op organisme-niveau. Hierbij wordt een cultuur van *E. amylovora* tienvoudig verdund. De beginconcentratie wordt gemeten door middel van een turbiditeitsmeter. Voor de qPCR-reactie werd van deze cultuur een tienvoudige verdunningsreeks met een concentratierange van 10^8 CFU/ml tot en met 10^1 CFU/ml. Van elke verdunning wordt een gelijke hoeveelheid cultuur toegevoegd aan een bloemstaal waarna een DNA-extractie uitgevoerd wordt

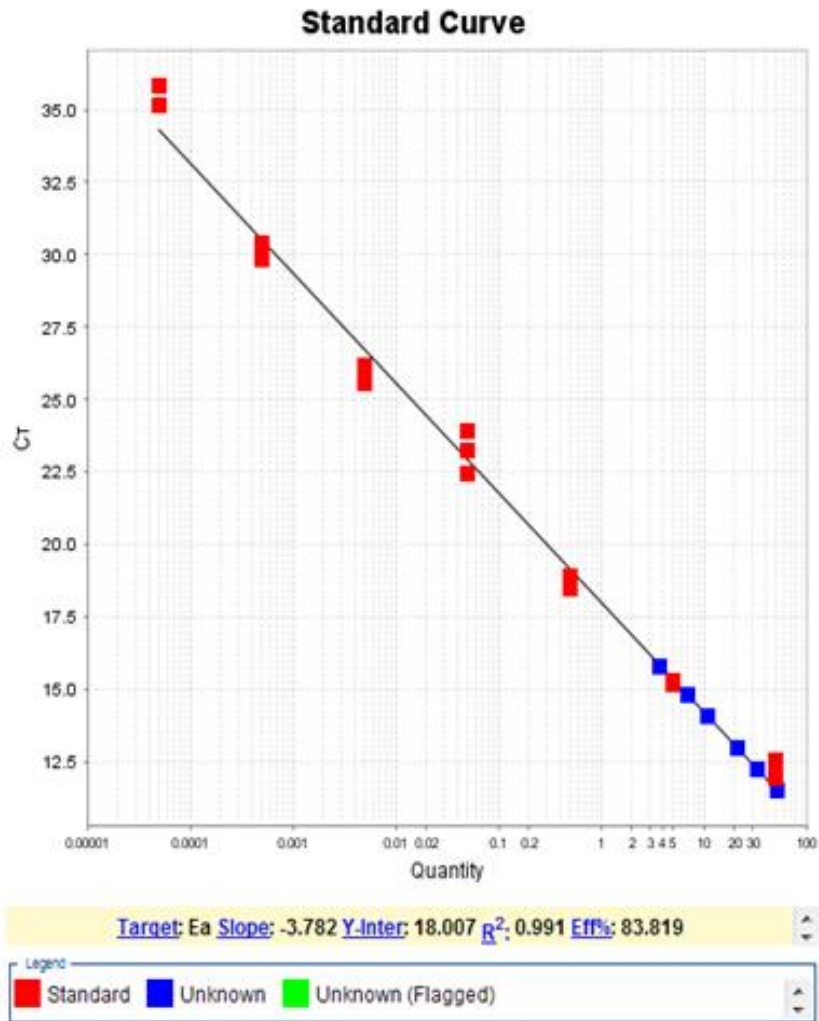
Net zoals in de twee voorgaande grote stappen, wordt er ook een standaardcurve opgesteld van spiked samples op organisme niveau. Op Figuur 27 is het resultaat van deze standaardcurve te zien.



Figuur 27: qPCR standaardcurve spiked samples op organisme niveau; DNA uit gespikete bloemen geëxtraheerd door Nathalie Thys volgens standaard CTAB-DNA-extractieprotocol; X-as = hoeveelheid DNA in CFU/ml; Y-as = CT-waarde

Detectie van *E. amylovora* d.m.v. qPCR in geïnfecteerde stalen

Om de hoeveelheid DNA van *E. amylovora* in de geïnfecteerde stalen te kunnen bepalen, werd er een standaardcurve (in drievoud) bepaald van zuiver DNA van *E. amylovora* in parallel in dezelfde 96-well plaat als de geïnfecteerde stalen. Deze standaardcurve met aanduiding van de geïnfecteerde stalen is te zien op Figuur 28. Omdat de geïnfecteerde stalen zich vooral in het eerste gedeelte van de standaardcurve bevinden, worden enkel de eerste zeven verdunningen van de standaardcurve weergegeven. Met een correlatiecoëfficiënt $r^2 = 0,991$ was het een nauwkeurige curve.



Figuur 28: qPCR standaardcurve (rode punten) *E. amylovora* DNA (startconcentratie= 50 ng/μl); DNA van *E. amylovora* geëxtraheerd door Saartje Swennen volgens Cheng & Jiang met aanpassingen; standaardcurve met aanduiding van geïnfecteerde stalen (blauwe punten); X-as = hoeveelheid DNA in ng/μl; Y-as = Ct-waarde

Het genoom van *E. amylovora* is 3.805.874 basenparen groot, wat overeenkomt met 3,81 Mbp (Smits *et al.*, 2010). Aangezien 1 Mbp overeenkomt met 1 fg DNA, bedraagt het totale gewicht aan DNA van *E. amylovora* 3,81 fg (Reischl *et al.*, 2003). Wanneer d.m.v. de standaardcurve afgeleid wordt dat een bloem DNA-staal 100 ng/μl (en dus een totale hoeveelheid van *E. amylovora* DNA van 500 ng) bevat, komt dit overeen met 500.000.000 fg DNA. Dit betekent dat er in dat staal 131.233.595 of $1,31 \times 10^8$ cellen van *E. amylovora* aanwezig zijn. Als het DNA dan geïsoleerd is uit 4 bloemen, wordt een hoeveelheid van $3,28 \times 10^7$ *E. amylovora* cellen per bloem bekomen. In Tabel 10 is een overzicht te zien van de verschillende DNA-stalen met de bijhorende hoeveelheid *E. amylovora* per staal en per bloem.

