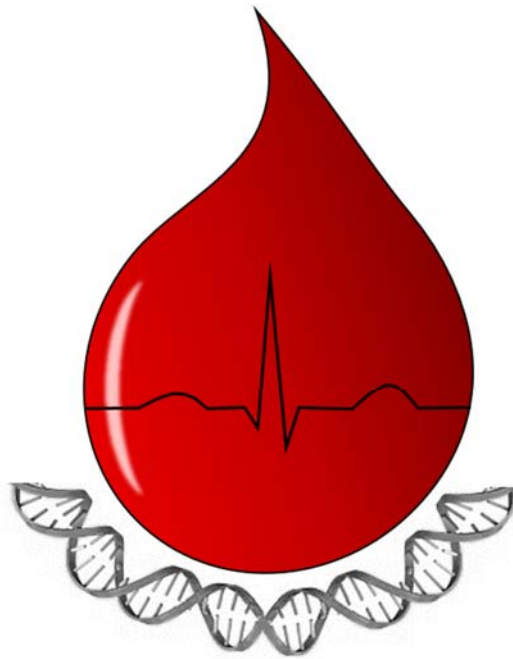




UMEÅ UNIVERSITET



BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Anrikning med Illumina Nextera XT sekvenseringsbibliotek

Jesper Aspelin

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2017



Examensarbetets engelska titel

Enrichment in Illumina Nextera XT Sequencing Libraries

Handledare

Andreas Sjödin och Jonas Näslund, Totalförsvarets forskningsinstitut, Umeå, Sverige

Läroproponent: Mari Norgren

Examinator: Ylva Hedberg Fransson

Datum för godkännande: 2017 06 19

Abstrakt

Next generation sequencing möjliggör djupgående sekvenseringsanalyser, vilket förenklar bland annat smittspårning. Nackdelen med metoden är att den prokaryotiska arvsmassan hamnar i skuggan av den eukaryotiska. DNA kan anrikas med biotininmärkta nukleotider från templat. Dessa binder till det genetiska materialet av intresse för sekvensering samt sänker analystiden och kostnaden. Syftet var att anrika små mängder DNA från olika arter av *Francisella* och utnyttja beten genererade från *F. novicida* och *F. hispaniensis*. Hemmagjorda magnetkolor jämfördes med AMPure beads. Fragmenteringen av DNA utfördes med sonikator från Covaris och optimerades till 150 bp. Betet genererades av 4,7 µg DNA från olika *Francisella*. Fragmentens ändrar reparerades för att binda till adapteroligonukleotider för PCR-amplifiering till RNA. DNA preparerades även från fästingar med *Francisella*-like endosymbiont, och blandades med betet. Proverna biblioteksförbereddes med Illumina Nextera XT inför sekvensering på MiSeq. De hemmagjorda magnetkulorna var något sämre än de kommersiellt tillgängliga kulorna. Covaris gav fragment mellan 191–288 bp. Beten genererades men sekvenseringen av DNA fragmenten misslyckades. Konklusionen var att hemmagjorda magnetkolor kan användas under varje reningssteg för att minska kostnaden. Betesgenereringen lyckades vid koncentrationerna 222,8 samt 285,3 ng/µL DNA. Sekvenseringen misslyckades på grund av att för låg DNA mängd tillsattes. QPCR kunde inte verifiera att beten fungerat.

Nyckelord

Next generation sequencing, Illumina, *Francisella*, betesgenerering, anrikning

Introduktion

Under 90-talet revolutionerades den kliniska verksamheten med Sanger sekvensering, genom att sekvensera amplifierade amplicon av generna (1). På grund av brister hos denna metod, såsom dålig genomströmning, har nya system utvecklats, kallat Next Generation Sequencing (NGS), där Illumina-sekvensering för närvarande har en ledande ställning. Illuminas Miseq öppnar möjligheten att göra en djupgående analys av kliniska prover med avseende på kartläggning med bred diversitet och hög upplösning utan att först använda PCR i och med att den genererar miljontals sekvenser istället för tiotals. Att maximera informationsunderlaget är viktigt vid identifiering och spårning av smittämnen (2). Nackdelen med metoden är att prokaryotisk arvs massa hamnar i skuggan av den eukaryotiska. Detta medför att det inte alltid går att påvisa om en patient är infekterad av ett visst virus eller en viss bakterie, eftersom de flesta sekvenser härrör från värdens DNA. Detta leder till att även ovidkommande DNA sekvenseras, vilket resulterar i att analysen blir både tidskrävande och dyr.

