



Högskolan Kristianstad

EXAMENSARBETE

Våren 2015

Sektionen för Lärande och Miljö
Biomedicinsk laboratorievetenskap

**Jämförelse av *Vibrio parahaemolyticus* överlevnad i marint
och artificiellt saltvatten samt jämförelse av fyra kit för
RNA-extrahering från *V. parahaemolyticus***

Författare

Maida Bisevac

Handledare

Betty Collin

Examinator

Ann-Sofi Rehnstam-Holm

Sammanfattning

Vibrio parahaemolyticus är en marin bakterie som människan kan få i sig via fisk och skaldjur eller genom att bada i vattnet med höga koncentrationer av denna bakterie och som kan orsaka mag- och tarminfektioner, öroninfektioner, sårinfektioner och till och med blodförgiftningar. Bakterien är patogen även för marina organismer. Eftersom ökad koldioxidhalt leder till havsförsurningen som kommer att försvaga immunsystem hos marina organismer är det viktigt att studera genuttrycket hos *V. parahaemolyticus* vid lägre pH för att få kunskap om den blir lika virulent. Syftet med denna studie är att jämföra bakteriens överlevnad i marint vatten och artificiellt vatten (ASW) eftersom det senare ofta används i laborativa studier av marina bakteriers egenskaper och funktion, samt att jämföra fyra kommersiella kit (TRIzol Max Bacterial RNA Isolation Kit Life Technologies), RNeasy Mini Kit (Qiagen), NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel) och SV Total RNA Isolation Kit (Promega)) för RNA extrahering både från bakterier i log-fasen vid rekommenderat bakterieantal och marint vatten vid lågt bakterieantal. Bakterierna överlevde lika bra i båda sorters vatten. När det gäller RNA extrahering gav TRIzol högst RNA-mängd, men sämre kvalitet, speciellt i extraherat från marint vatten. NucleoSpin gav lite högre RNA-mängd än Qiagen, men kvalitet hos RNA extraherat med Qiagen uppskattades som lite bättre när provet kördes ut på gel. Detta och mycket kort extraheringstid, samt bättre säkerhet och enklare steg kan göra att man föredrar NucleoSpin och Qiagen framför TRIzol.

Nyckelord: *Vibrio parahaemolyticus*, RNA extrahering, TRIzol Max Bacterial RNA Isolation Kit, RNeasy Mini Kit, NucleoSpin RNA Plus, SV Total RNA Isolation, Instant Ocean, NanoDrop

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is a marine bacterium that humans can ingest through fish and shellfish or when exposed to seawater with high concentration of the bacteria, and it can cause gastrointestinal illness. It can also cause infection in ears and wounds. *V. parahaemolyticus* may be pathogenic to marine organisms. Since increased carbon dioxide concentration in the atmosphere may lead to ocean acidification, which will weaken the immune systems of marine organisms, it is important to study gene expression in *V. parahaemolyticus* at lower pH in order to know if it is as virulent in lower pH as in the pH of today. The aim of this study is firstly to compare bacterial survival in natural seawater and artificial seawater (ASW).

ASW is often used for studying of marine bacteria in laboratory work. Secondly, the study aims to compare four commercial kits (TRIzol Max bacterial RNA Isolation Kit, RNeasy Mini Kit (Qiagen), NucleoSpin RNA Plus and SV Total RNA Isolation Kit (Promega)) for RNA extraction from both log-phase at the recommended bacterial counts and marine water at low bacterial counts. Results show that the bacteria survived equally well in both kind of water. As for RNA extraction, TRIzol gave the highest RNA yield but lower quality, especially when extracted from bacteria in natural marine waters. NucleoSpin gave little higher RNA yield than the Qiagen, but the quality of the RNA extracted with Qiagen was estimated as the highest compared to other kits. This together with very short extraction time, as well as better security and easier steps can be a reason to prefer Qiagen and NucleoSpin than TRIzol.

Keyword: *Vibrio parahaemolyticus*, RNA extraction, TRIzol Max Bacterial RNA Isolation Kit, RNeasy Mini Kit, NucleoSpin RNA Plus, SV Total RNA Isolation, Instant Ocean, NanoDrop

Innehållsförteckning

Sammanfattning	3
1. Inledning.....	6
Syfte/ Frågeställning	10
2. Material och metoder	10
2.1. Vatten och bakteriestam	10
2.2. Jämförelse av bakterieöverlevnad i det marina vatten och ASW	10
2.3. Förberedelse av bakterier från log-fasen	12
2.4. Förberedelse av bakterier från det marina vattnet	12
2.5. RNA-extrahering	13
2.6. Kvantitet och kvalitetsanalys med NanoDrop 2000C	15
2.7. Gelelektrofores	16
2.8. Statistiska analyser	16
2.9. Etiska aspekt.....	16
2.10. Miljö- och säkerhetsaspekt.....	16
3. Resultat.....	16
3.1. Jämförelse av bakterieöverlevnad i det marina vatten och ASW	16
3.2. Jämförelse av RNA-extrahering från bakterierna från det marina vattnet	17
3.3. Jämförelse av RNA-extrahering från bakterierna i log-fasen	18
3.4. Gelelektrofores	19
4. Diskussion	20
Tackord.....	23
Referenser.....	24
Populärvetenskaplig sammanfattning	26

Inledning

Vibrio parahaemolyticus

Vibrio parahaemolyticus är en gramnegativ marin bakterie som lever naturligt nära kuster och tillhör familjen *Vibrionaceae*. *V. parahaemolyticus* upptäcktes 1950 som en orsak till livsmedelsburen sjukdom efter ett stort utbrott i Japan där 272 personer insjuknade varav 20 dog efter konsumtion av shirasu (typ av liten fisk) (Letchumanan *et al*, 2014). *V. parahaemolyticus* förknippas oftast med livsmedelsburna sjukdomar i Asien och är den *Vibrio*-art som isolerats hos de flesta fall av bakteriella gastroenteriter i USA. *V. parahaemolyticus* har orsakat många utbrott i världen där skaldjur och fisk konsumeras, speciellt råa eller felaktigt tillagade (Rahman *et al*, 2006). Man kan bli smittad även om man badar i vatten med höga koncentrationer av denna bakterie (Asplund, 2013). I sällsynta fall kan *V. parahaemolyticus* orsaka sårinfektion, öroninfektioner och till och med blodförgiftning som kan vara fatal för personer med olika bakomliggande sjukdomstillstånd (Letchumanan *et al*, 2014). Symtom på infektion är: frossa och feber, diarré, kräkningar, illamående, huvudvärk och magkramp. Inkubationstid är mellan 4 till 96 timmar lång. Men inte alla *V. parahaemolyticus* stammar är patogena. De flesta kliniska stammarna producerar kända virulensfaktorer som termodirekt hemolysin (TDH) och TDH relaterade hemolysin (TRH) (Rahman *et al*, 2006). Det har rapporterats att > 90 % av kliniska stammar och < 1 % marina stammar producerar TDH (Deepanjali *et al*, 2005). *V. parahaemolyticus* är inte bara patogen för människor utan även för marina organismer. Hos t.ex. mexikanska musslor kan infektion leda till nekros, långsam tillväxt och död (Lomeli- Ortega & Martinez-Diaz, 2014).

Effekten av pH-sänkningar på marina organismer

Den ökande mängden koldioxid i atmosfären som beror på användning av fossila bränslen påverkar vårt klimat. Med klimatförändringar påverkas också bakteriernas miljö.