Wat in deze tabel vooral opvalt is, wanneer het staal volledig genecrotiseerd is, dan zijn er net minder bacteriële cellen aanwezig. De hoogste concentraties aan bacteriële cellen worden gemeten in stalen waarbij er duidelijk slijmdruppels aanwezig zijn maar er nog geen necrose is opgetreden.

Tabel 10: Overzicht geïnfecteerde stalen met berekende hoeveelheid *E. amylovora* cellen o.b.v. *E. amylovora* specifieke qPCR

Staalcode	Volledige bloemen of met wasstap ^a	Symptomen	Hoeveelheid DNA van <i>E. amylovora</i> per staal in ng op basis van standaardcurve ^b	Hoeveelheid bacteriële cellen <i>E. amylovora</i> per staal	Hoeveelheid <i>E. amylovora</i> cellen per bloem
Staal 1	Volledige bloemen	Zo goed als volledig genecrotiseerd	18,956855	4,98x10 ⁶	1,25x10 ⁶
Staal 2.2	Volledige bloemen	Slijmdruppels	54,193	1,42x10 ⁷	3,55x10 ⁶
Staal 3.1	Volledige bloemen	Slijmdruppels	106,5296	2,80x10 ⁷	7,0x10 ⁶
Staal 4.2	Volledige bloemen	Geen duidelijke symptomen	34,597725	9,08x10 ⁶	2,27x10 ⁶
Staal 1	Wasstap	Zo goed als volledig genecrotiseerd	Niet te bepalen	Niet te bepalen	Niet te bepalen
Staal 3.2	Wasstap	Slijmdruppels	263,41495	6,91x10 ⁷	1,72x10 ⁷
Staal 4.2	Wasstap	Geen duidelijke symptomen	164,1045	4,31x10 ⁷	1,07x10 ⁷

^a = 'volledige bloemen' zijn bloemen waarvan de kroonbladeren werden verwijderd
 'wasstap' zijn bloemen waarvan de kroonbladeren werden verwijderd en een wasstap werd uitgevoerd. DNA werd geëxtraheerd uit de bloemen die overbleven na de wasstap, dit DNA diende als input in de qPCR-reactie

^b = DNA van *E. amylovora* geëxtraheerd door Saartje Swennen volgens Cheng & Jiang (2006) met aanpassingen; DNA van geïnfecteerde stalen geëxtraheerd door Nathalie Thys volgens standaard CTAB DNA-extractieprotocol; voor het uitvoeren van de qPCR: zie protocol op pagina 72.

Bijlage 3: Materialen en methoden

Bijlage 3.1: Verwerking bloemstalen voor uitplatingen op voedingsmedium en qPCR

In sommige gevallen is het noodzakelijk om de bloemstalen te verwerken alvorens er een DNA-extractie uitgevoerd worden. Dit is o.a. het geval wanneer men een onderscheid wil maken tussen de aanwezigheid van epifytische en endocriene bacteriën.

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur

Tabel 11: Overzicht gebruikte apparatuur verwerking bloemstalen voor uitplatingen op voedingsmedium en DNA-extractie

Hardware	Merk en type	Doel
Laminaire airflow	Steril BioBan 48	Steriele omgeving creëren
Parelsterilisator	Lab Associates	Steriliseren van gebruikte materialen
Pincet	/	Manipuleren van staal
Scalpel	/	Dissecteren van staal
Schaartje	/	Dissecteren van staal
Vortex	VWR Lab dancer	Mengen
Microcentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5430R	Centrifugereren van staal
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes


Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Tabel 12: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables verwerking bloemstalen voor uitplatingen op voedingsmedium en DNA-extractie

Hardware	Doel
Petriplaten	Recipiënt
Microtubes	Recipiënt
Greiner tubes	Recipiënt

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Tabel 13: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen verwerking bloemstalen voor uitplatingen op voedingsmedium en DNA-extractie

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
Wasbuffer	Tween-20: Sigma- Aldrich SZBC2920V	VI.	Voor 100ml: 100ml 0,05M fosfaatbuffer 0,1 ml Tween-20 (0,1%v/v)	/	/	Wassen van bloemstalen
Glyceroloplossing	Glycerol:	VI.	15% (v/v) Voor 100ml: 85 ml 0,05M fosfaatbuffer 15ml glycerol	/	/	Oplossen van pellet voor invriezen
Fosfaatbuffer	Na ₂ PO ₄ : KH ₂ PO ₄ :	VI.	0,05 M: 12 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM KH ₂ PO ₄	/	/	Component voor wasbuffer en glyceroloplossing
Ethanol	VWR 15H280002	VI.	70%	H225 	P210	Ontsmetten