Bakterier som kan vara av intresse för sekvensering är *Francisella tularensis* som har låga infektionsdoser och leder till att patienter insjuknar i harpest. Sjukdomen smittas oftast vid interaktionen mellan människa och djur, då bakterien sprids via fästingar och mygg, samt genom direktkontakt med sjuka djur. Infektionen ger symptom som oklar hög feber, huvudvärk, illamående samt ömmande ulceration under eller efter feberdebuten. Vid aerosolsmitta kan lunginflammation utvecklas (3). En subart av *F. tularensis* är *F. novicida* vilken vanligen inte är sjukdomsframkallande, det har dock konstaterats fall där infektion av *F. novicida* har förekommit hos immunosuppressiva patienter (4). Skillnaden mellan de två bakterierna är relativt liten när man jämför arvsmassan. Det ger problem, speciellt när man utför PCR på ett patientprov där det inte går att identifiera skillnaden mellan dessa arter och närbesläktade bakterier. Cystin-glukos-blodagar test kan användas för att identifiera bakterie då det tar kortare tid för *F. novicida* att tillväxa (5). En annan art i genuset *Francisella* är *F. hispaniensis* som år 2010 hittades i prover från en spansk patient. Den bakterien kan ses som patogen då endast ett fåtal fall hos friska individer har hittills bekräftats (6).

De största Illumina sekvenseringsmaskinerna kan generera miljarder sekvenser till en låg kostnad, och när man vet vad man letar efter finns det olika typer av provupparbetningar. Ett sådant alternativ är post-biblioteksanrikning som gör det möjligt att bygga upp ett arbetsflöde som gör sekvenseringen snabbare och billigare. På ett templatfragment utförs en PCR-reaktion tillsammans med nukleotider som innehåller biotin. Detta gör att templatet kan binda till DNA som är av intresse genom komplementär inbindning, resterande arvsmassa tvättas bort. Tanken är att anrika det DNA som förekommer i en låg koncentration inför sekvensering. Fördelen med denna metod är att man enkelt kan utläsa bakteriers och virus genotyp och antibiotikaresistens utan att genomföra uppodling och utföra biokemiska tester (7, 8). Förhoppningen är att denna metod ska ge ett snabbt och billigt svar.

Syftet med detta arbete var att utveckla en metod som anrikar små mängder genetiskt material från olika arter av *Francisella* i kliniska prover genom att utnyttja beten genererade från de BSL2-klassade bakterierna *F. novicida* och *F. hispaniensis*.

Material och metoder

Bakterier och odlingsbetingelser

Det undersökta materialet bestod av två *F. novicida* stammar och en *F. hispaniensis* stam (Totalförsvarets forskningsinstitut, Umeå, Sverige) som odlades på McLeod-plattor under tre dagar, vid 37°C i närvaro av 5 % CO₂. För att validera att metoden fungerat användes *Francisella*-like endosymbiont (FLE) infekterade fästingar (Pirbright Institute, Pirbright, England).

Upparbetning av material

Bakterierna löstes upp i 0,9 % NaCl till en koncentration av 6,0 x 10⁹. Det genetiska materialet preparerades därefter med ZR fungal/bacterial DNA Microprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA). För att säkerställa koncentrationen DNA undersöktes detta med spektrofotometern Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). För att kontrollera renligheten användes Nanodrop (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) där kvoten angavs till ca 2,0. För att säkerställa DNA storleken användes 3 % agarosgel. För preparation av DNA från fästingceller centrifugerades cellerna, pelleten resuspenderades i H₂O och preparerades med Magled 6gc (Precision System Science Co, ltd. Japan).