Växthuseffekten gör att miljön i havet förändras genom att en större mängd koldioxid löser sig i havet, vilket i sin tur leder till havsförurning. På grund av stigande halt av CO₂ i luften förväntas pH sjunka med 0,4 enheter till år 2100 enligt FN:s klimatpanel IPCC (IPCC).

Konsekvensen kan bland annat vara att CaCO₃, som är viktig byggnadskomponent för många skalbärande organismer minskar, och detta kan påverka organismernas tillväxt och

metabolism. Sänkning av pH kan utlösa stress och försämra immunförsvaret och leda till att organismerna blir lätt mottagliga för infektioner (Hernroth *et al*, 2012).

Man vet inte än om och hur *V. parahaemolyticus* kommer att påverkas av pH-sänkningar men det finns tecken på att vissa *Vibrio* patogener kan bli ännu mer skadliga i surare miljö (Asplund, 2013). Det kan bli katastrofalt för organismer i den marina miljön om *V. parahaemolyticus* förblir lika eller mer virulent medan de andra organismernas immunsystem försvagas. Runtom i världen använder forskarna ASW (artificial seawater) för att skapa mikrokosmer på laboratoriet och studera *V. parahaemolyticus* genuttryck (Chae *et al*, 2009). Bakterier inkuberas under längre tid i vatten för att se hur genuttrycket påverkas av vattnets pH. Därför är det viktigt att man inte bara extraherar RNA från log-fasen utan även efter inkubationstiden.

Extrahering av RNA

Många studier har visat att kvaliteten på extraherad RNA är mycket viktig för undersökning av genuttrycket med många molekylärbiologiska metoder som till exempel realtid kvantitativ polymeras chain reaction (qPCR), Northern Blotting och next generation sequencing (NGS) (Carvalhais *et al*, 2013). Eftersom RNA till skillnad från DNA är enkelsträngat är det instabilt med mycket kort halveringstid hos bakterier. Detta särskilt på grund av RNaser, som är enzymer som förekommer i blod, alla vävnader och de flesta bakterier och svampar, bryter ner RNA. Därför måste RNaser hämmas vid extraktion. RNaser är även värmestabila och denatureras inte helt med värme. RNA-extraktion kräver därför mycket god laborationsteknik (Tan & Yiap, 2009).

Det finns flera olika kommersiella kit för RNA extrahering och trots att de skiljer sig åt så är principen densamma:

1. celler lyseras och ribonukleaser (RNase) som bryter ner RNA inaktiveras,
2. DNA tas bort och
3. RNA isoleras.

För att RNA ska kunna användas för vidare analyser av genuttrycket måste det vara fritt från kontaminering (proteiner och DNA) och intakt och fritt från RNaser. Kvantiteten och renheten kan kontrolleras med spektrofotometer eller fluorometer (Jeffries *et al*, 2014). RNA kvaliteten

kan bestämmas genom att undersöka förhållandet mellan absorptionen vid 260 nm och 280 nm med UV-spektrofotometri. Nukleinsyror absorberar ljus vid 260nm medan proteiner och vissa kontaminerande ämne vid 280nm. Därför används kvoten av A 260/A 280 som mått på renheten från proteiner och andra kontaminerande ämne som fenol. För hög kvalitet på RNA bör A 260/A 280 förhållandet vara i intervallet 1,9–2,1. RNA kan kvantifieras genom mätning av absorptionen vid 260 nm, där en absorbans enhet är lika med 40 ng RNA/ μ l vid ett pH på ca 7,5 (Glasel, 1995).

Detta examensarbete ingår i en forskningsstudie där genuttrycket av *V. parahaemolyticus* studeras och här kommer bland annat några kommersiella kit för RNA-extrahering jämföras.

TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit

TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Life Technologies) innehåller TRIzol reagens som är blandning av guanidintiocyanat (GTC) och fenol, och Max bakteriell reagens. Dessa reagenser är speciellt utvecklade för att förbättra isoleringen av intakt totalt RNA från bakterier. Max bakteriell reagens används för en effektiv förbehandling av bakterieceller före RNA-isolering med TRIzol reagens. TRIzol reagentet tillsätts sedan för att lösa upp cellkomponenterna och inaktivera RNaser. Tillsats av kloroform följs av centrifugering där lysatet separeras i en vattenfas som lägger sig överst och innehåller RNA och en organisk fas med DNA och proteiner. RNA utvinns från vattenfasen genom utfällning med isopropanol. Den slutliga RNA-pelleten löses i RNase-fritt vatten (Life Technologies, 2012).

NucleoSpin® RNA Plus

NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel) kittet kan användas för RNA extrahering från många olika typer av celler. I det första steget lyseras celler genom inkubering i en buffert som innehåller GTC som omedelbart inaktiverar RNaser. NucleoSpin använder sig av en speciell princip för att avlägsna genomiskt DNA (gDNA) från provet – en gDNA kolonn. Lysatet tillsätts till kolonnen som effektivt binder upp DNA. Bindningsbuffert tillsätts till filtratet som överförs till en ny kolonn som binder RNA. RNA tvättas från salter och metaboliter och RNA elueras med RNase-fritt vatten (Macherey-Nagel, 2014).

SV Total RNA Isolation System

Kittet kan också användas för RNA-extrahering från många olika typer av celler. SV Total RNA Isolering System kombinerar GTC och β -merkaptoetanol (β -ME) för att inaktivera RNaser. GTC orsakar selektiv utfällning av cellulära proteiner, medan RNA förblir i lösning. RNA fälls med etanol och binds till kiselmembranet som finns i Spin Basket kolonnen. Enzymet DNase appliceras direkt till membranet för att bryta ner genomiskt DNA. RNA renas ytterligare från salter, proteiner och cellulära föroreningar genom enkla tvättsteg. Slutligen elueras RNA från membranet genom tillsats av RNase-fritt vatten (Promega, 2013).

RNeasy Mini Kit

RNeasy Mini Kit (Qiagen) används också för extraktion av RNA från olika celltyper. Prover lyseras först och homogeniseras i närvaro av en starkt denaturerande GTC-buffert, som omedelbart inaktiverar RNaser. Kittet använder sig som de två kätten före av de selektiva bindningsegenskaperna hos ett kiselbaserat membran. Etanol tillsätts för att möjliggöra bindning och provet appliceras sedan på en RNeasy Mini spinnkolonn. Ett specialiserat högsaltsbuffertsystemet tillåter upp till 100 μ g av RNA längre än 200 baser att binda till RNeasy-membranet. Det totala RNA:t binder till membranet och föroreningar tvättas effektivt bort. RNA elueras sedan i RNase-fritt vatten (Qiagen, 2012).

Nanodrop 2000c

Nanodrop 2000c spektrofotometer mäter enkelt koncentration från 0.5-2.0 μ l DNA, RNA, protein och andra biomolekyler utan användning av kyvetter eller kapillärer. Detta är mycket viktigt eftersom det räcker med ytterst små mängder provet för analys. Metoden används även på grund av sin enkelhet, snabbhet och bredden på koncentrationsintervallet även när det finns rikligt med provmängd. Provet placeras direkt på detektionsytan som torkas bort innan nästa prov appliceras. Nanodrop 2000c bestämmer den optimala våglängden automatiskt för att kunna mäta mycket höga koncentrationer vilket innebär att de flesta prover inte behöver spädas (Desjardins *et al*, 2009).

Syfte

Eftersom detta är en pilotstudie som ingår i en forskningsstudie där genuttrycket av *V. parahaemolyticus* vid olika pH-värde finns flera frågeställningar:

- Jämföra hur bakterier överlever i naturligt marint vatten respektive artificiellt havsvatten (ASW Instant Ocean).
- Jämföra vilket av de fyra kätten (Promega, Qiagen, Trizol och Nucleo Spin) som ger mest utbyte och renast RNA när det extraheras från låg bakteriekoncentration i det naturliga marina vattnet.
- Jämföra extraherat RNA mängd och kvalitet från *V. parahaemolyticus* i naturligt marint vatten erhållet från de fyra olika kit.