Methode

- Verzamel bloemen met bloemsteel van 1-2 cm en leg in petriplaat met water verzadigd papieren doekje
- Verwijder kroonbladeren en meeldraden met een steriel schaar in laminaire airflow (LAF). Vervolgens bloemsteeltje met onderste stuk van bloembodem (hypanthium) afknippen en bloembodem met stampers overbrengen in een 15ml Greiner buis met 4 ml wasbuffer.
- Vier bloemen samenbrengen in één Greiner buis
- Vortex een 20-tal seconden, incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur en vortex opnieuw een 20-tal seconden
- Verwijder bloemen met steriele pincet en breng 2 ml wasbuffer over in een nieuwe 15 ml Greiner buis
- Centrifugeer beide Greiner buisjes gedurende 10 minuten bij 5000rpm en 20°C

Greiner buis 1

- Verwijder supernatans m.b.v. micropipet
- Los pellet op in 100 µl 15% glyceroloplossing
- Breng de suspensie over in een steriel 1,5 ml microtube en bewaar bij -80°C

Greiner buis 2

- Verwijder supernatans m.b.v. micropipet
- Los de pellet op in 1 ml wasbuffer en breng de suspensie over in een steriel 1,5 ml microtube
- Verwijder supernatans m.b.v. micropipet
- Vries de pellet in bij -80°C voor latere DNA-isolatie

Bijlage 3.2: DNA-extractie uit bacteriën – volgens Cheng & Jiang (2006)

Een methode om DNA te extraheren uit bacteriën is deze volgens Cheng & Jiang (2006). Dit is een zeer snelle methode die gebruikt maakt van een STE-buffer om de cellen te wassen en fenol om het DNA uit de bacteriën te extraheren (Cheng and Jiang, 2006). Uit eerdere resultaten bleek dat het DNA geëxtraheerd met dit protocol niet zo zuiver was. Omwille van deze reden werd er vorig jaar beslist om een ethanolprecipitatie uit te voeren en het DNA terug op te lossen in 100 µl TE-buffer (Swennen, 2016).

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur:

Tabel 14: Overzicht gebruikte apparatuur DNA-isolatie bacteriën volgens Cheng & Jiang (2006)

Hardware	Merk en type	Doel
Recirculerend waterbad	GFL 1083	Incuberen
Microcentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5430R	Centrifugeren
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes
Trekkast	Kötermann 2-453-DAHD	Bescherming van de laborant
Vortex	VWR Lab dancer	Mengen van stalen



Overzicht gebruikt glaswerk en disposables:





Tabel 15: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables DNA-isolatie bacteriën volgens Cheng & Jiang (2006)

Hardware	Doel
Steriele micropipettipjes	Pipetteren van kleine volumes
Steriele microtubes	Receptiënt
Handschoenen	Aseptisch werken
Afvalbekers	Afvalverwijdering

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen:

Tabel 16: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen DNA-isolatie bacteriën volgens Cheng & Jiang (2006)

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
STE-buffer	NaCl: VWR 16E114103 Tris-HCl: Duchefa 010602.02 EDTA: Sigma SLBD6046V	VI.	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8.0	/ / H319 	/ / P305+P351+P338	Wassen van cellen
TE-buffer	Tris-HCl: Duchefa 010602.02 EDTA: Sigma SLBD6046V	VI.	10 mM Tris-HCl 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/ H319 	/ P305+P351+P338	Resuspensie van cellen
Tris-verzadigde fenol (pH 8.0)	Sigma MKBV9724 V	VI.	Equilibrated with 10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA	H301+H311+ H331-H314- H341-H373- H411	P260-P280- P303+P361+P353- P304+P340+P310- P305+P351+P338	Lyseren van cellen

						
Chloroform	Sigma BCBC1010	VI.	≥ 99%	H302-H315- H319-H331- H336-H351- H361d-H372 	P261-P281- P305+P351+P338-P311	Proteïnen extraheren
RNase	Invitrogen 1658585	VI.	20 mg/ml	/	/	RNA verwijderen
Ammonium- acetaat	Roth 195222889 9	VI.	10 M	/	/	Zoutconcentratie verhogen
Ethanol	VWR 15H280002	VI.	70%	H225-H319 	P210-P305+P351+P338- P370+P378+P403+P235	Wassen DNA-pellet
Ethanol	VWR 15H280002	VI.	> 99,8%	H225-H319 	P210-P305+P351+P338- P370+P378+P403+P235	DNA laten neerslaan

Methoden

- Centrifugeer 1 ml celsuspensie bij 8600 rpm (8000 G) gedurende 2 min op kamertemperatuur
- Verwijder het supernatans en was de pellet met 400 µl STE-buffer
- Herhaal de vorige stap
- Centrifugeer de cellen bij 8600 rpm (8000 G) gedurende 2min op kamertemperatuur
- Resuspendeer de pellet in 200 µl TE-buffer
- Voeg 100 µl tris-verzadigde fenol toe en vortex gedurende 60 seconden.

Veiligheidsrisico's: werk altijd onder een trekkast en draag handschoenen bij het gebruik van fenol!



- Centrifugeer bij 11000 rpm (13000 G) gedurende 5 min op 4°C
- Breng 160 µl van de bovenste waterige fase over in een steriel 1,5 ml tube.
- Voeg 40 µl TE-buffer en 100 µl chloroform toe.

Veiligheidsrisico's: werk altijd onder een trekkast en draag handschoenen bij het gebruik van chloroform!



- Centrifugeer bij 11000 rpm (13000 G) gedurende 5 min (op 4°C)
- Herhaal de chloroformextractie totdat er geen witte interfase meer zichtbaar is
- Breng 160 µl van de bovenste waterige fase over in een steriel 1,5 ml tube en voeg 40 µl TE-buffer en 2,5 µl RNase A (20 mg/ml) toe tot een eindconcentratie van 250 µg/ml.
- Incubeer op 37°C gedurende 10 min.
- Voeg 100 µl chloroform toe, meng en centrifugeer bij 11000 rpm (13000 G) gedurende 5 min op 4°C.