Preparering av magnetkolor

I ett falconrör med TE buffert (0,5 M EDTA, 1 M Tris pH 8), tillsattes Sera-mag magnetic carboxylate (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, Storbritannien) innan röret placerades i ett magnetställ. Supernatanten avlägsnades och TE-buffert tillsattes till pelleten. Detta steg upprepades två gånger. Kulorna resuspenderades i TE. PEG-8000 (Thermo Fischer, Geel, Belgien) blandades med TEN buffert (5 M NaCl, 1 M Tris, 0,5 M EDTA), därefter tillsattes 27,5 µL Tween 20 som mixades. Till lösningen applicerades 1 mL Sera-mag som löstes homogent.

För att kontrollera Sera-mag kulorna mixades 2,1 x magnetkulorna med 1 µL 1 kb Generuler (Fermentas, Geel, Belgien) och 4 µL dH₂O. Blandningen inkuberades fem min i RT innan det placerades på magnetställ. Supernatanten avlägsnades och pelleten tvättades med 500 µL färsk 70 % etanol, följt av ytterligare inkubering i RT i en min. Steget upprepades två gånger innan kulorna placerades på 37°C värmeblock under tre till fyra min, tills kulorna var torra. Detta rehydrerades med 20 µL vatten och ställdes på magnetställ. Supernatanten applicerades i ett nytt rör som sedan analyserades på 2 % agarosgel 80V, två tim.

Optimering av sonikator

För att uppnå önskad DNA fragmentlängd av 150 bp testades olika inställningar av sonikatorn Covaris M220 (Covaris, Woburn, MA, USA) enligt protokoll från företaget. Först testades en gemensam inställning med Peak Incident Power (PIP) 50 V, duty factor (df) 20 % och cycles per burst (cpb) 200. Därefter testades tider från 80 sek till 750 sek. Sonikatet analyserades på 3 % agarosgel. Därefter ändrades cycles per burst mellan 100–800, med 100 mellan varje, och tiden konverterades till 375 sek. Sonikatet analyserades åter på gel. Cpb ändrades till 50 och DF till 15 samt 25. Med ändrad inställning till cpb 50 justerades även tiden med 25 sek intervaller mellan 175–375 sek. Inställningarna ändrades till varierad PIP och DF till 60 respektive 30 samt tillsammans. Därefter ändrades DF till 35–40. Nya

inställningar testades med PIP 75, DF 20, cpb 250 och 210 s. Dessa verifierades sedan på Fragment Analyser (Advanced Analytical, Ankeny, IA, USA).

Betesgenerering

Vid framställningen av DNA beten användes 4,7 µg DNA som renades med AMPure XP (GE Healthcare, Brea, CA, USA), detta inkuberades vid RT i fem min. Provet placerades i ett magnetiskt ställ under ytterligare fem min i RT tills lösningen var klar. Supernatanten avlägsnades och resterande prov tvättades med 70 % etanol två gånger på magnetställ. Kvarvarande prov resuspenderades i H₂O och inkuberades fem min i RT. DNA samlades upp i supernatanten i ett nytt rör.

Genomets ändrar reparerades med end repair buffer (Biolabs New England, Ipswich, MA, USA) och end repair mix (Biolabs). Det kunde därefter inkuberas vid 20°C i 30 min på mixer. Efter ytterligare rening med magnetkolor, blandades DNA med dA- Tailing Reaction buffer (Biolabs), Klenow Fragment (Biolabs) och inkuberades enligt tidigare.

Oligo-adapter designades för T7 transkription promotor med sekvens 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3' samt oligos EcoT7cTV Fwd: 5'-GGA AGG AAG GAA GAG ATA ATA CGA CTC ACT ATA GG CCT GGT-3' och rev: 5'-/5phos/C CAG GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA TCT CTT CCT TCC TTC C-3'. Adaptrarna rehydrerades till en initial lösning till 150 µM. För att skapa T-överhäng tillsattes Adapter Oligo ett (EcoT7dev) och två samt 10x NEB Buffer 2 (Biolabs) och H₂O. Detta inkuberades vid 95°C i fem min för att sedan inkuberas tio min vid RT.