2. Material och metod

2.1. Vatten och bakteriestam

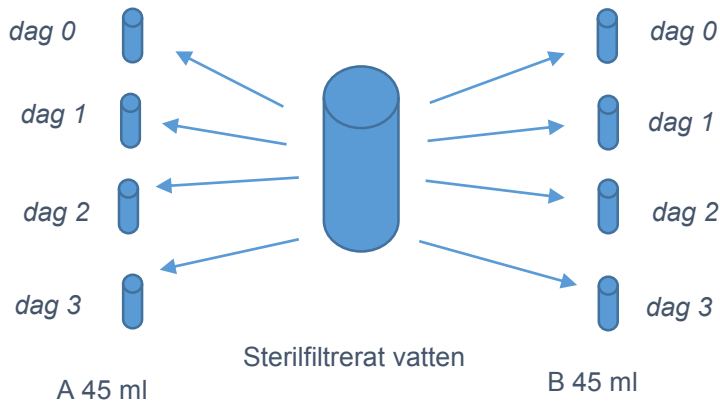
V. parahaemolyticus-stammen som användes var KVp4 som isolerats vid Sven Lovéns marina forskningsstation, Kristineberg, norr om Göteborg. Dess överlevnad jämfördes i två typer av vatten: marint vatten som hämtades från Sölvesborg (Hanöbukten) och Instant Ocean som används för tillverkning av artificiellt havsvatten (ASW).

2.2. Jämförelse av bakterieöverlevnad i det naturliga marina vattnet och ASW

2.2.1. Beredning av vattnet

Vatten vars pH låg på 8,5 hämtades från Sölvesborg (Hanöbukten). Vattnet sterilfiltrerades genom ett 0,22 µm filter (Pall Corporation) och 45 ml överfördes till 8 Falconrör. 33g Instant Ocean (Aquarium Systems) som användes för att bereda ASW löstes upp i en liter destillerat

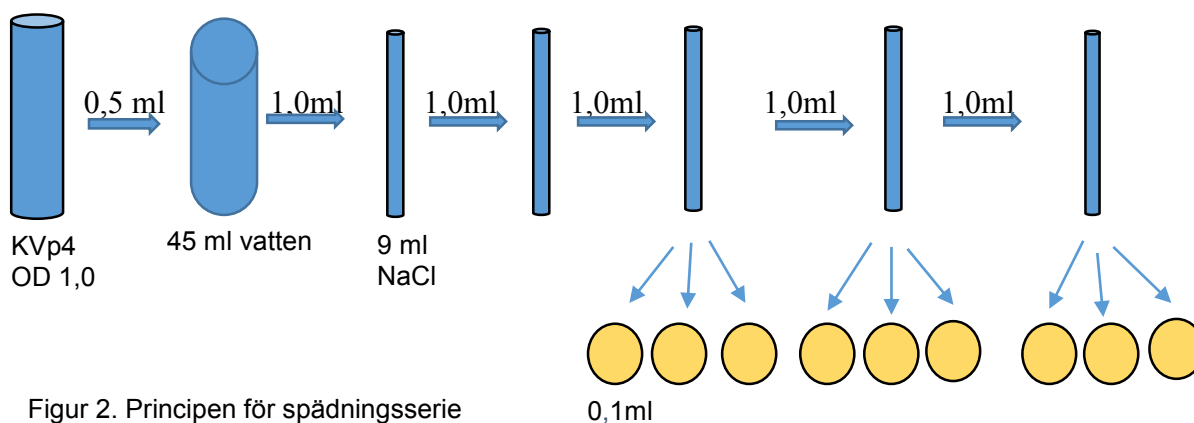
vatten. Med NaOH ställdes ASW till pH till 8,5 och sterilfiltrerades. Från varje sorts vatten överfördes 45 ml till 8 Falconrör. Rören märktes med vattentyp, A och B och 0, 1, 2 och 3 för antal dagar som koncentration av bakterierna bestämdes (figur 2).



Figur 1. Princip för vattenfördelning, gäller för både naturligt marint vatten och ASW

2.2.2. Koncentrationsbestämning av bakterier

Bakterier odlades upp från ursprungsröret i frysen på BHI-agarplatta (Oxoid & Scharlau) och ett par kolonier överfördes till fyra rör med 8 ml BHI-buljong, två rör (A och B) till varje vattensort. Rören ställdes på ett värmeskak vid 37 °C över natten och centrifugerades (Labex Sigma 4-16 K) i 5100 x g i 10 minuter följande dag. Buljongen hälldes av och bakterierna tvättades med sterilt 0,85 % NaCl, och centrifugerades ytterligare en gång i 5100xg, i 10 minuter. Supernatanten hälldes av och 5 ml 0,85 % NaCl tillsattes till varje rör. OD mättes med Eppendorf BioPhotometer Plus och ställdes till 1,0 och 500 µl tillsattes från varje rör med bakterielösning till fyra rör med vatten (dag 0, 1, 2 och 3). Rören omblandades och koncentrationsbestämning gjordes genom att överföra 1 ml från ursprungsrör till sterila glaströr med 9ml 0,85 % NaCl och så vidare upp till spädning 10^{-5} . 100 µl överfördes från tre rör med lägsta spädning till tre BHI agarplattor var (se figur 3) och plattorna inkuberades vid 37°C över natt. Antalet odlingsbara bakterier per ml beräknades som colony forming units (CFU). På samma sätt utfördes försök för ASW. Antal kolonier räknades nästa dag för att kunna jämföra överlevnad i ASW och marint vatten. Koncentrationsbestämningar gjordes i fyra dagar i rad. Detta försök utfördes i duplikat.



Figur 2. Principen för spädningsserie

2.3. Förberedelse av bakterier från det marina vattnet

Försöket sattes igång genom att tillsätta 0,5 ml av bakterier upplösta i 0,85 % NaCl med OD 1,0 till två Falcon rör med 45 ml sterilfiltrerat vatten enligt ovan. Falconrören förvarades vid rumstemperatur och centrifugerades fjärde dagen. Supernatanten hälldes av och pelleten löstes upp i 5 ml 0,85 % NaCl i båda rör. OD mättes till 0,045. Sedan överfördes 1 ml till fyra eppendorf rör från varje rör, det vill säga ett rör per kit från totalt två Falconrör. Rören centrifugerades vid 9000 x g i 5 minuter och supernatanten hälldes av. Även detta försök utfördes i duplikat.

2.4. Förberedelse av bakterier från log-fasen

De olika manualerna rekommenderar att antalet bakterier vars RNA ska extraheras ska vara mellan 10^7 och 10^9 . Bakterierna odlades upp på en Brain Heart Infusion (BHI) agarplatta. Ett par kolonier från plattan tillsattes till två stycken Falconrör (A och B) med 8 ml BHI buljong var. Rören ställdes på ett värmeskak (Infors Minitron) i tre timmar vid 37 °C för att bakterierna skulle nå logfasen. Rören centrifugerades (Labex Sigma 4-16 K) vid 5100 x g i 10 minuter, buljongen hälldes av och pelleten tvättades med sterilt 0,85 % NaCl genom ytterligare centrifugering vid 5100 x g i 10 minuter. Supernatanten hälldes av och 5 ml 0,85 % NaCl tillsattes till varje rör. OD vid 600 nm mättes med Eppendorf Biophotometer Plus och ställdes till 0,5. 1,5 ml från varje rör (ca $9,0 \cdot 10^8$ bakterier) överfördes till sterila eppendorfrör som centrifugerades vid 9000 x g i 5 minuter och supernatanten hälldes av.