Veiligheidsrisico's: werk altijd onder een trekkast en draag handschoenen bij het gebruik van chloroform!



- Breng 150 µl van de bovenste waterige fase over in een steriel 1,5 ml tube

Ethanol-precipitatie (in een 2 ml microtube):

- Voeg 100 µl 10 M ammoniumacetaat toe aan 400 µl staal (eindconcentratie ammoniumacetaat 2 M)
- Vortex
- Voeg 2 volumes 100%(v/v) ijskoude ethanol toe
- Mix door te vortexen
- Laat 20 min incuberen op ijs

- Centrifugeer bij 13 000 rpm gedurende 15 min op 4°C
- Verwijder het supernatans
- Voeg 500 µl 70%(v/v) ethanol toe
- Centrifugeer bij 13 000 rpm gedurende 5 min (op 4°C)
- Herhaal eventueel de twee vorige stappen
- Verwijder het supernatans
- Laat de pellet drogen aan de lucht
- Los de pellet op in 50-100 µl TE-buffer


Bijlage 3.3: Standaard CTAB DNA-extractieprotocol gebaseerd op een aangepast Khayat *et al.* (2004) en het protocol ontwikkeld tijdens het project van 2^e bachelor Biotechnologie

Op basis van enkele bestaande protocollen werd besloten om één standaard CTAB DNA-extractieprotocol te creëren dat geschikt is voor de DNA-extractie van zowel bacteriële cellen als plantenmateriaal.

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur

Tabel 17: Overzicht gebruikte apparatuur standaard CTAB DNA-extractieprotocol

Hardware	Merk en type	Doel
Recirculerend waterbad	GFL 1083	Incuberen
Centrifuge	Eppendorf Centrifuge 5430R	Scheiden van mengsels
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes
Handcrusher 	Bioreba Homogenizer hand model	Homogeniseren van het staal
Vortex	VWR Lab dancer	Homogeniseren/mengen
Trekkast	Köttermann 2-453-DAHD	Bescherming laborant




Overzicht gebruikt glaswerk en disposables




Tabel 18: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables standaard CTAB DNA-extractieprotocol


Hardware	Doel
Steriele micropipettipjes	Pipetteren van kleine volumes
Steriele microtubes	Receptiënt
Handschoenen	Aseptisch werken
Afvalbekers	Afvalverwijdering
Plastiek zakje	Stalen homogeniseren

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen:

Tabel 19: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen standaard CTAB DNA-extractieprotocol

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
TE-buffer	Tris-HCl: Duchefa 010602.02 Na-EDTA: VWR 13J170016	VI.	10 mM Tris-HCl 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/ H319 	/ P305+P351+P338	Oplossen DNA-pellet
CTAB-buffer:	CTAB: Merck 200-311-3 Tris: Sigma SLBR 1149V EDTA: Sigma SLBD 6046V NaCl: VWR 16E114103	VI.	50 mM CTAB 10 mM Tris pH 8.0 20 mM EDTA pH 8.0 1,4 M NaCl 0,25 mM PVP 40 (Mw 40000)	H302-H315- H318-H335- H373-H400  / H319  / / /	P260-P280- P301+P312+P330- P305+P351+P338+P310 / P305+P351+P338 / /	Extractiebuffer

	PVP40: VWR 02F060002					
Chloroform : isoamylalcohol	Roth 045225329	VI.	24:1	H302-H315- H319-H331- H336-H351- H361d-H372 	P201-P261-P280- P304+P340+P312- P308+P313-P403+P233	Proteïnen extraheren
Fenol: chloroform: isoamylalcohol	Roth 105226534	VI.	25:24:1	H301- H312+H332- H314-H336- H341-H351- H361d-H372- H411 	P201-P261- P301+P310+P330- P303+P361+P353- P304+P340+P310- P351+P338	Proteïnen extraheren
Ammonium- acetaat	Roth 195228899	VI.	7,5 M	/	/	Zoutconcentratie verhogen
Ethanol	VWR 15H280002	VI.	70%	H225-H319 	P210-P305+P351+P338- P370+P378+P403+P235	Wassen DNA-pellet

Ethanol	VWR 15H280002	VI.	> 99,8%	H225-H319 	P210-P305+P351+P338- P370+P378+P403+P235	DNA laten neerslaan
RNase A	Invitrogen 1658585	VI.	20 mg/ml	/	/	RNA verwijderen

Methoden

Voor de extractie van DNA uit bacteriële cellen:

- Los de bacteriën op in 800 µl CTAB-buffer
- Ga nu verder met het DNA-extractieprotocol vanaf de eerste incubatiestap (30min, 55°C)

Voor de extractie van DNA uit plantenmateriaal

- Verzamel ongeveer 0,4 g plantenmateriaal
 - Snij in kleine stukjes met een scalpel en breng over in een plastic zakje
 - Voeg 4 ml CTAB-buffer toe
 - Laat 5 min incuberen op kamertemperatuur
 - Crush de stalen met de handcrusher
 - Breng over in een microtube
-
- Incubeer de oplossing gedurende 30 min op 55°C
 - Behandel de stalen met DNase-vrij RNase aan een eindconcentratie van 200 µg/ml
 - Laat 30min incuberen op 37°C
 - Voeg een gelijke hoeveelheid fenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) toe
- Veiligheidsrisico's: werk altijd onder een trekkast en draag handschoenen bij het gebruik van fenol:chloroform:isoamylalcohol!**