DNA:t blandades med 10 µL 5X ligation buffer (Biolabs), DNA ligase, 25 µM adapter och H₂O. Därefter eluerades detta med magnetkolor och proverna renades åter enligt tidigare. Proverna denaturerades med 4X hybridiseringsbuffert (200 mM HEPES pH 7,5, 2 M NaCl, 0,8 mM EDTA), vid 98°C i tre min, temperaturen sänktes därefter till 65°C. Efter fyra tim inkubering tillsattes H₂O som hade förvärmats till 70°C, 1 µL Duplex Specific Nuclease (DSN) (1 U/µL) (Axxora, Lausen, Schweiz) och 1 µL 10X DSN buffert (Axxora). När 20 min av inkubering var fullbordad applicerades 5 µL 2X DSN stop solution 10 mM EDTA.

Provet renades åter med magnetkolor. Det icke-smälta DNA:t bearbetades med 15 µM EcoT7dTV fwd primer, 2,5 µL 10X NEB Buffer 2, 0,5 µL 10 mM dTNP och 10µL H₂O för att sedan inkuberas vid 94°C under två min för att sedan sänkas till 35°C i två min. Därefter sänktes temperaturen ytterligare till 25 °C i 45 sek, då det tillsattes 1 µL (5U) Klenow DNA polymeras (Biolabs). Temperaturen höjdes åter till 37°C vid 90 min, därefter 75°C i 20 min. Reaktionen stoppades med 2,5 µL 0,5 M EDTA (pH 8,0). Det DNS spjälkade DNA:t analyserades på 3 % agarosgel och extraherades mellan 200–300 bp med Zymogen DNA recovery kit. DNA:t PCR amplifierades med EcoT7 PCR 1 5'- GGA AGG AAG GAA GAG ATA ATA CGA CTC ACT- 3' och EcoT7 PCR 2 5'- TAC GAC TCA CTA TAG GGC CTG GT-3'. Detta mixades med 25 µL 2X HiFi RM, 25 µM primer 1, 25 µM primer 2 och vatten med PCR programmet: 98°C i 45 sekunder, 98°C i 15 sek, 65°C i 30 sek, 72°C under 30 sek, detta repeterades 16 cykler. Avslutningsvis avslutades amplifieringen vid 72°C i 1 min och till sist vid 10°C. Med AMPure renades DNA:t enligt tidigare. Till följd av detta verifierades koncentrationen genom analys med Qubit.

Med Speedvac dunstades volymen DNA till minst 100 nM för att sedan blandas med T7 5X reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 75 mM T7 ATP solution, T7 CTP, T7 GTP, UTP, 50 mM Biotin-UTP, T7 enzyme mix och vatten till 20 µL, för att sedan inkuberas vid 37°C under fyra tim. Provet smältes med 5 µL RQ1 DNase (Biolabs) vid 37°C under 15 min. De nybildade RNA fragmenten renades med fenol, kloroform och isoamylalkohol (125:24:1) för att därefter centrifugeras i 17 000 g under en min, till följd av extrahering av övervätskan. Detta gjordes åter med kloroform-isoamylalkohol-lösning. Proverna mixades med 3 M NaAc (pH 5,2) och isoamylalkohol. Proverna placerades fem min på is före ytterligare centrifugering i tio min. Proverna koncentrerades genom frystorkning med SpeedVac (Eppendorf) under tio min. Därefter kvantifierades mängden DNA med Qubit. De nyproducerade RNA proverna blandades med 10X NEB Buffer 4 (Biolabs) och inkubades vid 90°C under fem min, för att sedan kylas ner till RT i tio min.

Fångstbaserad anrikning

För varje bete bestämdes koncentrationen och blandades till 5 µg DNA för att sedan blandas med tre separata fästingcellinjer som blivit infekterade med *F. novicida* och *F. hispaniensis*, samt en cellinje som blandats med vardera bakteriestammen. Proverna inkubades ca en tim, 65°C.