2.5. RNA-extrahering

RNA extraherades från bakterier i log-fasen, ca $9,0 \cdot 10^8$ bakterier per prov, totalt fyra prov per kit. RNA extraherades från bakterier som varit i marint vatten i tre dagar, ca $1,3 \cdot 10^6$ bakterier per prov, totalt fyra prov per kit. RNA som extraherades från marint vatten eluerades i 50 μ l RNasefritt-vatten för att lättare kunna jämföra RNA-mängd medan extrahering från log-fasen gjordes enligt manualerna.

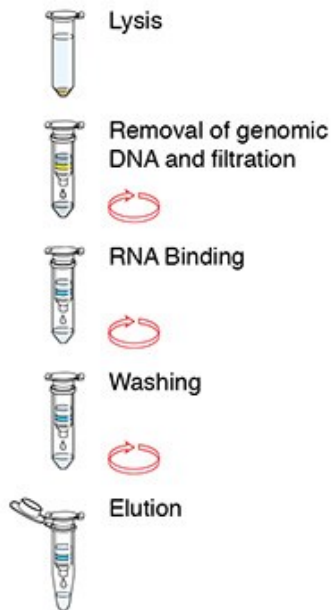
2.5.1. RNA-extrahering med TRIzol

Förutom det som fanns i kittet behövdes följande kemikalier: kloroform, 75 % etanol, 100 % isopropanol och RNase-fritt vatten samt utrustning som värmeblock och mikrocentrifug. 200 μ l Max Bacterial Enhancement värmdes upp till 95°C och tillsattes till pelleten som löstes upp och provet inkuberades på ett värmeblock (Falc Thermoblock) i 4 minuter vid 95°C. 1 ml TRIzol tillsattes, provet omblandades och inkuberades i 5 minuter i rumstemperatur (RT). 0,2ml kall kloroform tillsattes och röret skakades kraftigt i 15s. Provet inkuberades i 2-3 min i RT och sedan centrifugerades vid 12000 x g i 15 minuter vid 4°C (Labex Sigma 1-14 K). Den översta genomskinliga fasen (ca 400 μ l) pipetterades upp och överfördes till ett nytt rör. 0,5ml kall isopropanol tillsattes, provet inkuberades i ytterligare 10 minuter i RT och centrifugerades vid 12000 x g i 15 minuter vid 4°C. Pelleten löstes upp i 1 ml 75 % etanol och vortexades. Provet centrifugerades vid 7500 x g i 5 minuter vid 4°C och supernatanten hälldes av. Pelleten löstes upp i 50 μ l RNase-fritt vatten och inkuberades i 10 minuter vid 60°C.

2.5.2. RNA-extrahering med NucleoSpin

Förutom det som fanns i kittet behövdes 96-100 % etanol och eppendorfrör. Principen för extrahering visas i figur 4. 350 μ l LBP buffert tillsattes till pelleten som löstes upp genom vortexing. Sedan överfördes allt till ett gDNA kolonn som var placerad i ett 1,5 ml eppendorfrör och centrifugerades vid 11000 x g i 30 sekunder. Kolonnen kastades och filtratet överfördes till ett nytt rör. 100 μ l BS (Bindning Solution) tillsattes, provet vortexades, överfördes till RNA plus kolonn placerad i ett uppsamlingsrör och centrifugerades vid 11000 x g i 15 sekunder. 200 μ l tvättbuffert WB1 tillsattes och provet centrifugerades vid 11000 x g i 15 sekunder. Uppsamlingsröret tömdes, 600 μ l WB2 tillsattes till kolonnen och centrifugerades vid 11000 x g i 15 sekunder. Uppsamlingsröret tömdes, 250 μ l WB2 tillsattes

till kolonnen och provet centrifugerades vid 11000 x g i 2 minuter. Efter centrifugering placerades kolonnen i ett nytt rör, 30 µl RNase-fritt vatten tillsattes och provet centrifugerades vid 11000 x g i 1 minut. Sista steget upprepades två gånger när RNA extraherades från buljong (enligt manualen) medan RNA eluerades med en gång i 50 µl när det extraherades från vatten.



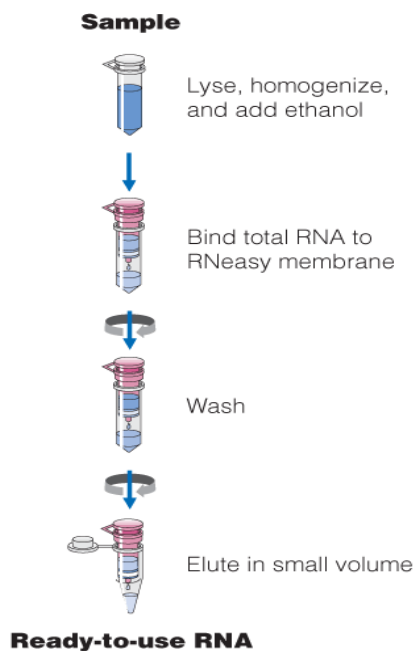
Figur 3. De viktigaste stegen för RNA extrahering med Nucleo Spin (Macherey-Nagel, 2014).

2.5.3. RNA-extrahering med Promega (Spin metod)

Pelleten löstes upp i 175 µl lyseringsbuffert och 350 µl RNA spädningsbuffert tillsattes. Provet inkuberades i 3 minuter vid 70°C och sedan centrifugerades vid 12000 x g i 10 minuter. Vätskan som klarnat överfördes till nytt rör och 200 µl 95 % etanol tillsattes. Provet omblandades, överfördes till spinnkolonn och centrifugerades vid 12 000 x g i 1 minut. 600 µl tvättbuffert (RWA) tillsattes och provet centrifugerades i ytterligare 1 minut. 50 µl DNase mix tillsattes till membranet och inkuberades vid RT i 15 minuter. 200 µl DNase stopplösning tillsattes och provet centrifugerades i 1 minut. Uppsamlingsröret tömdes, 600 µl RWA tillsattes och provet centrifugerades i 1 minut. Provet tvättades en gång till med 250 µl RWA, centrifugerades i 2 minuter. Sedan eluerades RNA i 100 µl RNase-fritt vatten (enligt manualen) för bakterier från log-fasen och i 50 µl för bakterier från vatten.

2.5.4. RNA- extrahering med Qiagen

Pelleten löstes upp i 350 µl lyseringsbuffert för bakterier från marint vatten och 700 µl för bakterier från log-fasen. Samma volym av 70 % etanol tillsattes. Provet överfördes till spinnkolonn och centrifugerades vid 8000 x g i 15 sekunder. 700 µl tvättbuffert tillsattes och provet centrifugerades i ytterligare 15 sekunder. 500 µl RPE buffert tillsattes och provet centrifugerades i 15 sekunder. Sedan tvättades provet med ytterligare 500 µl RPE buffert och centrifugering i 2 minuter. Därefter eluerades RNA från membranet genom att tillsätta 30 µl RNase-fritt vatten och centrifugera i 1 minut för bakterier från buljong (enligt manualen) och i 50 µl för bakterier från vatten. I figur 5 visas principen för extraheringen.



Figur 4. Schematisk bild över Qiagen-principen (Qiagen, 2012)

2.6. Kvantitet- och kvalitetsanalys med Nanodrop 2000c

Koncentration av extraherad RNA och renheten (A 260/280) mättes med Thermo Scientific NanoDrop 2000C.

