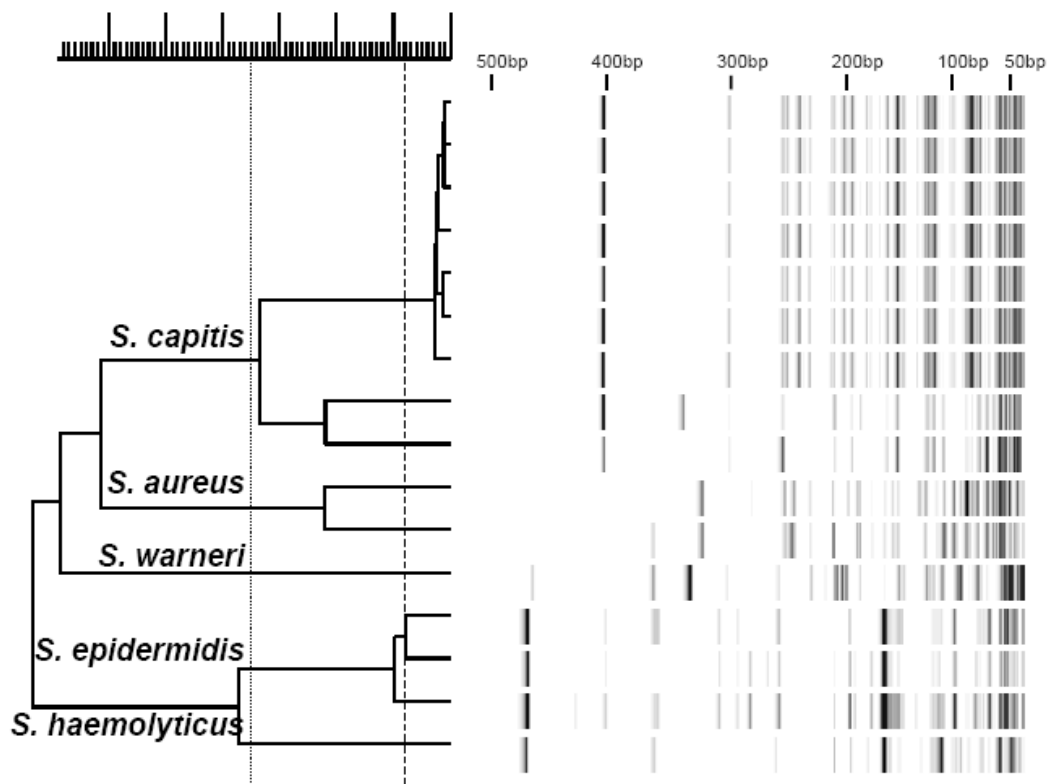


DOCUMENT GELIEVE VERTROUWELIJK BEHANDELEN

Validatie van de MM-Lysis voor DNA isolatie in het AFLP proces bij het VUmc

Tomeï, Sander

23-5-2014



Validatie van de MM-Lysis voor DNA isolatie in het AFLP proces bij het VUmc

Auteur	:	Sander Tomeï
Onderwijs instelling	:	Hogeschool Utrecht Faculteit Natuur en Techniek Life Science and Chemistry F.C. Dondersstraat 65 3572 JE Utrecht Telefoon: 088-4818283
Afstudeerrichting	:	Microbiologie
Afstudeerinstelling	:	VU medisch centrum Medische Microbiologie en Infectiepreventie De Boelelaan 1117 1081 HV Amsterdam Telefoon: 020-4444444
Begeleider	:	Ing. Madelon van der Bijl
Stage docent	:	Dr. Jorg Brunner
Periode	:	Februari – Juli 2014

Voorblad: Figuur is een voorbeeld van een dendrogram en AFLP patroon gecreëerd met capillaire elektroforese en BioNumerics.

Voorwoord

Mijn research stage op de Moleculaire Epidemiologie van het VU medisch centrum heb ik als een zeer leerzame periode ervaren. Ik heb op de Moleculaire Epidemiologie gewerkt aan de validatie van de AFLP. Echter na enkele hordes te zijn tegengekomen tijdens de validatie is de opdracht tevens voor een groot deel optimalisatie van de AFLP geworden.

Ik wil graag Madelon van der Bijl bedanken voor haar begeleiding, de kansen om mijn theorieën uit te testen en het enthousiasme voor alle proeven die ik heb uitgevoerd. Tevens zou ik graag Dries Budding willen bedanken voor een wekelijks reflectie moment en voor zijn input in het onderzoek.

In verband met de mogelijke toekomstplannen van het VUmc met de AFLP zijn delen van dit verslag gecensureerd of verwijderd.

Samenvatting

Amplified Fragment Length Polymorphisme (AFLP) is een techniek die gebruikt wordt om DNA fingerprints te maken voor genetisch onderzoek. Op het VUmc wordt de AFLP gebruikt door de Moleculaire Epidemiologie om te bepalen of patiënten zijn geïnfecteerd met het zelfde genotype pathogeen. Zo kan geconcludeerd worden of twee patiënten elkaar besmet hebben. Op deze manier wordt AFLP toegepast in outbreak management. Tevens voert het VUmc voor externe aanvragers typeringen uit.

De AFLP methodiek is tijdrovend, echter wordt er op het VUmc gewerkt aan optimalisatie en automatisering van de AFLP om deze sneller en meer reproduceerbaar te maken. Onderdeel van dit optimaliseringsproces is de toepassing van MM-Lysis voor DNA isolatie. Voordat deze stap gemaakt kan worden moet de MM-Lysis gevalideerd worden om aan te tonen dat de methodiek betrouwbaar genoeg is.

Om een stam te valideren op MM-Lysis worden uit de database enkele in het verleden gemaakte fingerprints geselecteerd. Deze fingerprints zijn gemaakt met Qiagen kolom DNA extractie en los gepipetteerde reactie mixen voor de restrictie/ligatie en PCR. Voor de validatie wordt opnieuw een fingerprint gemaakt, echter nu met de MM-Lysis methode waarna de PCR wordt uitgevoerd met gestandaardiseerde mastermixen. De clustering en kwaliteit van de nieuwe patronen worden beoordeeld en vergeleken met de oude patronen. Voor een succesvolle validatie moet MM-Lysis een goed patroon opleveren en $\geq 90\%$ identiek zijn aan hetzelfde monster met Qiagen DNA.

Een aantal stammen is reeds succesvol gevalideerd: *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. oxytoca* en *K. pneumoniae*. *C. freundii* is na 3 pogingen nog niet succesvol gevalideerd. Uit literatuur blijkt dat dit mogelijk is te wijten aan een aantal specifieke enzymen geproduceerd door *C. freundii* welke in staat zijn om glycerol af te breken. Onderzoek naar het later toevoegen van $MgCl_2$ heeft goede resultaten op andere stammen gegeven. Mogelijk is *C. freundii* wel succesvol te valideren wanneer gebruikt wordt gemaakt van een PCR mastermix met later toegevoegde verhoogde concentratie $MgCl_2$.

Er is veel onderzoek gedaan naar optimalisatie van de AFLP en het produceren van een meer constant resultaat. $MgCl_2$ concentratie in de PCR mastermix lijkt hier een belangrijke rol in te spelen. Er is tijdens het onderzoek gevonden dat een goed AFLP patroon geproduceerd kan worden door $MgCl_2$ later toe te voegen aan een magnesiumvrije mastermix. Wanneer $MgCl_2$ en mastermix apart worden gehouden tot gebruik, kunnen beide ook ingevroren worden zonder kwaliteitsverlies.

Abstract

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) is a technique used to make DNA fingerprints for genetic research. At the VUmc, AFLP is used by the department of Molecular Epidemiology to determine whether patients are infected by an identical pathogen. This way it can be concluded whether two patients have infected each other or not. By using AFLP in such a manner it can be applied in outbreak management. Furthermore the VUmc also handles external requests for genotyping.

AFLP is a time consuming method, however at the VUmc they are working on optimising the AFLP to make it faster and more reproducible. Part of the optimisation process is the application of MM-Lysis for DNA isolation. Before this step can be made, MM-Lysis must be validated to prove the method is reliable enough.

To validate a species for use with MM-Lysis, first several previously made fingerprints are selected from the existing database. These fingerprints were made with Qiagen column DNA extraction and amplified with a mastermix that was made on the fly. A newly made fingerprint will be validated, which is made with the MM-Lysis method instead of Qiagen column extraction and a standardized, pre-fabricated mastermix. The clustering and quality of the new patterns will be compared to the old patterns. For a successful validation the MM-Lysis method must result in a good pattern which is $\geq 90\%$ identical to the same sample isolated with Qiagen

The samples which have been successfully validated include: *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. oxytoca* en *K. pneumoniae*. *C. freundii* has not been successfully validated as of yet. Literary study reveals this may possibly be because of an enzyme *C. freundii* possesses which can degrade glycerol. Another explanation would be that because *C. freundii* had not been tested on the PCR mastermix with post added high concentration $MgCl_2$.

Plenty of research had been conducted to optimise the AFLP and to produce more constant results. $MgCl_2$ concentration appears to be a key factor in this. It also had been proven that a good AFLP pattern can be produced by adding $MgCl_2$ to a magnesium free mastermix. When $MgCl_2$ and mastermix are being kept separate until use, both can be stored in the freezer without quality loss.