- Vortex en centrifugeer voor 5 min op 5000 rpm bij 4°C
 - Breng de bovenste waterige fase over in een nieuwe microtube
 - Voeg een gelijke hoeveelheid chloroform:isoamylalcohol toe
- Veiligheidsrisico's: werk altijd onder een trekkast en draag handschoenen bij het gebruik van chloroform:isoamylalcohol!**



- Vortex en centrifugeer voor 5 min op 5000 rpm bij 4°C
- Breng de bovenste waterige fase over in een nieuwe microtube
- Herhaal eventueel de 3 laatste stappen
- Voeg aan elke buisje 7,5 M ammoniumacetaat toe tot een eindconcentratie van 2,5 M, gevolgd door 2 volumes ijskoude ethanol (>99,8%). Schud de oplossing door het buisje langzaam enkele keren om te keren om zo het DNA te laten neerslaan
- Centrifugeer nu gedurende 20 min aan 13000 rpm bij 4°C om het DNA als een pellet te laten neerslaan. Verwijder het supernatans en was de DNA-pellet met 200 µl 70% ijskoude ethanol en centrifugeer aan 13000 rpm gedurende 20 min bij 4°C.
- Verwijder nu het supernatans en laat de DNA-pellet gedurende 15 min drogen. Zorg ervoor dat de pellet niet te droog wordt, anders lost deze in de volgende stap moeilijk op.
- Los de pellet op in 50-100 µl TE-buffer. Bewaar op -20°C.

Bijlage 3.4: Meting DNA-concentratie en zuiverheid via Multiskan GO

Om te bepalen of het geëxtraheerde DNA geschikt is voor verdere experimenten is het belangrijk om de zuiverheid en de concentratie van het DNA te meten. Dit kan via een UV-spectrofotometrische methode met het toestel Multiskan GO in combinatie met een μ drop plaat.

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur

Tabel 20: Overzicht gebruikte apparatuur meting DNA-concentratie en zuiverheid via Multiskan GO

Hardware	Merk en type	Doel
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes
Spectrofotometer	Multiskan GO	Metten van concentratie en zuiverheid geëxtraheerd DNA



Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Tabel 21: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables meting DNA-concentratie en zuiverheid via Multiskan GO

Hardware	Doel
Steriele micropipettipjes	Pipetteren van kleine volumes
Handschoenen	Aseptisch werken
Afvalbekers	Afvalverwijdering

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen:

Tabel 22: Overzicht gebruikte stoffen en oplossing meting DNA-concentratie en zuiverheid via Multiskan GO

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
Steriel water	/	Vl.	/	/	/	μ drop plaat spoelen
Ethanol	VWR 15H2800 02	Vl.	70%	H225-H319 	P210- P305+P351+P338- P370+P378+P403+ P235	Ontsmetten
TE-buffer	Tris-HCl: Duchefa 010602.0 2 EDTA: Sigma	Vl.	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8.0	/ H319 	/ P305+P351+P338	Blanco

	SLBD604 6V					
--	---------------	--	--	--	--	--

Methode

- Spoel de μ drop plaat af met gedestilleerd water en ontsmet de plaat met ethanol (70%)
- Spoel de μ drop plaat af met gedestilleerd water en droog met een papiertje
- Hef het glas op en breng telkens 3 μ l staal aan op de μ drop plaat (Let erop om plaats te laten voor blanco's)
- Doe het glas terug dicht
- Zet het Multiskan GO toestel en de computer aan
- Open de Skanit software (op de computer)
- Klik op 'Login'
- Klik in het tabblad 'Home-instrument' op 'Plate out'
- Plaats vervolgens de μ drop plaat in het toestel
- Klik in het tabblad 'Home-instrument' op 'Plate in'
- Klik in het tabblad 'Home-session' op 'New'
- Ga naar het tabblad 'Layout'
- Vul de positie van de stalen in door ze te selecteren en vervolgens op 'Fill With' te klikken
 - selecteer 'unknown' voor onbekende stalen
 - selecteer 'blanks' voor blanco's
- Ga naar het tabblad 'Protocol'
- Klik in het venster 'Measurement' op 'Photometric'
 - selecteer 'multiple wavelengths' en 'precision'
 - geef de gewenste golflengtes in (230, 260 en 280nm)
- Klik op de groene startknop
- Ga na de meting naar het tabblad 'results'
- Klik op 'blank subtraction' in het venster 'basic'. Nu worden de blanco van de waarden afgetrokken
- Klik in het venster 'processing' op 'precalculation'
- Kies 'Ratio (A/B)' voor het berekenen van de verhouding A260/A230
 - kies bij A voor 'Blanksubtraction1' bij 260nm
 - kies bij B voor 'Blanksubtraction1' bij 230nm
 - dit is 'Precalc 1'
 - bekijk de resultaten vervolgens in het tabblad 'Table'
- Druk in het venster 'processing' opnieuw op de knop "Precalculation"
- Kies 'Ratio (A/B)' voor het berekenen van de verhouding A260/A280
 - kies bij A voor 'Blanksubtraction1' bij 260nm
 - kies bij B voor 'Blanksubtraction1' bij 280nm
 - dit is 'Precalc 2'
 - bekijk de resultaten vervolgens in het tabblad 'Table'
- Druk opnieuw op de knop 'Precalculation' in het venster 'processing'
- Kies 'Scale (A*x)' voor het berekenen van de DNA-concentratie
 - kies bij A voor 'Blanksubtraction1' bij 260nm
 - Geef bij X het getal 980,39216
 - Dit is 'precalc 3'
- De resultaten bevinden zich in het tabblad 'Table'

Bijlage 3.5: Amplificatie van DNA d.m.v. LAMP

LAMP oftewel loop mediated isothermal amplification is een snelle en eenvoudige amplificatiemethode waarbij gebruik gemaakt wordt van 1 temperatuur om het DNA te amplificeren. De gebruikte primers en het gebruikte temperatuurprofiel zijn gebaseerd op het artikel van Bühlmann *et al.* (2013).