2.7. Gelelektrofores

För att uppskatta hur intakt RNA var kördes ett prov per kit ut på 1,2 % agarosgel där GelRed används för att färga in nukleinsyror tillsattes. Preparationen genom TRIzol, Qiagen och Nucleospin gav ca 2 µg RNA per prov, medan preparationen med Promegakit gav 0,5 µg RNA. Gelen kördes vid 100V i en timme. Bilden på gelen togs med BIO-RAD Gel Doc XR+.

2.8. Statistiska analyser

ANOVA med en faktor utfördes för att räkna ut om det finns signifikanta skillnader mellan olika kit (p-värde) när det gäller extrahering av RNA från både marint och artificiellt vatten samt stapeldiagram. $P < 0,05$ betraktades som signifikant.

2.9. Etiska aspekter

Detta var inte aktuellt.

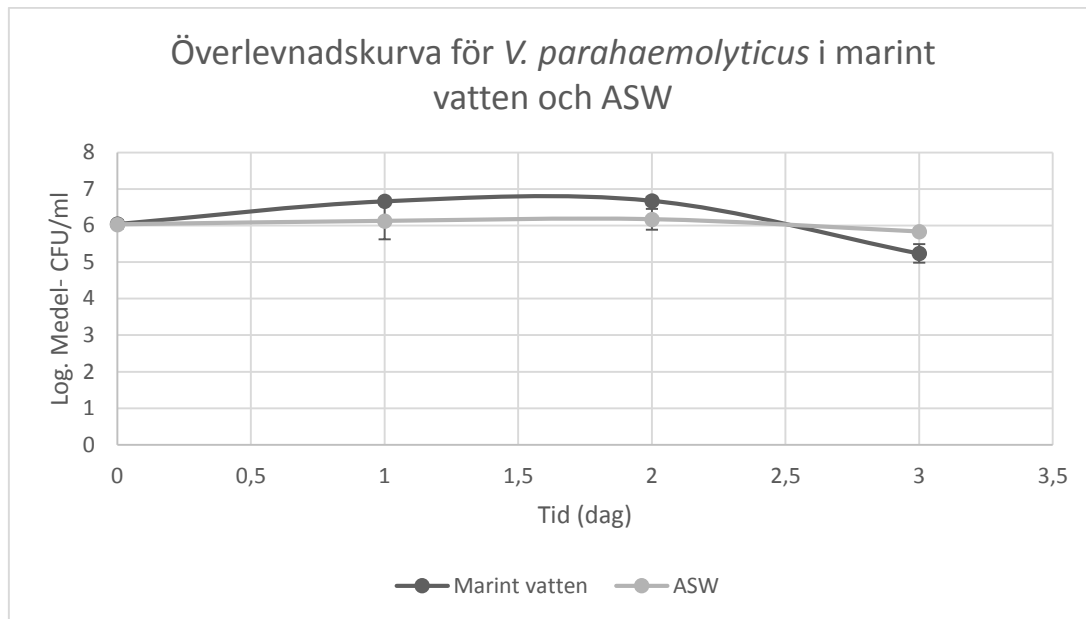
2.10. Miljö- och säkerhetsaspekter

RNA-extrahering utfördes i dragskåp. Skyddsglasögon, handskar och skyddsrock användes på grund av toxiska ämnen som samtliga kit innehöll.

3. Resultat

3.1. Jämförelse av bakteriernas överlevnad i marint vatten och ASW

Antal kolonier som växte på plattorna räknades och CFU/ml räknades ut med hänsyn till spädning. Bakterierna överlever lika bra eller till och med bättre i ASW än i marint vatten, speciellt om man ska följa överlevnaden under längre tid (figur 5).

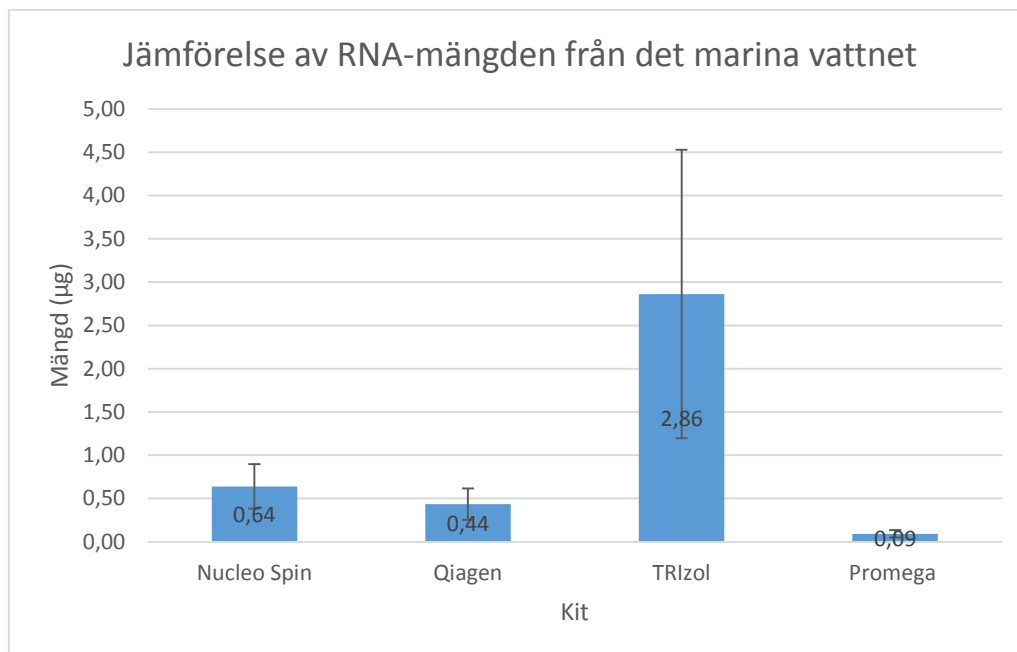


Figur 5. Överlevnadskurvor med standardavvikelse för *V. parahaemolyticus* i det marina vattnet och ASW

3.2. Jämförelse av RNA-extrahering från bakterierna från det marina vattnet

3.2.1. RNA kvantitet

Extrahering av RNA gjordes dag fyra från bakterierna som fanns i marint vatten. RNA extraherades från ca $1,3 \cdot 10^6$ bakterier/prov. Den totala RNA-mängden jämfördes. Det fanns signifikanta skillnader mellan TRIzol och de andra kätten enligt ANOVA (p-värdet $<0,05$). Ingen signifikant skillnad fanns mellan NucleoSpin och Qiagen (p-värdet $>0,05$). Mängden, medelvärde och standardavvikelse redovisas i figur 6.



Figur 6. Jämförelse av den totala RNA-mängden (medelvärde)

3.2.2. RNA-kvalitet (renhet)

Trots att A 260/A280 skiljer lite mellan de olika kätten, så gav alla kit förutom TRIzol rent RNA eftersom A260/A280 ligger under 1,9 för TRIzol. I tabell 1 redovisas renheten för proven extraherade med de olika kätten samt medelvärde och SD.