Afkortingen

AFLP	Amplified fragment length polymorphisme
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MgCl ₂	Magnesium chloride
MM-lysis	Mega Magic Lysis
PCR	Polymerase chain reaction
VUmc	VU medisch centrum

Inhoud

Voorwoord	2
Samenvatting.....	3
Abstract	4
Afkortingen.....	5
1 Inleiding	7
2 Materiaal en Methode	10
2.1 Principe.....	10
2.2 DNA isolatie	10
2.3 Restrictie & Ligatie.....	10
2.4 PCR.....	10
2.5 Elektroforese	11
2.6 Dataverwerking	11
2.7 validatie methodiek.....	11
3 Resultaten.....	12
3.1 Validatie resultaten	13
3.1.1 <i>C. freundii</i>	13
3.1.2 <i>E. faecalis</i>	15
3.1.3. <i>E. faecium</i>	15
3.1.4 <i>K. pneumoniae</i> en <i>K. oxytoca</i>	16
3.2 Optimalisatie resultaten.....	19
3.2.1 Verhoging concentratie Taq polymerase en DNTP's in PCR mastermix.....	19
3.2.2 Verhoging concentratie restrictie enzymen in Restrictie/Ligatie mastermix.....	19
3.2.3 Vervanging van alle reactie componenten.....	19
3.2.4 Testen van het gebruikte PCR apparaat	19
3.2.5 Verbetering van de AFLP robuustheid.....	19
3.2.6 MgCl ₂ concentratie in PCR mastermix.....	21
4 Discussie	24
4.1 validatie discussie	24
4.2 Optimalisatie discussie	24
5 Conclusie	25
6 Literatuurlijst	26

1 Inleiding

AFLP op het VUmc wordt gebruikt om een micro-organisme te typeren door het maken van een fingerprint. Een fingerprint is een digitaal bandenpatroon van het genoom gemaakt van fragmenten geknipt DNA in de range van 60-600 baseparen. De gemaakte fingerprint van een micro-organisme wordt vergeleken met de fingerprint van een ander micro-organisme. Dit om te bepalen of het om een genotypisch identiek isolaat gaat. Wanneer de stammen identiek zijn en het om patiënten monsters gaat kan geconcludeerd worden dat beide patiënten zijn geïnfecteerd met hetzelfde micro-organisme. Dit is nuttig wanneer een serie van infecties mogelijk niet losstaand zijn maar een uitbraak van bacteriën met het zelfde genoom zijn.

Bij de AFLP-techniek wordt het DNA uit het micro-organisme geïsoleerd en gezuiverd. Vervolgens wordt het geïsoleerde DNA met restrictie-enzymen geknipt (Stap 1 in figuur 1). Het knippen van het genoom levert een typerend patroon voor het micro-organisme. Echter is de hoeveelheid fragmenten nog te groot voor een leesbare fingerprint. Om deze reden wordt aan de fragmenten een adapter geligeerd met een bekende sequentie (Stap 2 in figuur 1). Vervolgens wordt een PCR uitgevoerd op de mix van fragmenten. Hiervoor wordt een primer gebruikt die de adaptermoleculen herkent maar een aantal basen langer is dan het adaptermolecuul (Stap 3 figuur 1). Op deze wijze worden enkel de fragmenten geamplificeerd welke geligeerd zijn met een adapter (Stap 4 figuur 1). Dit heet selectieve amplificatie wat het bandenpatroon versimpeld en beter afleesbaar maakt. Dit heeft tevens als voordeel dat wanneer andere adaptors en primers worden geselecteerd er van hetzelfde genoom gemakkelijk anderen patronen gecreëerd kunnen worden^{1,2,3,4}.

Total genomic DNA

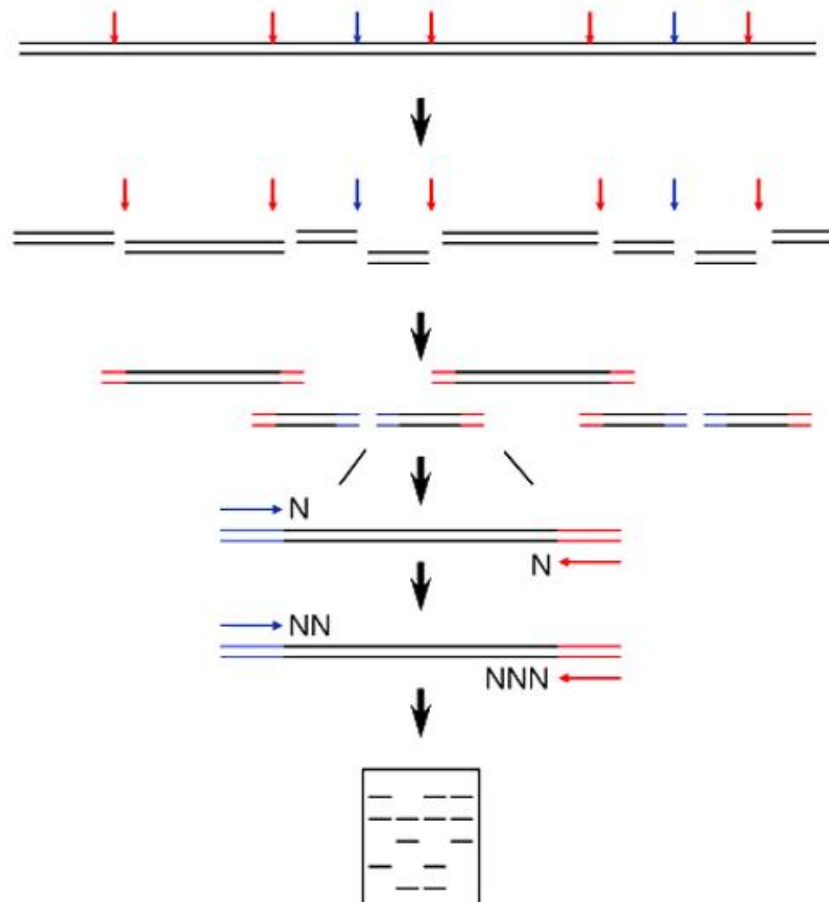
(1) Restriction digestion

(2) Adapter ligation

(3) Pre-amplification

(4) Selective amplification

(5) Gel electrophoresis



Figuur 1: schematische weergave van het AFLP proces

De AFLP is in staat om een compleet fingerprint van een genoom te maken en kan als zeer gevoelig en reproduceerbaar beschouwd worden. Daarom wordt de techniek dan ook veel gebruikt om de genetische variatie in verwante species te identificeren. Andere toepassingen zijn te vinden in vaderschapsonderzoeken en crimineel onderzoek³.

Voordelen van de AFLP op andere identificatie technieken zoals Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) en Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) zijn de hoge reproduceerbaarheid, resolutie en sensitiviteit. Verdere voordelen zijn de mogelijkheden om van restrictie-enzymen/adapter combinatie te wisselen en het ontbreken van de noodzaak om vooraf al sequentie informatie te hebben^{4,5}.

Op het VUmc wordt de AFLP gebruikt op de eenheid Moleculaire Epidemiologie (MEP) van de afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie om stammen die zijn geïsoleerd uit patiënten te typeren. Dit wordt gedaan om te bepalen of twee patiënten zijn geïnfecteerd met het zelfde genotype micro-organisme. Wanneer dit het geval is kunnen conclusies getrokken worden aan de hand van de resultaten, zo kan geconcludeerd worden of twee patiënten elkaar besmet hebben of dat er wel of geen transmissie plaats heeft gevonden. Op deze manier word de AFLP toegepast in outbreak management en als beslissende factor of een patiënt in (of uit) contactislatie wordt geplaatst. Tevens voert het VUmc voor externe aanvragers typeringen uit, al dan niet voor outbreak management of research toepassingen.

Een snelle AFLP is dus een sterk middel om uitbraken van pathogene micro-organisme te identificeren. Echter is de AFLP een complexe techniek met meerdere verwerkings- en incubatiestappen. In het verleden duurde het uitvoeren van de AFLP drie dagen. Met een dergelijke verwerkingstijd kan het resultaat te laat komen of ligt een patiënt onnodig lang in de contactislatie. Het doel voor het VUmc was dan ook om de totale tijd voor het uitvoeren van een AFLP terug te brengen naar één dag, en om de reproduceerbaarheid van de resultaten te vergroten.

Een grote stap in dit optimaliseringsproces was de toepassing van MM-Lysis als vervanging voor de standaard DNA isolatie.

In het verleden werd aangenomen dat voor de AFLP zuiver DNA nodig was⁶. Echter, na verschillende experimenten bleek dat de snellere, maar minder zuivere, MM-Lysis goede fingerprint patronen opleverde in de AFLP. En na meerdere herhalingen op verschillende micro-organisme bleek de MM-Lysis methode keer op keer zuiver genoeg DNA op te leveren.

Dit was aanleiding voor de afdeling MEP om van Qiagen DNA isolatie over te stappen naar MM-Lysis. Dit resulteert in een goedkopere, tijdbesparende en een minder bewerkelijke techniek.

Echter kan niet zomaar een nieuwe techniek in gebruik worden genomen. Om een kwaliteitsstandaard te kunnen garanderen dient dan eerst een validatie te worden uitgevoerd.