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur

Tabel 23: Overzicht gebruikte apparatuur amplificatie van DNA d.m.v. LAMP

Hardware	Merk en type	Doel
LAMP-toestel	OptiGene, Genie III	Amplificatie, LAMP-reactie uitvoeren
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes
PCR-kabinet	VWR PCR Workstation 732-2541	Steriliseren van gebruikte materialen en mastermix



Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Tabel 24: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables amplificatie DNA d.m.v. LAMP

Hardware	Doel
Steriele micropipettipjes	Pipetteren van kleine volumes
Handschoenen	Aseptisch werken
Afvalbekers	Afvalverwijdering
Stripje van 8 microtubes	Recipiënt LAMP-reactie

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Tabel 25: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen amplificatie DNA d.m.v. LAMP

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
Isothermal mastermix	OptiGene 3/2/g	VI.	MgSO ₄ , reactiebuffer, dNTP's, DNA-polymerase Ds DNA binding fluorescent dye	/	/	Reactiemix voor amplificatie/LAMP-reactie
Nucleasevrij water	5PrimeGmbH 130171773	VI.	/	/	/	Primermix aanvullen tot gewenst volume
Ethanol	VWR 15H280002	VI.	70%	H225-H319 	P210-P305+P351+P338-P370+P378+P403+P235	Ontsmetten
TE-buffer	Tris-HCl: Duchefa 010602.02 Na-EDTA: VWR 13J170016	VI.	10 mM Tris-HCl 1 mM Na-EDTA pH 8.0	/ H319 	/ P305+P351+P338	Blanco

Overzicht gebruikte primers:

Tabel 26: Overzicht gebruikte primers amplificatie DNA d.m.v. LAMP

Primer	Sequentie	Tm primer
F3 primer EAMY_3195	TCAAGATCGTGTGGCTATG	56°C
B3 primer EAMY_3195	CTAAAAACCGGGGCAAAC	54°C
FIP primer EAMY_3195	ACGRTTCTACCCTTCTGTCTACTTCTCTGGGGTTTCAGTC	64,4°C
BIP primer EAMY_3195	ATGTCACCTGATTCTACAGCCGCAATC	63,3°C
LoopF primer EAMY_3195	ACATTAGCGGCCCCGACCAA	60°C
LoopR primer EAMY_3195	CTRRTAAGATGGCATGCAGA	60°C

Methoden

- Maak een werkoplossing van de primers met een eindconcentratie van 20 μM (Als de stockoplossing 100 μM bedraagt: 20 μl stock primers oplossen in 80 μl steriel H_2O)
- Ontdooi alle componenten (mastermix en primers) en het template-DNA
- Shortspin alle componenten
- Zet het PCR-kabinet aan
- Plaats de gebruikte apparatuur en materialen onder het PCR-kabinet
- Zet de UV-lamp aan en laat 30 min aan staan
- Bereid een primermix volgens onderstaand schema

Tabel 27: Pipetteerschema primermix DNA-amplificatie d.m.v. LAMP

Component	Volume (μl) voor 1 reactie	Eindconcentratie in de primermix (μM)
F3 primer (20 μM)	0,1	0,08
B3 primer (20 μM)	0,1	0,08
FIP primer (20 μM)	1	0,8
BIP primer (20 μM)	1	0,8
LoopF primer (20 μM)	0,5	0,4
LoopR primer (20 μM)	0,5	0,4
Volume primermix	3,2	
+ H_2O	1,8	
Totaal reactievolume	5	

- Voeg per epje van de strip 5 μl van deze primermix toe
- Voeg 15 μl IsoThermal Mastermix toe
- Voeg 5 μl DNA (of in geval van een negatieve controle TE-buffer) toe in het template PCR-kabinet
- Doe de dekseltjes van de strip dicht en druk deze stevig aan
- Zet het toestel aan en plaats de strip in het toestel
- Open het menuscherm op het LAMP-toestel
- Druk op 'LAMP & Anneal'
- Druk op 'Edit'
- Geef de naam van het experiment in en benoem de stalen
- Geef onderstaand temperatuurprofiel in

65°C 30min
98°C 1min
80°C 1sec } T daalt met
0,05°C/sec

- Druk op de startknop
- De resultaten worden opgeslagen en kunnen bekeken worden op de computer via het programma 'Genie Explorer'

Bijlage 3.6: Uitvoering LAMP op qPCR-toestel

Om eventuele problemen met het LAMP-toestel uit te sluiten, wordt de LAMP-reactie uitgevoerd op het qPCR-toestel.