Tabell 1. Absorbans 260nm/ 280nm med medelvärde och standardavvikelse hos RNA extraherat från de fyra kätten

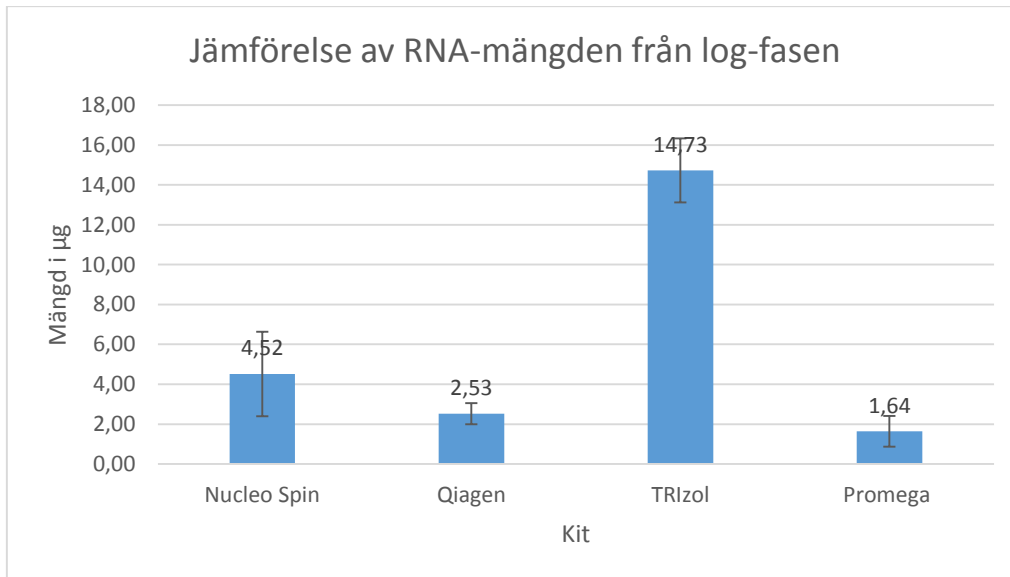
Kit	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 4	Medel	SD
Nucleo Spin	2,01	2,15	2,13	2,24	2,13	0,09
Qiagen	2,1	2,12	2,33	2,31	2,22	0,12
TRIzol	1,45	1,43	1,43	1,44	1,44	0,01
Promega	2,80	2,20	1,96	2,20	2,29	0,36

3.3. Jämförelse av RNA-extrahering från bakterierna i log-fasen

3.3.1. RNA kvantitet

RNA extraherades från fyra prov med totalt ca $9,0 \cdot 10^8$ bakterier/prov med varje kit och medelvärde samt standardavvikelse för mängd extraherat RNA från varje kit räknades ut

(figur 7). En ANOVA test visade att det fanns signifikanta skillnader mellan samtliga kitt (p-värde <0,05).



Figur 7. Jämförelse av mängden (medelvärde) extraherad RNA med de fyra kätten

3.3.2. RNA- renhet

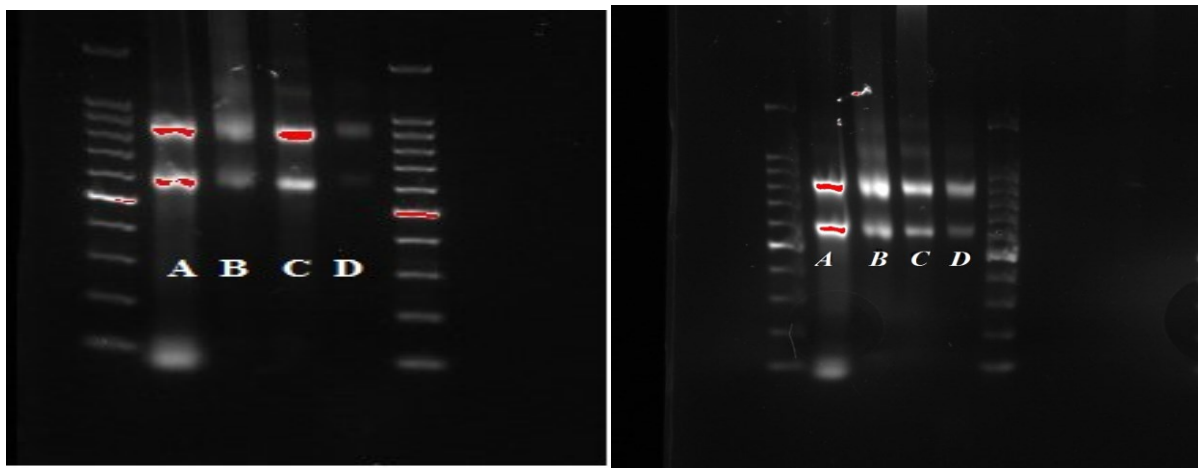
Renheten på det extraherade RNA't räknad ut som kvoten mellan A 260/ A 280 redovisas i tabell 2. Alla kit visade bra renhet med A260/A280 värden på $\geq 1,90$. TRIzol hade lägst men acceptabelt värde.

Tabell 2. Jämförelse mellan de olika kätten när det gäller renhet av RNA

Kit	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 4	Medel	SD
NucleoSpin	2,37	2,15	2,24	2,32	2,27	0,10
Qiagen	2,10	2,14	2,12	2,09	2,11	0,02
TRIzol	1,96	1,88	1,85	1,92	1,90	0,05
Promega	2,12	2,80	2,22	2,20	2,34	0,31

3.4. Gelelektrofores

Proven kördes ut på en agarosgel i följande ordning (från vänster till höger): TRIzol, NucleoSpin, Qiagen och Promega (figur 8). RNA extraherat med samtliga kit visar två tydliga band.



A

B

Figur 8 (A & B). Resultat från två gelelektroforeskörningar, A TRIzol, B NucleoSpin, C Qiagen och D Promega

Diskussion

I den här studien jämfördes överlevnad av *V. parahaemolyticus* i ett marint vatten från Hanöbukten med Instant Ocean som används av forskarna runt om i världen som artificial seawater (ASW) (Chae *et al*, 2009). Överlevnaden studerades under fyra dagar. Bakterierna överlevde lika bra i båda sorters vatten, vilket är viktigt eftersom det underlättar rent praktiskt då man inte behöver hämta marint vatten varje gång man studerar hur bakterier uppför sig under olika villkor. Men det som är ännu viktigare är att man kan utföra samma försök var som helst i världen och studien blir inte begränsad till en viss sorts vatten.

Vidare jämfördes fyra olika kit för RNA-extrahering vid låga bakteriekoncentrationer från det naturliga marina vattnet. Kitten jämfördes också efter att RNA extraherades från bakterier i log-fas och med rekommenderade bakteriekoncentrationer. För att starta med lika mycket bakterier ställdes OD₆₀₀ till 0,5 för log-fasen vilket överensstämmer med den bakteriekoncentration som rekommenderas i olika manualer (mellan 10⁷ och 10⁹) och 0,045 för marint vatten eftersom bakteriekoncentration är mycket lägre där (Kaneko & Colwell, 1973). Extrahering med TRIzol gav mest mängd RNA både från celler i log-fas och från celler. I det naturliga marina vattnet, där antalet bakterier var mycket lägre än vad som rekommenderas enligt samtliga kit protokollen. Med NucleoSpin fick man mer RNA än med Qiagen från både log-fas celler och celler i det marina vattnet. Promegas kit gav minst RNA.

När det gäller RNAs renhet blev det ingen större skillnad med de olika kätten, förutom att TRIzol hade mycket lägre renhet för RNA extraherat från det marina vattnet och även lägst men acceptabel renhet från celler i log-fas. Detta kan bero på fenolrester som finns kvar. Gelelektrofores visade två band hos samtliga preparationer. För intakt bakteriell RNA ska det visas två tydliga band som motsvarar 23S rRNA och 16S rRNA (Atshan *et al*, 2012). Snygga ribosomalband kan indikera att man även fått mRNA i sitt prov, men det vet man inte med säkerheten. RNA extraherat med Promega hade svagaste band vilket kan förklaras av mycket lägre mängd RNA i provet. Hos RNA extraherat med TRIzol syns det ett tredje band vilket kan vara 5S rRNA och tRNA som man brukar få ut med fenolbaserat kit (Atshan *et al*, 2012). Man inte kan utvinna den med kolonnbaserade kit som binder in RNA sekvenser längre än 200 baser (Qiagen, 2012). RNA extraherat med NucleoSpin hade diffusa band vilket är tecken på att RNA't delvis var nedbrutet. Detta sätt för bedömning av kvaliteten hos RNA är dock beroende på användarens erfarenhet och bilderna kan tolkas fel (Rump *et al*, 2010).