Tegelijkertijd met het invoeren en valideren van de MM-Lysis worden tevens gestandaardiseerde mastermixen ingevoerd. Hiermee worden verdere stappen gezet naar een snellere, minder bewerkelijke, meer reproduceerbare AFLP techniek. Het invoeren van mastermixen voor de restrictie/ligatie stap en de PCR moet het los pipetteren van deze reacties uitsluiten. Doel hiervan is constante kwaliteit van de mixen, tijdswinst en vermindering van het aantal pipetteerfouten en dus een snellere, meer betrouwbare uitslag. Tevens is met mastermixen de onderlinge variatie tussen monster uit dezelfde reeks te verkleinen, waardoor resultaten door de tijd heen vergelijkbaar blijven. De mastermixen dienen net als de MM-Lysis gevalideerd te worden.

Tijdens het validatie proces van de MM-Lysis en de mastermixen is er ook gewerkt aan de optimalisatie van deze methode. De praktijk heeft namelijk uitgewezen dat er tijdens het valideren

van een methodiek onverwachte resultaten waargenomen kunnen worden. De uitdaging is dan ook om deze resultaten correct te interpreteren en aan de juist vervolg onderzoeken te onderwerpen.

2 Materiaal en Methode

In dit hoofdstuk komen materiaal, methode en principe van de AFLP aan bod.

2.1 Principe

AFLP wordt gebruikt om een micro-organisme te 'fingerprinten'. Een fingerprint is een digitaal bandenpatroon van een gedigesteerd genoom en selectief geamplificeerde fragmenten DNA in de range van 60-600 baseparen. De gemaakte fingerprint van een micro-organisme wordt vergeleken met de fingerprint van een ander micro-organisme.

2.2 DNA isolatie

DNA word geïsoleerd volgens de MM-Lysis methodiek (Microbiome, Amsterdam). De MM-Lysis methode is een snelle en eenvoudige isolatie methode (<5 min) ten opzichte van de voorheen gebruikte methodiek, de QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) (tijdsduur 3 uur). De QIAamp DNA Mini Kit vereist een voorincubatie (enkel voor gram postieve micro-organismen), een serie was- en centrifuge stappen en een elutiestap voordat zuiver DNA is verkregen.

DNA isolatie via MM-Lysis gaat als volgt in zijn werk:

200µl MM-Lysis buffer wordt in een 1.5 ml epje gepipetteerd. Vanaf een reïncultuur van de te isoleren stam wordt één entooeg bacterie in de MM-Lysis gesuspenderd. Vervolgens wordt 15 seconden gevortext. Na het vortexen wordt het epje 3 minuten afgedraaid bij 14000 rpm en van het supernatant wordt 50µl in een nieuw epje gepipetteerd. Het supernatant bevat het lysaat met geïsoleerd DNA en kan direct worden gebruikt of ingevroren bij -20°C.

2.3 Restrictie & Ligatie

De restrictie van het genoom en de adapter ligatie gebeurt in één incubatie stap van drie uur. Restrictie gebeurt met ongeveer 10 ng DNA. De gebruikte restrictie enzymen zijn EcoR1 (New England Biolabs) en Mse1 (New England Biolabs). De knipsites voor deze enzymen zijn:

EcoR1 5'...G AATTC...3' 3'...CTTAA G...5'

Mse1 5'...T TAA...3' 3'...AAT T...5'
--

Na restrictie van het genoom worden adapters geligeerd welke een EcoR1 of Mse1 overhang hebben. Hiervoor worden EcoAD (Eurogentec) en MseAD (Eurogentec) gebruikt. De adaptersequenties zijn:

EcoAD 5'...CTCGTAGACTGCGTACC...3' 3'.....CATCTGACGCATGGTTAA...5'
--

MseAD 5'...TACGATGAGTCCTGAG...3' 3'.....TACTCAGGACTCAT...5'

Voor de restrictie en ligatie wordt een vooraf gemaakte mastermix gebuikt (Microbiome Amsterdam), de mastermixen worden uitgevult in epjes met genoeg mix om 8 reacties uit te voeren.

Per reactie word aan de 5 µl mastermix 5 µl van het DNA uit de DNA isolatie stap toegevoegd en 3 uur geïncubeerd bij 37°C. Na incubatie word het product 20X verdunt met aquadest (Promega). Het verdunde restrictie product kan in de koelkast bewaard worden bij 4°C.

2.4 PCR

De amplificatie van het restrictie product gebeurt in een Perkin Elmer 9700 GeneAmp PCR System (Applied Biosystems). De gebruikte primers zijn MseC (Eurogentec) en EcoA-FAM (Eurogentec) deze primers zijn specifiek voor de adaptoren welke aan de DNA fragmenten zijn geligeerd. Er is 1 primer gelabeld met een FAM-label. FAM of Carboxyfluorescein, is een label dat nodig is bij de detectie door een laser van de fragmenten tijdens de scheiding d.m.v. capillaire elektroforese.

Voor de PCR reactie wordt tevens een vooraf gemaakte mastermix gebuikt (Microbiome Amsterdam), de mastermixen worden uitgevuld in epjes met genoeg mix om 8 reacties uit te voeren.

Voor het uitvoeren van de PCR reactie wordt 5µl van het verdunde restrictie product gepipetteerd bij 5µl mastermix. De amplificatie gebeurt middels een touch-down PCR (zie tabel 1), een touch-down PCR verminderd a-specificiteit. Het PCR product kan in de koelkast bewaard worden bij 4°C.

Tabel 1: PCR programma voor de AFLP

Temperatuur in graden Celsius	Duur in seconden	Aantal cycli
72	120	1 cycli
94	30	12 cycli, temperatuur 0.7°C naar beneden
65	30	
72	60	
94	30	23 cycli
56	30	
72	60	
72	600	
4	∞	1 cycli

2.5 Elektroforese

Na het uitvoeren van de amplificatie wordt het amplicon 'opgekookt'. Dit houdt in dat aan 2.5 µl PCR product, 22 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) en 0.5 µl 600 LIZ marker (Applied Biosystems) wordt toegevoegd. Vervolgens wordt dit drie minuten lang verhit tot 96°C om het DNA enkelstrengs te maken. Vervolgens word het opgekookte product snel afgekoeld met behulp van een ijsbad, de formamide zorgt nu dat het DNA enkelstrengs blijft. De plaat wordt kort afgedraaid om eventuele luchtballen te verwijderen. De monsters worden vervolgens in de ABI 3130XL (Applied Biosystems) geplaatst. Het monster migreert door de capillaire met POP7 (Applied Biosystems) door elektroforese en de fragmenten worden op grootte gescheiden. Een laser aan het eind van de capillairen detecteert wanneer er een fragment met fluorescerend label langs de laser migreert⁷.

2.6 Dataverwerking

De data afkomstig van de ABI 3130XL sequencer word met behulp van Genescan (Applied Biosystems) bewerkt. Achtergrond ruis word onderdrukt en de signalen worden verhoogd. Vervolgens kan deze data met behulp van BioNumerics 6.6 (Applied Maths) worden geanalyseerd. Bij ieder monster is een interne 600 LIZ marker mee-geëlektroforeerd, aan de hand van deze marker kan het patroon worden genormaliseerd. Vervolgens worden de signalen van het monster gekoppeld aan de genormaliseerde marker zodat ook het monster genormaliseerd wordt. Een spectraalanalyse wordt uitgevoerd om achtergrond signaal te berekenen en te corrigeren, zodat alleen werkelijk signaal overblijft. De AFLP patronen van de monsters zijn nu onderling te vergelijken. Tevens kan op de patronen nu een clusteranalyse worden uitgevoerd welke is gebaseerd op UPGMA, aan de hand van deze clusteranalyse word een dendrogram berekend⁷.

2.7 validatie methodiek

Voor de validatie van de AFLP zijn de 13 meest aangevraagde species geselecteerd (zie tabel 2). Wanneer één van deze gevalideerd is met de nieuwe methodiek mag deze species door de diagnostiek direct worden uitgevoerd met mastermix en de MM-Lysis methode. Wanneer de 13 meest aangevraagde species gevalideerd zijn wordt aangenomen dat de vernieuwde AFLP methodiek op alle species gebruikt kan worden.

Tabel 2: De 13 meest aangevraagde species waarop vernieuwde AFLP methodiek gevalideerd moet worden. Species met een * zijn reeds gevalideerd met MM-lysis en los gepipetteerde reactie mixen. Deze zijn al in de diagnostiek geïmplementeerd.

Soort:	Species:
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i> *
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae, aerogenes</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis, faecium, gallinarum</i>
<i>Escheria</i>	<i>coli</i> *
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae, oxytoca</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i> *
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> *
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae, pyogenes, agalactiae</i>

Om een stam te valideren met MM-Lysis methode en mastermix, wordt uit de database van BioNumerics een serie in het verleden gemaakte fingerprints geselecteerd. De fingerprints zijn gemaakt met Qiagen DNA extractie in combinatie met los gepipetteerde restrictie/ligatie en PCR reactie mixen. De bacteriën die bij de fingerprints horen zijn opgeslagen in glycerol in de -80°C vriezer. Deze worden op plaat gekweekt en van de stammen wordt opnieuw een fingerprint gemaakt, echter nu met MM-Lysis methode en gestandaardiseerde mastermixen voor de restrictie/ligatie en PCR. De clustering en kwaliteit van de nieuwe patronen worden beoordeeld en vergeleken met de oude patronen.