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur

Tabel 28: Overzicht gebruikte apparatuur uitvoering LAMP op qPCR-toestel

Hardware	Merk en type	Doel
Microcentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5430R	Centrifugeren
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes
Vortex	VWR Lab dancer	Mengen van stalen
Real time qPCR toestel	Applied biosystems 7500 real time PCR	Uitvoeren qPCR
Computer	Dell	Aflezen van resultaten
PCR-kabinet	VWR PCR Workstation 732-2541	Steriliseren van gebruikte materialen en mastermix



Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Tabel 29: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables uitvoering LAMP op qPCR-toestel

Hardware	Doel
Steriele micropipettipjes	Pipetteren van kleine volumes
Filtertips	Pipetteren van kleine volumes
Handschoenen	Aseptisch werken
Afvalbekers	Afvalverwijdering
96-well plaat	Receptie qPCR
Strip met 8 dekseltjes	Afdekken 96-well plaat

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen:

Tabel 30: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen uitvoering LAMP op qPCR-toestel

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
Isothermal mastermix	OptiGene 3/2/g	VI.	MgSO ₄ , reactiebuffer, dNTP's, DNA-polymerase Ds DNA binding fluorescent dye	/	/	Reactiemix voor amplificatie/LAMP-reactie
Nucleasevrij water	5PrimeGmbH 130171773	VI.	/	/	/	Primermix aanvullen tot gewenst volume
Ethanol	VWR 15H280002	VI.	70%	H225-H319 	P210-P305+P351+P338-P370+P378+P403+P235	Ontsmetten
TE-buffer	Tris-HCl: Duchefa 010602.02 Na-EDTA: VWR 13J170016	VI.	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8.0	/ H319 	/ P305+P351+P338	Blanco

Overzicht gebruikte primers

Tabel 31: Overzicht gebruikte primers uitvoering LAMP op qPCR-toestel

Primer	Sequentie	Tm primer
F3 primer EAMY_3195	TCAAGATCGTGTGGCTATG	56°C
B3 primer EAMY_3195	CTAAAACCGGGGCAAAC	54°C
FIP primer EAMY_3195	ACGRTTCTACCCTCCTGTCTACTTCTCTGGGGTTTCAGTC	64,4°C
BIP primer EAMY_3195	ATGTCACCTGATTCTACAGCCGCAATC	63,3°C
LoopF primer EAMY_3195	ACATTAGCGGCCCGACCAA	60°C
LoopR primer EAMY_3195	CTRRTAAGATGGCATGCAGA	60°C

Methoden

- Maak een werkoplossing van de primers met een eindconcentratie van 20 μM (Als de stockoplossing 100 μM bedraagt: 20 μl stock primers oplossen in 80 μl steriel H_2O)
- Ontdooi alle componenten (mastermix en primers) en het template-DNA
- Shortspin alle componenten
- Zet het PCR-kabinet aan
- Plaats de gebruikte apparatuur en materialen onder het PCR-kabinet
- Zet de UV-lamp aan en laat 30 min aan staan
- Bereid een primermix volgens onderstaand schema

Tabel 32: Pipetteerschema primermix DNA-amplificatie d.m.v. LAMP

Component	Volume (μl) voor 1 reactie	Eindconcentratie in de primermix (μM)
F3 primer (20 μM)	0,1	0,08
B3 primer (20 μM)	0,1	0,08
FIP primer (20 μM)	1	0,8
BIP primer (20 μM)	1	0,8
LoopF primer (20 μM)	0,5	0,4
LoopR primer (20 μM)	0,5	0,4
Volume primermix	3,2	
+ H_2O	1,8	
Totaal reactievolume	5	

- Voeg per epje van de 96-well plaat 5 μl van deze primermix toe
- Voeg 15 μl IsoThermal Mastermix toe
- Voeg 5 μl DNA (of in geval van een negatieve controle TE-buffer) toe in het template PCR-kabinet
- Breng het stripje aan om de wells 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 het tabblad 'Setup' en geef bij de 'Experiment properties' de naam in van het experiment
- Duid volgende parameters aan:
 - 7500 (96 wells)
 - Presence/absence
 - TaqMan Reagents
 - Standard (~2 hours to complete a run)
- Klik op het tabblad 'Plate setup'
- Vul de gewenste targets in bij 'Define targets and samples'
- Selecteer bij ieder target als reporter "FAM" en als quencher "NONE"
- Benoem de stalen
- Ga naar het tabblad 'assign targets and samples'

- Kies 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 de negatieve controles aan
- Ga naar het tabblad 'run method'
- Verander het reactievolume in 25µl
- Duid de 'expert mode' aan
 - klik op 'select/view filters'
 - vink enkel de eerste filters aan (FAM-SYBR)
 - klik op ok
- Stel het volgende programma in:

LAMP-reactie	65°C	1sec	} 60x
	65°C	29sec	

Aanmaken	65°C	15sec
melting curve	82°C	15sec
	92°C	15sec

- Druk bovenaan op de groene knop 'start run'

Bijlage 3.7 amplificatie van DNA d.m.v. qPCR

Een tweede manier om het DNA te amplificeren is via qPCR oftewel real time PCR. Dit is een kwantitatieve methode. Het gebruikte protocol is afkomstig van een onderzoek van Lehman *et al.* (2008).