Trots att det finns många kommersiella kit för RNA-extrahering så finns det inte många studier som jämför dem när det gäller RNA-extrahering från bakterier. Forskarna använder sig ofta av optimerade metoder där man till och med använder två kit för en och samma RNA-extrahering. I en studie beskrivs optimerad metod där man börjar extrahering av RNA med TRIzol och sedan överför vätskefasen innehållande RNA till ett nytt rör för att fortsätta extrahering med Qiagens kit. På så sätt kunde man utvinna 19,2 µg RNA från $5 \cdot 10^8$ *E. coli*-bakterier. (Gao *et al*, 2011). Detta görs eftersom man tror att cellerna lyseras mycket bättre med TRIzol vilket påverkar RNA-mängden (Atshan *et al*, 2012). Å andra sidan ger Qiagen renare RNA. I en studie av Kang *et al* (2009) jämfördes TRIzol med flera andra kit, bland annat ett optimerat Qiagens kit. RNA extraherades från diverse bakterier i feaces och tarmar hos möss. Trots optimering kunde man utvinna högre mängd med TRIzol (9,98 µg för TRIzol, 9,25 µg med Qiagen när celler lyserades mekaniskt och 2,70 µg med Qiagen när celler lyserades enzymatiskt). I en annan studie jämfördes bland annat Qiagen med Promega (Nuyts *et al*, 2001). Qiagen gav tre gånger högre mängd med nästan lika bra renhet.

För att använda RNA för olika genuttrycksstudie behöver man dock inte ha så höga mängder. För att göra till exempel cDNA räcker det med 0,1 µg RNA, medan för qPCR och NGS (Next Generation Sequencing) behövs 1 µg RNA. För Micro Array rekommenderas dock 5 µg RNA (Jeffries *et al*, 2014). Detta innebär att alla kit kan vara mer eller mindre användbara när man extraherar från log-fasen beroende på vilken analys som RNA't kommer att användas till. TRIzol är dock det enda kit som ger tillräcklig mängd när man extraherar från marint vatten.

Detta skulle kunna bero på flera saker, bland annat att just detta kit är speciellt anpassat för bakterier. Man använder sig även av hög temperatur för att lysa celler och provet aldrig passerar något membran där RNA skulle kunna fastna. Alla kit som är kolonnbaserade är beroende av kolonnens bindningskapacitet. Dessutom så passerar många korta RNA-molekyler genom kolonnen utan att binda in (Rump *et al*, 2010). För att undvika problem med otillräcklig mängd RNA från marint vatten skulle man kunna tillsätta mer än 0,5 ml av bakterielösning av OD 1,0 som gjorts i denna studie. Dessutom kan man upprepa sista extraheringssteg genom att köra redan eluerat RNA genom membran en extra gång när man använder kolonnbaserade kit. Detta rekommenderas i de tre protokollen (Qiagen, Nucleo Spin och Promega) om man vill ha högre koncentration och det gjordes inte i detta projekt.

Trots att TRIzol ger högst RNA-mängd så får man ut renare RNA med de andra kätten. Dessutom så finns det andra parametrar som också påverkar valet av extraheringsmetod, såsom säkerhet eftersom många metoder använder toxiska kemikalier, extraheringstid och även pris. Samtliga kit innehåller GTC som är både toxisk och farlig för miljö. Enligt innehållsförteckning innehåller TRIzol-reagens en blandning av fenol och GTC som är toxisk vid förtäring och inhalering, kan skada ögonen och ge brännskador, skada organ vid lång användning och misstänks även kunna ge genetiska skador. Vidare används kloroform som också är farlig för användaren. Promegas kit använder sig även av β -ME medan Qiagen rekommenderar tillsättning av β -ME till lyseringbuffert för prover rika med RNaser. Skillnaden är dock i mängden av toxiska kemikalier och exponeringstiden. Extrahering med både TRIzol och Promega tar minst en timme och innehåller många steg medan extrahering med NucleoSpin och Qiagen tar mellan 15-20 minuter och innehåller få enkla steg. Detta sparar både tid och minskar exponeringstiden. Både NucleoSpin och Qiagens manualer är användarvänliga och lätta att följa.

När det gäller pris så är TRIzol med 25kr/prov billigast. Dock ingår inte kloroform och isopropanol i priset och inte heller några rör. Dessutom kräver kittet mer avancerad utrustning än vad övriga kit gör. Promegas kit och NucleoSpin kostar 50kr/prov medan Qiagens kit kostar 45 kr/prov.

Slutsats

V. parahaemolyticus överlever lika bra i marint vatten som i ASW. TRIzol ger mycket högre RNA-mängd men renheten är sämre än andra kit speciellt när RNA extraheras från marint

vatten. TRIzol är också billigast men mer toxisk och kräver längre tid och mer avancerad utrustning. Detta kan göra att man i vissa fall föredrar att använda NucleoSpin eller Qiagen på grund av sin enkelhet, bättre säkerhet och bättre kvaliteten på RNA.

Tackord

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Betty Collin för all hjälp, stöd och vägledning. Helena, Lina, Fariba, Stina-Mina och alla andra som hjälp till i laboratoriet och bidragit på ett eller annat sätt förtjänar också ett stort tack. Orden räcker inte till för att tacka min familj som orkat och hjälpt till på alla möjliga sätt.

Referenser

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Asplund, M. (2013). *Ecological aspects of marine Vibrio bacteria. Exploring relationships to other organisms and a changing environment*. University of Gothenburg. Department of Biological and Environmental Sciences – Kristineberg.
- Atshan, S. S., Shamsudin, N. M., Lung, T. T. L., Ling, H. K., Sekawi, Z., Pei, P. C. & Ghaznavi-Rad, E. (2012). Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm. *Gene*. 494(2):219-224.
- Carvalhaisa, V., Delgado-Rastrollo, M., Melo, D.R. L. & Cerca, N.(2013). Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 95(2):195-200.
- Chae, M. J., Cheney, D. & Su, Y. C. (2009). Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of food science*. 74(2):M62-6.
- Deepanjali, A., Sanath Kumar, H., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. (2005). Seasonal Variation in Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters along the Southwest Coast of India. *Applied and environmental microbiology*. 71(7):3575-3580.
- Desjardins, P., Hansen, B. J. & Allen, M. (2009). Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *Journal of Visualized Experiments*. 2009(33):1610.
- Gao, W., Zhang, W. & Meldrum, R. D. (2011). RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells. *Journal of Microbiological Methods*. 85(3):221-227.
- Glaser J. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 18:62-3.
- Hernroth, B., Nilsson Sköld, H., Wiklander, K., Jutfelt, F. & Baden, S. (2012). Simulated climate change causes immune suppression and protein damage in the crustacean *Nephrops norvegicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 33:1095-1101.
- Jeffries, S. K. M., Kiss, J. A., Smith, W. A. & Oris, T. J. (2014). A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for isolation of total RNA from small tissue samples. *BMC Biothechnology*. 14:99.
- Kaneko, T. & Conwell, R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*. 113(1):24-32.