Voor een succesvolle validatie dient de nieuwe methodiek een patroon te geven dat van goede kwaliteit is. Dit houdt in dat het patroon goede afleesbare bandjes dient te hebben. Het patroon dient vergelijkbaar te zijn met het patroon gemaakt met Qiagen geïsoleerd DNA en vers gemaakte mixen. Tevens wordt de clustering van de patronen beoordeeld. Dit houdt in dat er in BioNumerics een dendrogram en een vergelijking van de patronen wordt gemaakt zoals beschreven in paragraaf 2.6. Het genetische verwantschap tussen identieke monsters wordt vergeleken. Voor een succesvolle validatie moeten identieke monsters opgewerkt volgens de nieuwe en oude methodiek eenzelfde clustering vertonen.

3 Resultaten

3.1 Validatie resultaten

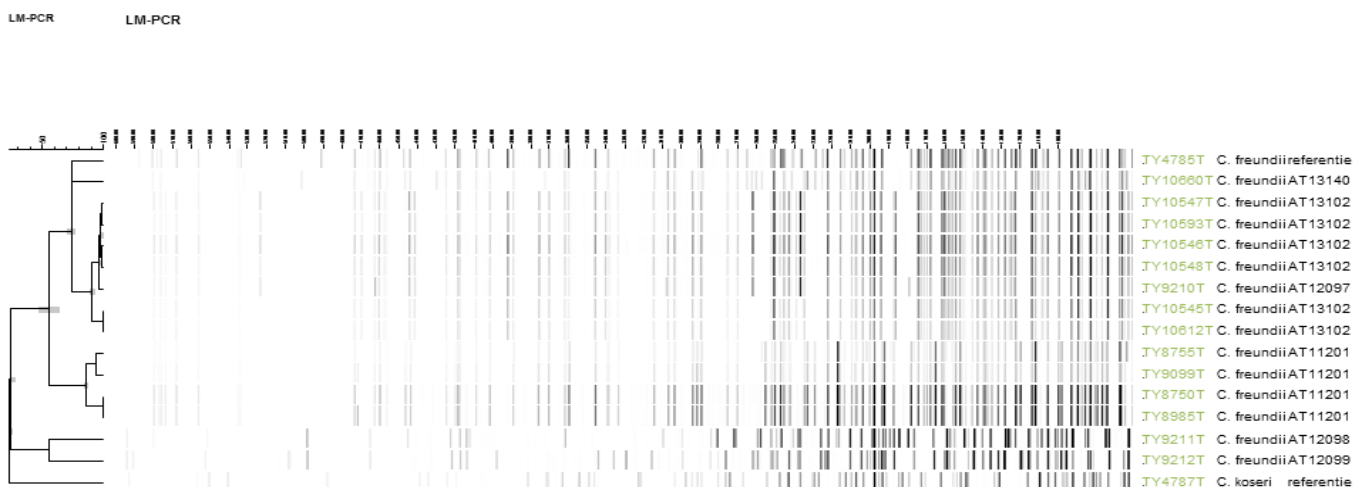
3.1.1 *C. freundii*

Voor de validatie van *C. freundii* zijn uit de database 16 in het verleden gemaakte AFLP profielen geselecteerd. Van deze AFLP's is één figuur opgesteld (Zie figuur 2). In het figuur is gekozen om één cluster van zes identieke stammen mee te nemen plus één cluster van vier stammen. Tevens zijn er vier onafhankelijk stammen en twee referentie stammen meegenomen.



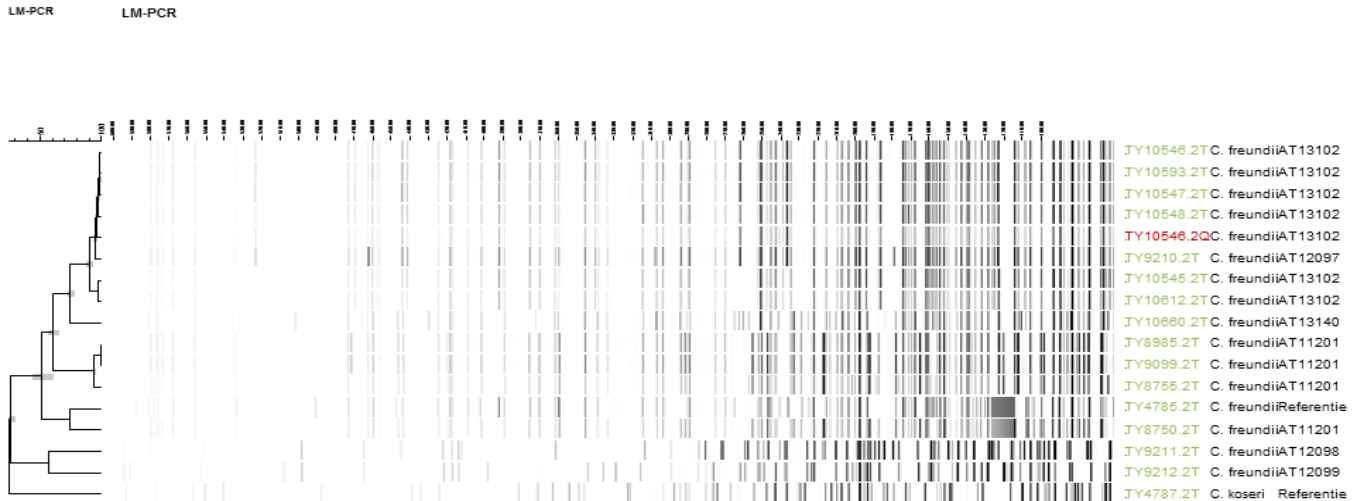
Figuur 2: uit de database geselecteerde stammen met d.m.v Qiagen geïsoleerd DNA.

De eerste run om *C. freundii* te valideren is volgens de normale werkwijze gedaan zoals beschreven in 'Materiaal en Methode'. Het resultaat voldeed niet aan de van te voren gestelde criteria voor een succesvolle validatie (zie figuur 3). De banden in het figuur zijn erg licht en worden lichter naarmate de fragmentlengte toeneemt.



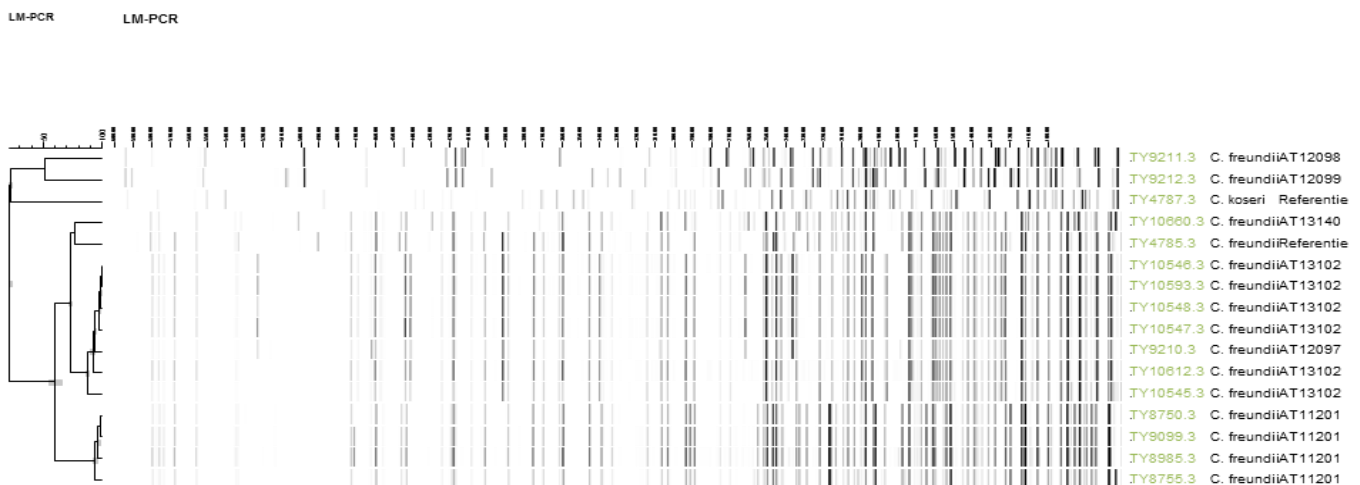
Figuur 3: Run van de geselecteerde stammen waarbij het DNA is geïsoleerd d.m.v. MM Lysis.

Vervolgens is de AFLP herhaald met een Qiagen controlestam (rood) (Zie figuur 4). Herhaling van de AFLP gaf het zelfde resultaat als voorheen. Opvallend is de Qiagen controlestam welke tevens een licht patroon geeft.



Figuur 4: Herhaling van de 1^e run met de 16 geselecteerde stammen waarvan DNA is geïsoleerd m.b.v. MM-Lysis, plus één stam geïsoleerd met Qiagen ter controle.

De grote hoeveelheid kleine fragmenten lijken te leiden tot PCR competitie. Er werden nieuwe mastermixen gemaakt met 100% meer Taq polymerase, dNTP's en Restrictie enzymen. Vervolgens is de AFLP herhaald. Het resultaat (Zie figuur 5) is een ietwat duidelijker patroon, echter nog steeds niet scherp en donker genoeg.



Figuur 5: 3^e Run met nieuwe mastermixen met 100% meer Taq polymerase, dNTP's en Restrictie enzymen.