Biblioteksförberedelse

Dynabeads MyOnte streptavidin C1 tvättades med MinION Bead Binding Buffer (BBB) (Illumina, San Diego, CA, USA) för att därefter tillsättas i proverna innehållande RNase, där de inkubades i fem min vid RT på magnetställ. Supernatanten pipetterades bort och BBB tillsattes och tvättades två gånger. Med MinION Elution Buffer eluerades proverna till nytt rör. Proverna koncentrationsbestämdes och koncentrerades till 1 ng genom frystorkning med SpeedVac. På midiplatta tillsattes proverna tillsammans med 10 µL Tagment DNA Buffer, plattan centrifugeras en min 20°C 280 g för att sedan analyseras med PCR 55°C fem min och förvarades vid 10°C. Efter detta tillsattes 5 µL Neutralize Tagment buffer. Indexprimer N712 tillsattes i samtliga brunnar. Därefter användes index S502-S508 samt S517. Till följd av Nextera PCR mastermix. Proverna centrifugerades enligt tidigare för att sedan mångfaldigas i PCR med följande program: 72°C i tre min, 95°C 30 sek, 12 cykler med 95°C tio sek, 55°C och 75°C 30 sek var, 72°C i fem min och 10°C på hold.

När PCR reaktionen var slutförd centrifugerades produkten och fördes till en ny platta där AMPure XP beads tillsattes, lösningen blandades på skak vid 1 800 g under två min till följd av inkubation vid RT i fem min. Proverna placerades på ett magnetställ i ca två min, till lösningen blivit genomskinlig. Supernatanten avlägsnades och magnetkulorna tvättades två gånger med 80 % etanol. Efter att kulorna torkat i 15 min tillsattes Resuspension Buffer (Illumina) och applicerades åter på skakning, därefter inkubades de i två min. Röret placerades på magnetställ till vätskan blivit klar. Därefter flyttades supernatanten till nya brunnar.

För att normalisera biblioteket flyttades provet till en ny midiplatta. Till varje brunn tillsattes Library Normalisation Additives 1 (Illumina) och Library Normalisation Beads 1 (Illumina). Efter 30 min skak-inkubation placerades midiplattan på magnetställ, supernatanten avlägsnades och brunnarna tvättades med Library Normalisation Wash 1 för att åter skakas fem min, detta upprepades ytterligare

en gång. Till vardera brunnen tillsattes 0,1 M NaOH för att skakas. Efter fem min placerades plattan på magnetställ där supernatanten överfördes till rör innehållande Library Normalisation Storage Buffer 1. Proverna poolades och blandades med Hybridization Buffer för att sedan inkuberas vid 96°C i två min. Detta kylades därefter på isbädd. Proverna kunde därefter sekvenseras på Miseq (Illumina).

Kvantitativ PCR

De producerade betena inkuberats med spikade prover, 24 tim 65°C. Positiv kontroll av *Francisella* skapades genom att tillsätta *F. novicida* och *F. hispaniensis* till fästing DNA. Dessa PCR-amplifierades med följande primrar: De_ano_ITS2_F 5'-GCA ATT TGC TTG TTG TTT GCA MGA ATC T- 3' och De_ano_ITS2_R 5'-CCG CTC CGC GCA MGA ATC T-3', med proben 5'-[FAM] TTC GGA GTA CGT CGA GCT CCA GAG CT [MGBEQ], samt GR1 F 5'- AAC TGG CTG ACC TTC AGC AT-3' OCH GF1 R 5'- GTG GTC GTG GTA AAG CTG GT- 3' med GF1 probe 5'CCT ATT AGG CTT GCT ACT TCA CGA- 3'. PCR reaktionen genererades med inställningarna 95 °C tre min, 95 °C fem sek, 5°C 30 sek under 40 cykler och förvarades vid 4°C.

Etiska överväganden

Denna metod innehöll inte några humana prover eller material från andra däggdjur, därför behövdes inget etiskt tillstånd för att genomföra studien.

Resultat

Behandling av DNA inför betesgenerering

För att utvärdera om AMPure XP och egengjorda magnetkulorna band DNA likvärdigt, analyserades DNA på en agarosgel. AMPure XP band mer DNA jämfört med de egengjorda magnetkulorna, vid spädning 1/10. Då proverna späddes ytterligare detekterades inget DNA (Fig. 1). Under flerfaldiga spädningar band de kommersiella magnetkulorna bättre än de egentillverkade.