Materialen

Overzicht gebruikte apparatuur

Tabel 33: Overzicht gebruikte apparatuur amplificatie van DNA d.m.v. qPCR

Hardware	Merk en type	Doel
Microcentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5430R	Centrifugeren
Micropipetten	VWR Ergonomic High Performance	Pipetteren van kleine volumes
Vortex	VWR Lab dancer	Mengen van stalen
Real time qPCR toestel	Applied biosystems 7500 real time PCR	Uitvoeren qPCR
Computer	Dell	Aflezen van resultaten
PCR-kabinet	VWR PCR Workstation 732-2541	Steriliseren van gebruikte materialen en mastermix

Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

Tabel 34: Amplificatie van DNA d.m.v. qPCR

Hardware	Doel
Steriele micropipettipjes	Pipetteren van kleine volumes
Filtertips	Pipetteren van kleine volumes
Handschoenen	Aseptisch werken
Afvalbekers	Afvalverwijdering
96 well plaat	Receptie qPCR
Stripje met 8 dekseltjes	Afdekken 96-well plaat

Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

Tabel 35: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen amplificatie DNA d.m.v. qPCR

Stofnaam of naam oplossing	Batchnr. *	Vast of vloeibaar	MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.)	Risico's H-zinnen	Veiligheidsvoorschriften P-zinnen	Doel
ThermoPol PCR buffer	New England Biolabs 0011404	VI.	10x	/	/	Optimale condities creëren voor qPCR-reactie
dNTP's met UTP's	Applied Biosystems 1607097	VI	2,5 mM dATP's, dGTP's, dCTP's 5 mM dUTP's	/	/	Bouwstenen van DNA
MgCl ₂	Invitrogen 1722937	VI.	50 mM	/	/	Cofactor DNA-polymerase
Taq-polymerase	Invitrogen 1718570	VI.	500 U	/	/	Katalyseren DNA-synthese
AmpErase	Applied biosystems 1679207	VI.	1 U/μl (100U)	/	/	Verwijderen van eerder gevormde PCR-producten
Nucleasevrij water	5PrimeGmbH 130171773	VI.	/	/	/	Mastermix aanvullen tot gewenst volume

Overzicht gebruikte primers

Primer	Sequentie	Tm primer/probe	Ampliconlengte
Ea-IscF	CGCTAACAGCAGATCGCA	55,4°C	105bp
Ea-IscR	AAATACGCGCACGACCAT	55,1°C	
Ea-IscP	(CY5)CTGATAATCCGCAATCCAGGATC(IAbRQ)	55,9°C	

Methoden

- Maak een werkoplossing van de primers met een eindconcentratie van 10 μM . (Als de stockoplossing 100 μM bedraagt: 10 μl stock primers oplossen in 90 μl steriel H_2O)
- Ontdooi alle reactiecomponenten en het target-DNA
- Shortspin alle componenten
- Zet het PCR-kabinet aan
- Plaats de gebruikte apparatuur en materialen onder het PCR-kabinet
- Zet de UV-lamp aan en laat 30min aan staan
- Bereid een mastermix volgens onderstaand schema

Tabel 36: Pipetteerschema mastermix amplificatie DNA d.m.v. qPCR

Component	Volume (μl) voor 1 reactie	Eindconcentratie in de reactiemix
ThermoPol PCR-buffer (10x)	2,5	1x
MgCl_2 (100mM)	1	2mM
dNTP's met UTP's (2,5mM)	2	0,2mM
Probe (10 μM)	0,25	0,1 μM
Primer F (10 μM)	0,5	0,2 μM
Primer R (10 μM)	0,5	0,2 μM
Taq polymerase (5000U)	0,075	1,5U
AmpErase (0,2U/ μl) *	0,25	0,05 U/25 μl
+ steriel water	12,925	
Volume MM	20	
+DNA	5 μl	
Totaal reactievolume	25 μl	

*Bereid eerst een 1:5 verdunning in TE-buffer (concentratie stockoplossing = 1 U/ μl). Bewaar of hergebruik geen verdund enzym.

- Pipetteer de mastermix in een 96-well-plaat
- Voeg 5 μl DNA (of in geval van een negatieve controle TE-buffer) toe
- Breng het deksel aan op de 96-well plaat
- Centrifugeer bij 2000 rpm gedurende 1min
- Zet het real-time qPCR-toestel en de bijhorende computer aan
- Open de software (7500)
- Plaats de 96-well plaat in het real-time qPCR-toestel

- Klik op 'New experiment'
- Ga naar het tabblad 'Setup' en geef bij de 'Experiment properties' de naam in van het experiment
- Duid volgende parameters aan:
 - 7500 (96 wells)
 - quantitation-standard curve
 - TaqMan Reagents
 - Standard
- Klik op het tabblad 'Plate setup'
- Vul de gewenste targets in bij 'Define targets and samples'
- Selecteer bij ieder target als reporter 'CY5' en als quencher 'none'
- Benoem de stalen
- Klik op het tabblad 'Assign targets and samples'
- Klik links onderaan op 'none' bij 'Select the dye to use as the passive reference'
- Klik op 'Define and set up standards' (oranje knop) en voor volgende parameters in:
 - kies de target voor het opstellen van de standaardcurve
 - bepaal het aantal punten dat de curve zal bevatten
 - geef het aantal herhalingen in
 - geef de starthoeveelheid in
 - kies de verdunningsfactor
 - duid de plaatsen op de well plaat aan waar de stalen zich bevinden die gebruikt worden voor het bepalen van de standaardcurve
 - klik op apply
- Duid de plaatsen op de well plaat aan waar de onbekende stalen zich bevinden
- Duid de negatieve controles aan (H₂O of TE-buffer)
- Klik op tabblad 'Run method'
- Geef als reactievolume 25µl in
- Run het volgende programma

Pre-incubatie	50°C	2min	
Denaturatie	95°C	5min	
denaturatie	95°C	10sec	} 40x
annealing-elongatie	60°C	30sec	
Post-PCR read	60°C	1min	

- Klik op 'Run' (groene knop)
- Sla de resultaten op