De resultaten voldeden wederom niet aan de eisen. Er zijn meerdere kleine aanpassingen gedaan in de mixen en het AFLP proces. Er is meerdere malen opnieuw *C. freundii* DNA geïsoleerd om hierop AFLP te verrichten. Goede resultaten bleven echter uit, dit heeft geleid tot een literatuuronderzoek. Resultaat van het literatuur onderzoek is dat *C. freundii* in staat is om in aanwezigheid van glycerol

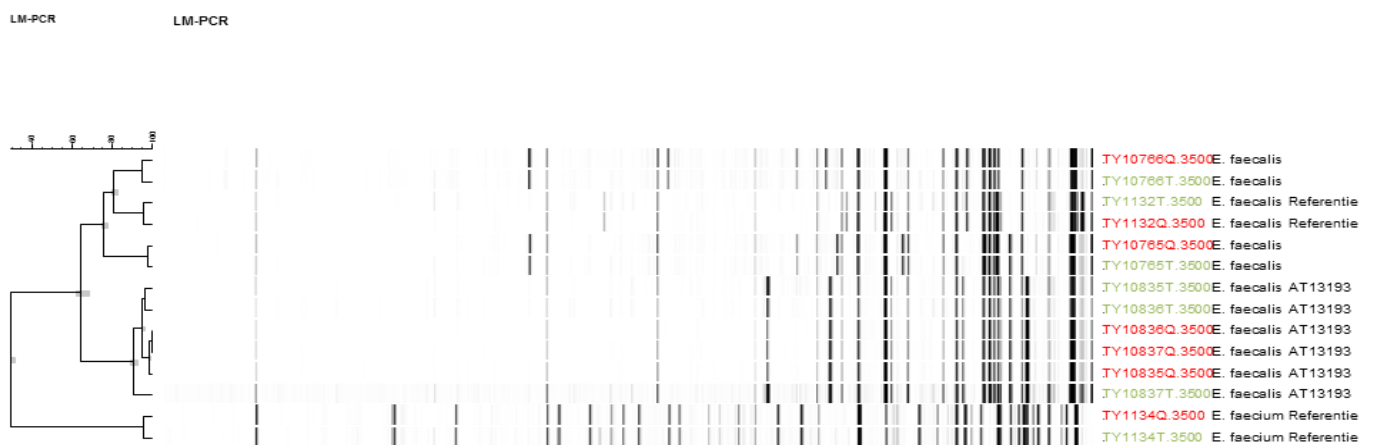
een eiwit af te schrijven wat glycerol fermenteert tot 1,3-propanediol^{8,9,10}. Aan de hand hiervan werd de hypothese gesteld dat het afgeschreven eiwit of het gevormde 1,3-propanediol stoort met de reactiemixen van de AFLP welke glycerol bevatten.

Er is in verband met tijd besloten om verder te gaan met andere stammen en later terug te komen op de *C. freundii*.

3.1.2 *E. faecalis*

Voor de validatie van *E. faecalis* zijn uit de database zeven AFLP profielen geselecteerd. Van deze AFLP's is tezamen met de MM-Lysis methode één figuur opgesteld (Zie figuur 6). In het figuur is gekozen om één cluster van drie stammen mee te nemen. Tevens zijn er twee onafhankelijke stammen en twee referentie stammen meegenomen.

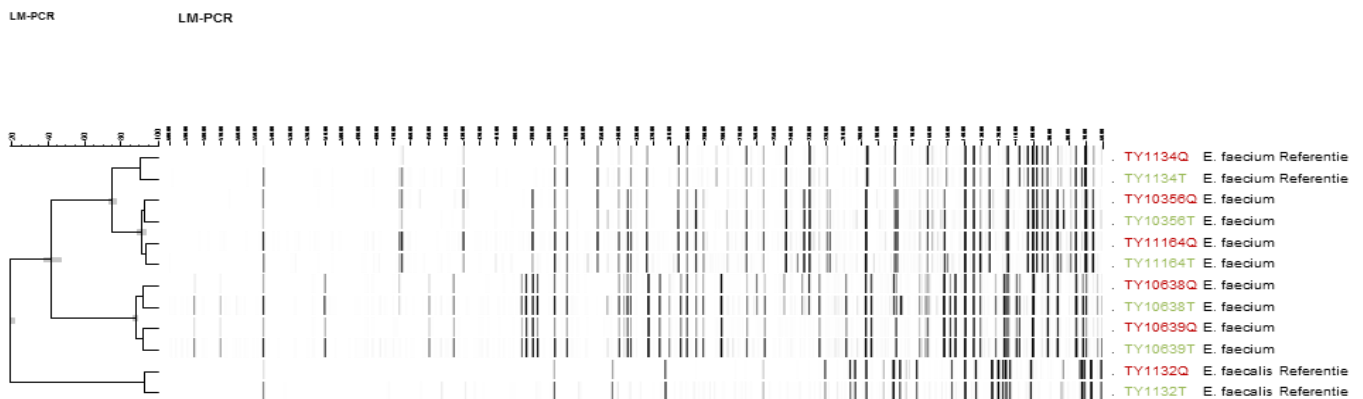
De clustering tussen Qiagen DNA (rood) en MM-Lysis Methode (groen) DNA is goed, tevens geven beide DNA extracties een vergelijkbaar en goed afleesbaar patroon.



Figuur 6: AFLP patroon van *E. faecalis* met Qiagen (rood) en MM-Lysis methode (groen). Fingerprint heeft een afleesbaar patroon en goede clustering.

3.1.3. *E. faecium*

Validatie van *E. faecium* is gebaseerd op zes met Qiagen DNA uitgevoerde AFLP reacties. Stammen van deze monsters zijn opnieuw opgekweekt en DNA is geïsoleerd met MM-Lysis methode. AFLP is uitgevoerd op deze monsters en de resultaten zijn weergegeven in figuur 7. De clustering tussen Qiagen DNA (rood) en MM-Lysis methode (groen) is goed, tevens geven beide DNA extracties een vergelijkbaar en goed afleesbaar patroon.



Figuur 7: AFLP patroon van *E. faecium* met QiaGen DNA (rood) en MM-Lysis methode (groen). Fingerprint heeft een afleesbaar patroon en goede clustering.

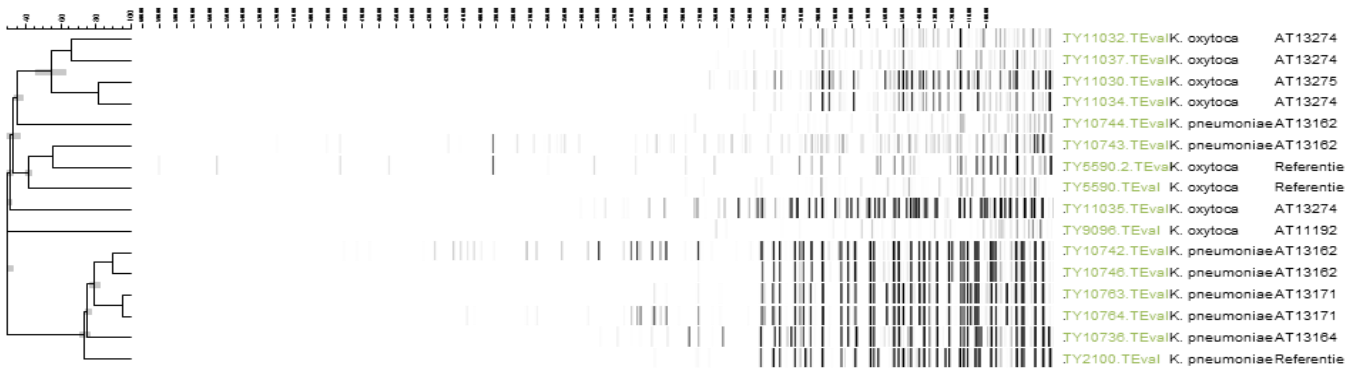
3.1.4 *K. pneumoniae* en *K. oxytoca*

Er is getracht om *K. pneumoniae* en *K. oxytoca* in één keer te valideren met MM-Lysis methode. Hiervoor zijn 16 stammen geselecteerd uit de BioNumerics database die met QiaGen DNA goede patronen gaven (Zie figuur 8). Bij zowel *K. pneumoniae* als *K. oxytoca* is een cluster van vier identieke stammen meegenomen. Er is tevens één *K. pneumoniae* cluster van 2 identieke stammen meegenomen. Verder zijn drie onafhankelijke *K. oxytoca* stammen meegenomen en één onafhankelijke *K. pneumoniae* stam. Twee referentie stammen van beide micro-organismen zijn ook meegenomen in de test.



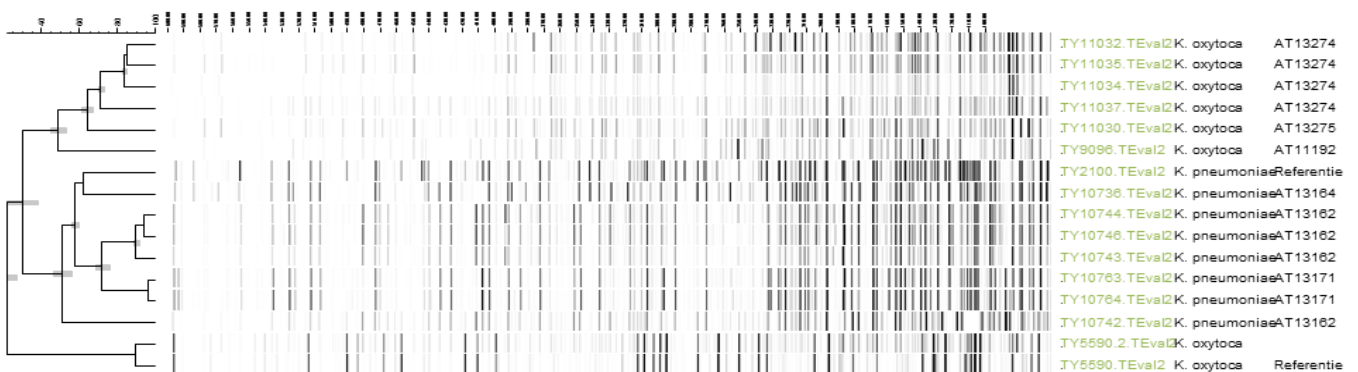
Figuur 8: Uit database geselecteerde, stammen die met QiaGen DNA een goed patroon gaven voor validatie van de TE-Lysis methode

De eerste run om *K. pneumoniae* en *oxytoca* te valideren leverde tegenvallende resultaten op (zie figuur 9). De banden zijn niet afleesbaar en clustering incorrect.