- Kang, S., Denman, E. S., Morrison, M., Yu, Z. & McSweeney, S.C. (2009). An Efficient RNA Extraction Method for Estimating Gut Microbial Diversity by Polymerase Chain Reaction. *Current Microbiology*. 58:464–471.
- Letchumanan, V., Chan, K.G., & Lee, L.H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in microbiology*. 7(5):1-13
- Lifetechnologies. (2012). *TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit*. <https://www.lifetechnologies.com/> [12 april 2015].
- Lomeli- Ortega, O. C. & Martinez-Diaz, F. S. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*. 434:208–211.
- Macherey-Nagel. (2014). *NucleoSpin® RNA Plus*. <http://mn-net.com/> [12 april 2015].
- Nuyts, S., Van Mellaert, L. & Anné, J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. *Journal of Microbiological Methods*. 44:235-238.
- Promega. (2013). *SV Total RNA Isolation System*. <http://promega.com> [19 april 2015].
- Qiagen. (2012). *RNeasy Mini Kit*. <http://qiagen.com> [19 april 2015].
- Rahman, M., Bhuiyan, N. A., Kuhn, I., Ramamurthy, T., Rahman, M., Mollby, R. & Nair, G.B. (2006). Biochemical fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* by the PhenePlate system: comparison between pandemic and non-pandemic serotypes. *Epidemiol. Infect.* 134: 985–989.
- Ridgeway, J.A. & Timm, A.E. (2014). Comparison of RNA Isolation Methods from Insect Larvae. *Journal of insect science*. 12(268):2014.
- Rump, V. L., Asamoah, B. & Gonzalez-Escalona, N. (2010). Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from *Salmonella* cells. *Biomedical Research Notes*. 3:211.
- Shmoop. (u.å.). *The genetic code*. <http://shmoop.com> [19 april 2015].
- Tan, S.C. & Yiap, B.C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009:1-10.

Populärvetenskaplig sammanfattning

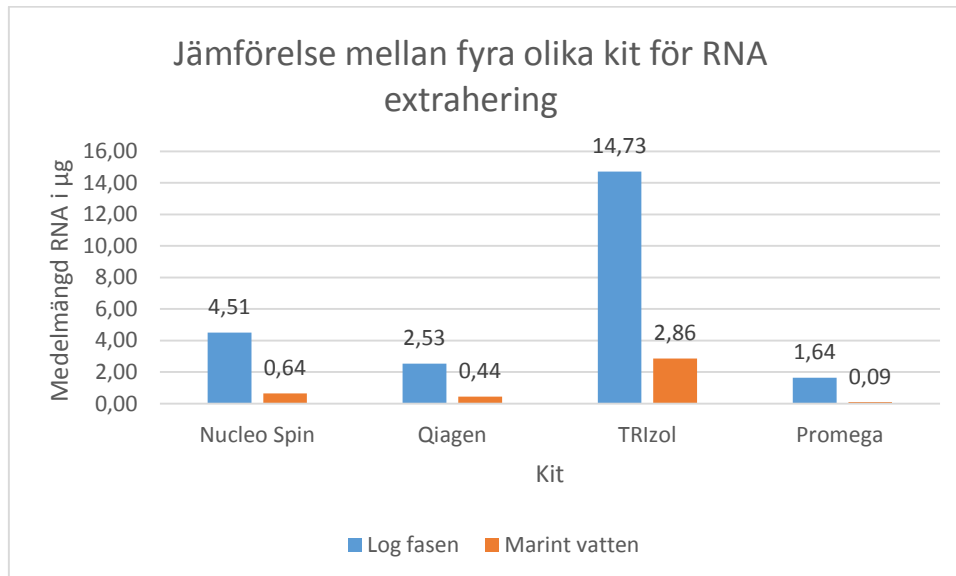
Vibrio parahaemolyticus är en marin bakterie som människan kan få i sig via fisk och skaldjur eller genom att bada i vatten med höga koncentrationer av denna bakterie. Den kan orsaka mag- och tarminfektioner, sårinfektioner, öroninfektioner och till och med blodförgiftningar som kan ha dödlig utgång, framförallt hos personer med nedsatt immunförsvar. Bakterien kan även vara patogen för marina organismer. Eftersom ökad koldioxidhalt leder till havsförurning som kommer att försvaga immunsystem hos marina organismer är det viktigt att studera genuttrycket hos *V. parahaemolyticus*. På så sätt kommer man att få kunskap om den blir lika virulent i surare miljö vilket skulle kunna vara katastrofalt för de marina organismer som blir svagare. För att studera genuttrycket vid lägre pH måste RNA (ribonukleinsyra som är kopia av DNA-sekvensen som kodar för ett visst protein) extraheras från bakterien som varit i vattnet med sänkt pH under en viss tid. Syftet med denna studie är att jämföra bakteriens överlevnad i vanligt marint vatten och artificiellt vatten som används runt om i världen för forskningsändamål och att jämföra fyra kommersiella kit för RNA extrahering.

0,5 ml bakterielösning med OD (Optical Density) 1,0 tillsattes till lika stora volymer av det marina vatten och Instant Ocean som användes som artificiellt vatten och överlevnad av *V. parahaemolyticus* följdes upp i fyra dagar. Bakterierna överlevde lika bra i båda sorts vatten vilket är glädjande eftersom det underlättar rent praktiskt då man inte behöver hämta marint vatten varje gång man studerar hur bakterier uppför sig under olika villkor. Men det som är ännu viktigare är att man kan utföra samma försök var som helst i världen och studien blir inte begränsad till en viss sort vatten.

Med fyra olika kit (TRIzol Max Bacterial RNA Isolation Kit, Qiagen RNeasy Mini Kit, NucleoSpin RNA Plus och Promega SV Total RNA Isolation Kit) extraherades RNA både vid rekommenderade bakterieantal från log-fasen och vid lägre koncentrationer från marint vatten. För att starta med lika mycket bakterier ställdes OD till 0,5 för log-fasen och 0,045 för marint vatten. Extrahering med TRIzol gav högst mängd RNA från både log-fasen och från det marina vattnet där antalet bakterier var mycket lägre än vad som rekommenderas enligt samtliga kit protokollen. Med NucleoSpin fick man högre RNA mängd än med Qiagen. Promega kom långt efter (figur 1). När det gäller A260/A280 som räknades ut för att uppskatta renheten från proteiner och andra kontaminerande ämne så fanns det ingen större skillnad för de olika kätten förutom att RNA extraherad med TRIzol hade lägre men

acceptabelt värde för log-fasen men mycket lägre värde för det marina vattnet.

Gelelektrofores gjordes för att ge en uppskattning om RNA är nedbrutet av RNaser. Hos alla kit visades två band (23S rRNA och 16S rRNA) vilket tyder på bra kvalitet hos alla kit men RNA extraherat med Qiagen uppskattades som mest intakt eftersom den hade tydligaste och mest distinkta band. RNA extraherat med NucleoSpin hade lite diffusa band vilket kan vara tecken på delvis degradering medan RNA extraherat med Promega hade svagaste band vilket kan förklaras av mycket lägre mängd RNA i provet.



Figur 1. Jämförelse mellan olika kit när det gäller extrahering från både log-fasen och marint vatten

Trots att TRIzol gav mest RNA-mängd så finns det vissa nackdelar som sämre renhet, extraheringstid på över en timme till skillnad från Qiagen och NucleoSpin med extraheringstid på 15 minuter, fler toxiska kemikalier och krav på mer avancerad utrustning vilket kan göra att man i vissa fall kan föredra Qiagen eller NucleoSpin.