Vid sonikeringen var följande inställningar lämpliga för försökets syfte: Peak Incident Power; 75, Duty Factor; 20, 250 cycles per burst, under 210s. Vid jämförelse på 3 % agarosgel sågs en skillnad mellan Covaris rekommenderade inställning och den optimerade inställningen (Fig. 2). Den optimerade inställningen gav band mellan 100–200 bp, vilket inte detekterades med rekommenderad inställning. Vid analys i fragment analyzer noterades en stor topp med storlek 0 – 1000 bp för *F. hispaniensis* och 191 bp för *F. novicida* (Fig. 3).

Betesgenerering, sekvensering och qPCR

De beten som genererats med AMPure XP beads uppmättes till en koncentration av 222,8 ng/μL för *F. hispaniensis* och 285,3 ng/μL för *F. novicida*. Det kunde påvisas att DNA från *F. novicida* och *F. hispaniensis* bundits till betet, med Qubit uppmättes koncentrationerna till 0,069, 0,099, 0,169 och 0,062 ng/μL. MiSeq sekvenseringen av det fiskade DNA:t misslyckades på grund av för låg koncentration DNA som laddats, vilket gjorde att resultatet inte kunde verifieras mot kontroll.

Vid analys med qPCR kunde fästing-DNA, innehållande *F. novicida* och *F. hispaniensis*, amplifieras efter 29 cykler medan resterande fästing- och *Francisella*-DNA amplifierades efter 36 vilket gav sju cyklers skillnad vid detektion (Fig. 4).

Diskussion

Syftet var att utveckla en metod som anrikar olika arter av *Francisella* genom att koncentrera det genetiska provet. Anrikningen gjordes för att lättare kunna sekvensera prover där bakterierna kan förekomma, då de annars hamnar i skuggan av annat DNA med högre koncentration.

Under arbetets gång utfördes många reningssteg med AMPure XP beads. Dessa magnetkulor skulle kunna ersättas med egengjorda beads, som är likvärdiga, men till endast en tiondel av priset för de kommersiella kulorna (9). Tillvägagångssättet med egentillverkade kulor fungerade väl och en stor mängd produkt utvanns. När magnetkulorna sedan jämfördes med varandra, i relation till en standard, observerades att AMPure XP binder något bättre än de hemmagjorda. Därför användes de kommersiella. Vid senare försök, som var utanför detta arbete, kunde man fastställa att skillnaden mellan produkterna är tillräckligt liten för att man skulle kunna använda de egentillverkade i framtiden.

Under sonikering testades ett flertal inställningar som utgick från Covaris egna protokoll, med målet att erhålla fragment kring 150 bp. Denna fragmentstorlek uppnåddes, men inga tydliga band detekterades på gelen under upprepade analyser. Metoden optimerades enligt Lee et al 2014 och resultatet var positivt. När resuspensionen sedan analyserades med fragmentanalyser framkom resultat som avvek från det som sågs på gel. Fragmentanalyzern visade inte något band förutom ett stort fragment storlek 0–1000 bp. Gelen visade DNA med storlek 100–500 bp. Vad detta berodde på är oklart, men eftersom agarogelen indikerade på fragmentstorlek mellan 100–200 bp gjordes ett antagande att fragmenten hade denna sekvensstorleks variation.

Betesgenereringen utgick från två tidigare studier där de skapade metoden (7, 8). Den koncentration som utmättes på Qubit ansågs vara tillräckligt hög för att fler försök för anrikning av *Francisella* ska vara möjlig. Detta var ett resultat som var över förväntan, då det befarades att för mycket DNA skulle ha tvättats bort mellan reningsstegen. För att säkerställa att det hela tiden fanns DNA gjordes koncentrationsbestämning på Qubit mellan varje tvätt. En sak skiljde sig från tillverkarens metodbeskrivning, nämligen att vid tillsättning av DSN skulle även human Cot-1 DNA vara med i hybridiseringen, något som uteslöts eftersom detta DNA saknades vid laboratoriet. Cot-1 hämmar repetitiva sekvenser under kartläggning av DNA. Detta hindrar strängarna från att återförenas efter att DNA:t har blivit enkelsträngat (11).