Figuur 9: Resultaten eerste validatie poging van *K. pneumoniae* en *oxytoca*.

De validatie is herhaald (zie figuur 10). Echter na het uitvoeren van de capillairelektroforese leek het volume in de 96 wells plaat bij de meeste monsters te zijn toegenomen. Mogelijk is er smeltwater van het ijsbad in de epjes gelopen na het opkoken van de stammen.

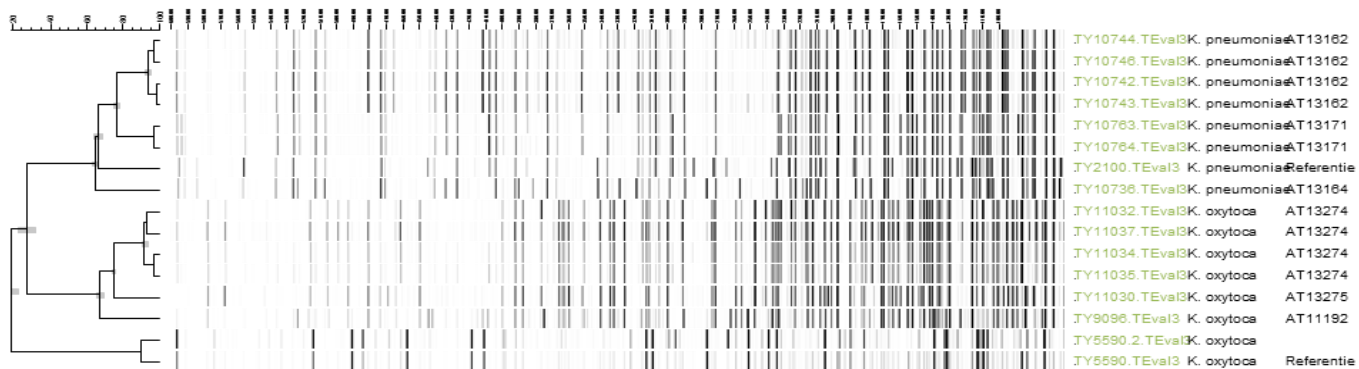


Figuur 10: resultaten van de herhaalde *Klebsiella* validatie

De relatief goede patronen in figuur 10 ondanks de vreemde volumina in de wells waren reden om direct een herhaling van het experiment in te zetten (zie figuur 11). Deze resultaten zijn goed, patroon is duidelijk en de clustering correct.

LM-PCR

LM-PCR



Figuur 11: Herhaling van de validatie met goede patronen en correcte clustering

3.2 Optimalisatie resultaten

Er is veel tijd besteed aan het optimaliseren van de AFLP. Reden hiervoor zijn tegenvallende en wisselvallende resultaten tijdens het valideren van de AFLP. Hieronder zijn de uitgeteste optimalisatie stappen weergegeven. Motivatie achter de proef en het resultaat.

3.2.1 Verhoging concentratie Taq polymerase en DNTP's in PCR mastermix

Na aanleiding van tegenvallende resultaten in (gram negatieve) bacteriën die veel fragmenten produceren in de restrictie/ligatie stap. Is uitgetest of een verhoging van de concentratie Taq polymerase en DNTP's het fingerprint patroon zou verbeteren. Dit is gedaan aan de hand van de hypothese dat door de grote hoeveelheid kleine fragmenten in gram negatieve bacteriën, PCR competitie het lichte patroon veroorzaakt in de regio van de fingerprint met de langere fragmenten.

Er is een nieuwe mastermix gemaakt met dubbele eindconcentratie Taq polymerase en DNTP's. Resultaten waren vergelijkbaar met de reguliere mastermix en de concentraties zijn weer naar beneden bijgesteld.

3.2.2 Verhoging concentratie restrictie enzymen in Restrictie/Ligatie mastermix

Nadat de verhoging van de concentratie Taq polymerase en DNTP's geen effect leek te hebben is onderzocht of de oorzaak in de Restrictie/Ligatie stap zou zitten. De redenvoering voor dit experiment was dat het aantal knipsites voor grote fragmenten minder aanwezig zijn op het chromosomaal DNA. Verhoging van de enzym concentratie zou meer fragmenten opleveren wat voor betere amplificatie in de PCR stap zou zorgen.

De concentratie van Mse1 en EcoR1 in de Restrictie/Ligatie mastermix is verdubbeld en er is AFLP uitgevoerd. Resultaten waren overeenkomstig met voorheen geboekte resultaten.

3.2.3 Vervanging van alle reactie componenten

Alle reactie componenten van de beide mastermixen en de MM-Lysis zijn vervangen. Tevens zijn de capillairen in de sequencer vervangen en is er een nieuwe batch epjes gebruikt. De hierop volgende AFLP reacties lieten geen constante verbetering in de resultaten zien.

3.2.4 Testen van het gebruikte PCR apparaat

De PCR machine die wordt gebruikt voor de AFLP is al enige jaren oud, mogelijk is de ramptime toegenomen of is de temperatuur sensor niet accuraat meer. Er is onderzocht of het AFLP patroon zou verbeteren wanneer de zelfde reacties worden uitgevoerd op andere PCR apparaten. Er is gekozen om de PCR machine te vergelijken met een alternatieve PCR machine van het zelfde model en een nieuwer model PCR met een significant kortere ramptime. De drie resulterende patronen lieten geen duidelijk verschil in kwaliteit zien. Wel is opgemerkt dat de totale tijd voor het uitvoeren van de PCR op het nieuwe model PCR 40 minuten korter is. Dit kan bijdragen aan het doel om de AFLP in één dag uit te voeren.

3.2.5 Verbetering van de AFLP robuustheid

Omdat de resultaten niet continu slecht zijn, is besloten om de te testen wat robuustheid vergrotende maatregelen voor effect hebben op de AFLP. Redenering hierachter is dat doordat de methodiek niet robuust genoeg is resultaten erg wisselend zijn. De uitgeteste maatregelen waren:

-Volume vergroting van de mastermix en het DNA:

Redenering achter het vergroten van het eind volume van 10 µl (5µl mastermix en 5µl DNA) naar 20 µl is dat wanneer er een afwijking in de pipetten of het gepipetteerde volume zit dit een minder procentueel effect op het eindvolume van de reactie geeft. Aanleiding voor deze maatregel is een aangetoonde afwijking in enkele van de pipetten en de logica dat 1µl afwijking in een 10µl reactie mix 10% is en in 20µl slechts 5%.

-Het gebruik van dunwandige PCR epjes:

Dunwandige kleine PCR epjes gebruiken voor incubatie tijdens de restrictie/ligatie stap en PCR zou beter moeten zijn voor warmtegeleiding en mogelijk een beter resultaat produceren.

-Incubatie van restrictie/ligatie in hitteblok i.p.v. in de stoof:

Een hitteblok voor incubatie van de restrictie ligatie zou het monster sneller en efficiënter moeten verwarmen tijdens incubatie dan de huidige methodiek. Momenteel word een zandbak in de stoof gebruikt en hier worden de monsters in geplaatst.

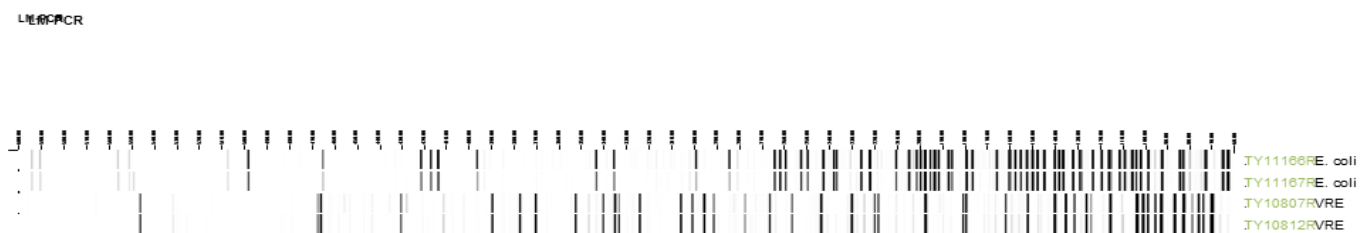
-Terugbrengen van de restrictie/ligatie incubatie tijd van 3 uur naar 1 uur:

Een verkorte restrictie/ligatie incubatie heeft in het verleden goede resultaten geproduceerd. Het verkorten van de incubatie tijd met 2 uur zou een grote stap zijn naar het doel om de AFLP in één dag uit te voeren.

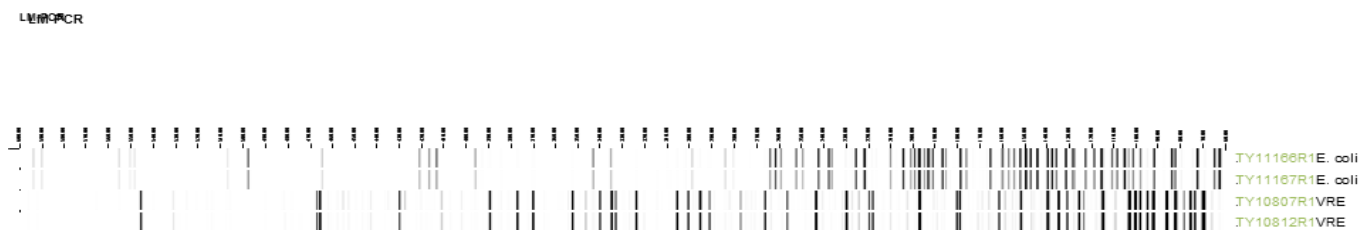
Deze drie verschillende incubatie omstandigheden zijn getest:

1. Reguliere incubatie
2. Reguliere incubatie gedurende één uur
3. Incubatie gedurende één uur in een 20µl eindvolume met dunwandige epjes in een hitteblok.

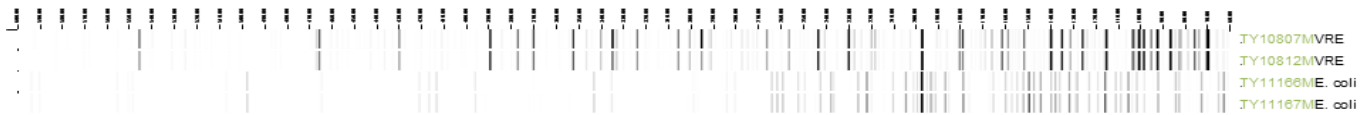
De resultaten van het onderzoek laten zien dat reguliere incubatie gedurende drie uur het beste patroon geeft (zie figuur 12). Reguliere incubatie gedurende één uur geeft een vergelijkbaar patroon, echter met lichtere bandjes (zie figuur 13). De geoptimaliseerde methodiek gaf een tegenvallend patroon(zie figuur 14).



Figuur 12: Reguliere incubatie zoals beschreven onder 'Materiaal en Methode'



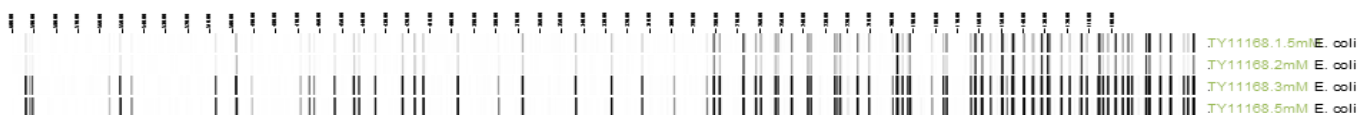
Figuur 13: Reguliere incubatie zoals beschreven onder 'Materiaal en Methode' gedurende één uur



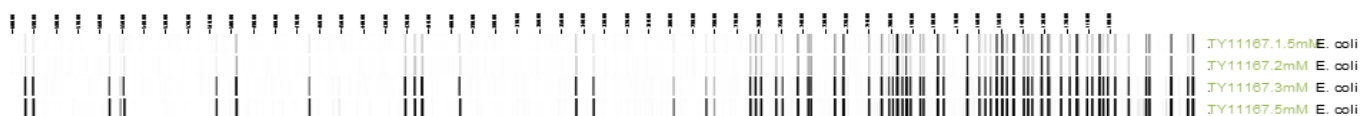
Figuur 14: Aangepaste incubatie met dunwandige epjes, incubatie gedurende één uur n een hitteblok in een 20 µl volume

3.2.6 MgCl₂ concentratie in PCR mastermix

Na continu wisselende resultaten in de optimalisatie experimenten, validatie en de diagnostiek is besloten om het effect van de MgCl₂ concentratie in PCR mastermix te onderzoeken. Er zijn vier verschillende PCR mastermixen gemaakt met concentraties 1.5mM, 2mM, 3mM, 5mM aan MgCl₂. Deze concentraties zijn uitgetest op twee verschillende *E. coli* stammen (zie figuur 15 en 16)



Figuur 15: Effect van MgCl₂ concentratie op *E. coli* stam TY11168. patroon laat zien dat een hogere concentratie (3mM en 5mM) MgCl₂ in de master mix een significant beter patroon geeft dan de standaard 1.5mM.



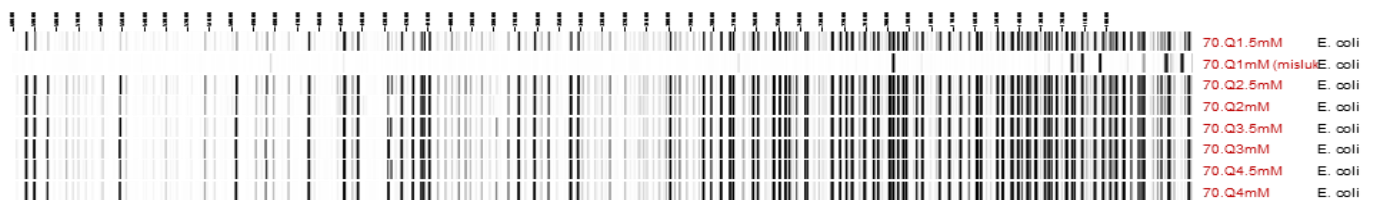
Figuur 16: Effect van MgCl₂ concentratie op *E. coli* stam TY11167. patroon laat zien dat een hogere concentratie (3mM en 5mM) MgCl₂ in de master mix een significant beter patroon geeft dan de standaard 1.5mM.

De resultaten van de MgCl₂ concentratie verhoging zagen er zeer veelbelovend uit. Echter wanneer de proef herhaald werd waren de resultaten niet reproduceerbaar.

In de literatuur is beschreven hoe de concentratie MgCl₂ is gedaald in een buffer met als startwaarde 1.5mM naar 0.9mM na opslag in de vriezer. Invriezen en ontdooien leidt mogelijk tot precipitatie vorming en accumulatie van MgCl₂ in onoplosbare vorm¹¹. Dit is te linken aan de wisselende resultaten van de MgCl₂ concentratie proef. Wanneer de mastermixen vers gemaakt waren zijn deze direct gebruikt om de AFLP mee uit te testen, dit leverde goede resultaten op. Toen de proef herhaald is, om reproduceerbaarheid te testen, is de mix in de vriezer opgeslagen geweest en de resultaten voldeden niet aan de eisen.

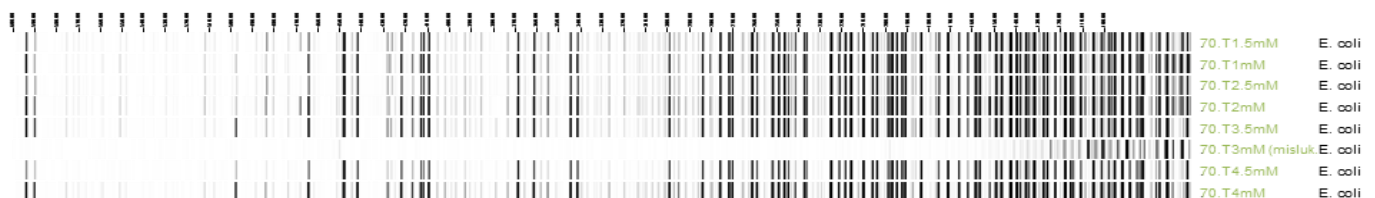
Er is besloten de proef te herhalen echter nu met Qiagen en MM-Lysis methode. De mastermix is gedurende 15 seconden gevortext en compleet tot kamertemperatuur gebracht voor gebruik. Tevens zijn alle monsters ook met een hotstart PCR uitgevoerd omdat in het artikel vermeld wordt hoe na verhitting naar 90°C voor 10 minuten de magnesium concentratie zich weer herstelt¹¹. Het resultaat is dat ongeacht de MgCl₂ concentratie het patroon verbeterd lijkt (zie figuur 17 t/m 20). Tevens lijkt de hotstart PCR geen effect te hebben in vergelijking met reguliere PCR (Zie figuur 19 en 20).

LM-PCR



Figuur 17: MgCl₂ concentratie reeks met Qiagen DNA. In het figuur zijn 8 verschillende concentraties van 1.5mM tot 1.5mM MgCl₂ vergeleken. Alle concentraties lijken een vergelijkbaar patroon te geven. Monster 70.Q1mM is mislukt, waarschijnlijk als gevolg van een pipetteerfout.

LM-PCR



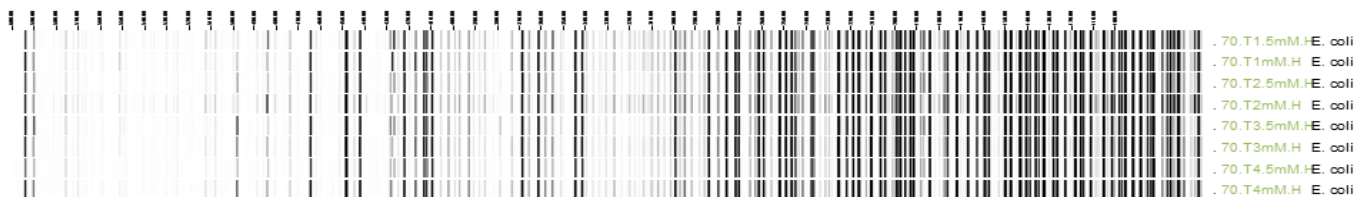
Figuur 18: MgCl₂ concentratie reeks met MM-Lysis methode. In het figuur zijn 8 verschillende concentraties van 1.5mM tot 1.5mM MgCl₂ vergeleken. Alle concentraties lijken een vergelijkbaar patroon te geven. Monster 70.T3mM is mislukt, waarschijnlijk als gevolg van een pipetteerfout.

LM-PCR



Figuur 19: $MgCl_2$ concentratie reeks met Qiagen DNA en hotstart PCR. In het figuur zijn 8 verschillende concentraties van 1.5mM tot 1.5mM $MgCl_2$ vergeleken. Alle concentraties lijken een vergelijkbaar patroon te geven. Monster 70.Q4mM.H is mislukt, waarschijnlijk als gevolg van een pipetteerfout.

LM-PCR



Figuur 20: $MgCl_2$ concentratiereeks met MM-Lysis methode en hotstart PCR. In het figuur zijn 8 verschillende concentraties van 1.5mM tot 1.5mM $MgCl_2$ vergeleken. Alle concentraties lijken een vergelijkbaar patroon te geven.

4 Discussie

4.1 validatie discussie

In dit onderzoek is getracht de MM-Lysis en gestandaardiseerde mastermixen te valideren op de 13 meest aangevraagde stammen voor de AFLP op het VUmc. Voor een succesvolle validatie moet het AFLP patroon dat gegenereerd wordt met de MM-Lysis methode vergelijkbaar zijn met Qiagen DNA. Tevens moet de software de stammen als identiek herkennen. Dit betekent een clustering van $\geq 90\%$.

De onsuccesvolle validatie van *C. freundii* lijkt na literatuur onderzoek te wijten te zijn aan de aanwezigheid van een enzym dat glycerol afbreekt. De verklaring is dat het reactie product of het enzym zelf stoort met de AFLP. Echter is de *C. freundii* na toevoeging van extra $MgCl_2$ aan de magnesiumvrije mastermix nog niet getest. Tevens zijn er in de literatuur wel goede patronen behaald met *C. freundii* op de AFLP. Dit betekent dat het wel mogelijk is om *C. freundii* AFLP uit te voeren.

De validatie van *E. faecium* en *E. faecalis* ging in één keer goed met een vergelijkbaar patroon tussen Qiagen DNA en de MM-Lysis methode en een clustering tussen beide van $\geq 90\%$. Mogelijk discussie punt is het beperkte aantal stammen dat is gebruikt in de validatie.

De validatie van *K. oxytoca* en *K. pneumoniae* heeft bij de derde validatie poging een resultaat opgeleverd dat aan de gestelde criteria voldoet. Discussiepunt is net als bij de validatie op *E. faecalis* en *E. faecium* dat de validatie op een klein groepje stammen is uitgevoerd. Tevens is een discussiepunt dat er veel achtergrond ruis in het AFLP patroon is waargenomen. Mogelijke verklaring hiervoor is dat er verontreiniging heeft plaatsgevonden in de AFLP.

4.2 Optimalisatie discussie

De optimalisatie is uitgevoerd vanwege resultaten uit de validatie welke niet aan de gestelde criteria voldeden. Aan de hand van de resultaten wordt een mogelijke oplossing getest. Gevaar hierbij is het onderzoeken van de verkeerde hypothese of een mogelijke oorzaak over het hoofd zien.

Grootste discussie punt van het optimaliseren is dat de resultaten aanvankelijk lieten zien dat een verhoogde $MgCl_2$ concentratie in een on-ingevroren mastermix weldegelijk een verbeterd patroon geeft afhankelijk van de concentratie, maar in een tweede experiment, na invriezen de resultaten niet meer reproduceerbaar waren. Hiervoor is in de literatuur een mogelijke verklaring gevonden¹¹. Wanneer de proef een derde keer herhaald wordt met een magnesiumvrije mastermix en later toegevoegde $MgCl_2$, beiden apart ingevroren, is het patroon kwalitatief vergelijkbaar met de eerste proef. In de derde proef waren de resultaten echter onafhankelijk van de concentratie $MgCl_2$. De verwachting was dat de resultaten vergelijkbaar zouden zijn met de eerste proef en er tevens weer een verband tussen de $MgCl_2$ concentratie en patroon kwaliteit zou zitten. Het resultaat was een goed patroon onafhankelijk van de concentratie. Dit doet geloven dat het toevoegen van $MgCl_2$ aan magnesiumvrije mastermix voor goede patronen heeft gezorgd en niet de verhoogde concentratie.

Onder "3.2.6 $MgCl_2$ concentratie in PCR mastermix" in figuur 16, 17 en 18 zijn enkele monsters mislukt, dit is waarschijnlijk een pipetteerfout geweest.

Ander discussie punt in de optimalisatie zijn de tegenvallende resultaten in paragraaf 3.2.5, voornamelijk in de monsters met alle robuustheid stimulerende aanpassingen. Deze resultaten zijn niet goed ten opzichte van de reguliere incubatie en de reguliere incubatie gedurende één uur. De mogelijke verklaring hiervoor is dat in dit onderzoek nog geen aanpassingen zijn gemaakt in de $MgCl_2$ concentratie, wat mogelijk heeft geleid tot wisselvallende resultaten.

5 Conclusie

Er kan geconcludeerd worden dat de MM-Lysis methode een geschikt alternatief is voor de DNA isolatie met Qiagen minikit voor AFLP op in ieder geval 4 bacterie stammen. De *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. oxytoca* en *K. pneumoniae* hebben een goed resultaat gegeven binnen de geteste parameters van het onderzoek. Deze geteste bacteriën hebben een resultaat geproduceerd met MM-Lysis dat vergelijkbaar is met behaalde Qiagen resultaten.

Er kan tevens geconcludeerd worden dat *C. freundii* niet dezelfde resultaten produceert onder de geteste omstandigheden met MM-Lysis methode als met Qiagen DNA isolatie. Hiervoor word een vervolg onderzoek geadviseerd met de magnesiumvrije mastermix zoals beschreven in paragraaf 3.2.6.

Tevens kan aan de hand van de optimalisatie proeven geconcludeerd worden dat een verhoging van de $MgCl_2$ concentratie een verbetering in het patroon geeft. Het onderzoek met magnesiumvrije mastermix met later toegevoegde $MgCl_2$ produceert een stabiel patroon. Er wordt geadviseerd om hiermee verder te gaan.

Er wordt geadviseerd om vervolg onderzoek te verrichten naar:

- De acht nog niet gevalideerde species. Resultaten van de uitgevoerde validaties laten zien dat de methode werkt. Verwacht wordt dat de nog te valideren species ook succesvol gevalideerd kunnen worden
- Verkorting van de restrictie/ligatie incubatie. De resultaten van een verkorte restrictie/ligatie incubatie onder reguliere omstandigheden in paragraaf 3.2.5 zijn goed. Verwacht wordt dat wanneer er gebruik wordt gemaakt van magnesiumvrije mastermix met later toegevoegde $MgCl_2$ er een constant goed resultaat geproduceerd kan worden met 1 uur incubatie.
- Het uitvoeren van de AFLP op een ander PCR apparaat. Er is voor het onderzoek naar de verbetering van de AFLP robuustheid een ander PCR apparaat gebruikt. Dit apparaat is in staat om hetzelfde PCR programma 40 minuten sneller uit te voeren, dit door een kortere ramp time.
- Het verkorten van het elektroforese programma op de sequencer.
- Automatisering/vereenvoudiging van de data analyse. Verwerking van de data in BioNumerics is een langdurig (circa 1-2 uur) en arbeidsintensief proces.

6 Literatuurlijst

- 1) 2011, AFLP® Genetic Fingerprinting, http://www.keygene-products.com/services/technologies_AFLP.php, geraadpleegd op 05-05-2014
- 2) Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Res
- 3) Zabeau M, and Vos P. 1993. *Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting*. European Patent Office
- 4) Mueller UG, Wolfenbarger LL. 1999. *AFLP genotyping and fingerprinting*. Trends Ecol. Evol.
- 5) Meudt HM, Clarke AC. 2007. *Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances*. Trends Plant Sci.
- 6) Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L & Lenstra JA. 1999. *Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art*. J Clin Microbiol
- 7) Modderman EPM. 2009. *Typering van Staphylococcus aureus met behulp van Amplified Fragment Length Polymorphism en Specific Primer Mediated Typing*. VUmc
- 8) Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. 2009. *Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of Citrobacter freundii*. Applied Microbiology and Biotechnology
- 9) Drożdżyńska A, Pawlicka J, Kubiak P, Kośmider A, Pranke D, Olejnik-Schmidt A, Czaczyk K. 2014. *Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by Citrobacter freundii and Hafnia alvei – newly isolated strains from the Enterobacteriaceae*. Elsevier
- 10) Tang X, Tan Y, Zhu H, Zhao K, Shen W. 2009. *Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of Escherichia coli*. AEM
- 11) Hu C, Allen M, Gyllenstein U. 1992. *Effect of freezing of the PCR buffer on the amplification specificity: allelic exclusion and preferential amplification of contaminating molecules*. PCR Methods Appl