Under den fångstbaserade anrikningen skulle det genererade betet binda till det bakteriella DNA:t. I tidigare dokumentation inkuberades detta i 48 tim (8), vilket i detta fall ansågs det vara för hög och tiden kortades ner till en tim, då det enbart skulle binda komplementärt. När detta steg skulle upprepas för qPCR fick det inkubera i 24 tim för att minska risken för felkällor.

Vid sekvenseringmomentet observerades att Nextera XT behövde 1 ng DNA för att fungera. Det innebar att bara en mycket liten koncentration bete och templat fiskades upp från den ursprungliga 5 µg DNA mängden. Koncentrationen uppskattats, vilket kan utgöra felkällan till att sekvenseringen inte fungerade. Det förväntades vara en skillnad mellan prover analyserade före och efter capture, då det

tidigare har det setts minst 10 % skillnad (8). På grund av för kort tid kunde inte en ytterligare sekvensering ske så en sådan jämförelse får göras vid vidareutveckling av metoden.

Det erhållna resultatet med qPCR visade att de prover som innehöll blandning mellan fästing och *Francisella* DNA amplifierats i ett tidigare stadie än de övriga fästingproverna. Detta var förväntat resultat, därför att dessa prover hade fått *F. novicida* eller *F. hispaniensis* tillsatt, för att kunna jämföras med de fästinglinjer som enbart innehåller fästingceller och beten. Förhoppningen var att detta skulle ge en indikation om metoden fungerat. De sekvenser som erhöles efter betesinbindningen var helt okända, vilket gör att de primrar som använts troligen inte var specifika, därför går det inte att dra någon slutsats huruvida metoden fungerade.

Metoden med betesgenereringen baserades på RNA-bete istället för DNA, det medförde fördelen att när betet bundit till DNA, förstör RNase betet och därigenom gör att bara DNA blir sekvenserat. Om betet varit DNA-baserat hade detta inte varit möjligt och en bakgrund hade kunnat finnas under sekvenseringen. Det protokoll som följdes gjorde att en stor mängd RNA bete kunde utvinnas, vilket gjorde att stegen efter betesinbindningen skedde under en kort tid och ett svar skulle kunna ges efter 24 tim. Nackdelen med metoden var Nextera XT, vilket var känslig för mängden DNA på 1 ng. I en tidigare studie jämfördes olika biblioteksförberedande kit för MiSeq. Deras resultat indikerade att TrueSeq nano behöver en högre mängd DNA och ger en lägre risk för GC-bias. Enda nackdelen med den biblioteksförberedningen är att den är mer tidskrävande än Nextera XT (12).

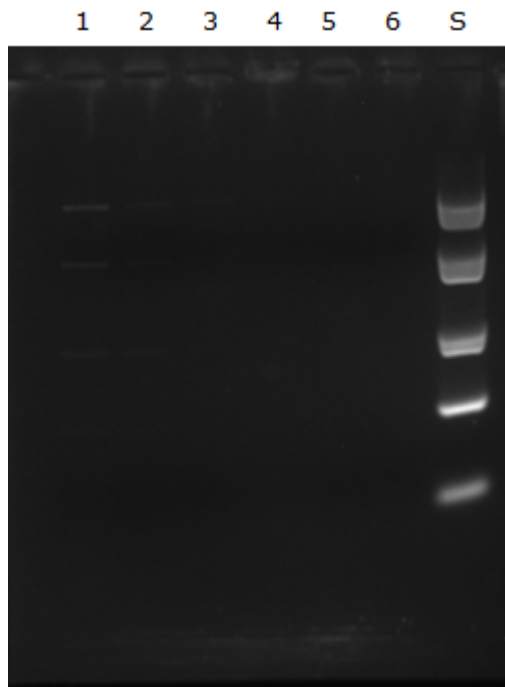
Konklusionen var att hemmagjorda magnetkolor kunde användas under varje reningssteg, det gjorde att kostnaderna minskade. Betesgenereringen lyckades vid koncentrationerna 222,8 samt 285,3 ng/ μ L DNA. Sekvenseringen misslyckades på grund av för låg koncentrationstillsättning. QPCR kunde inte verifiera att betet fungerat.

Tack tillägnas

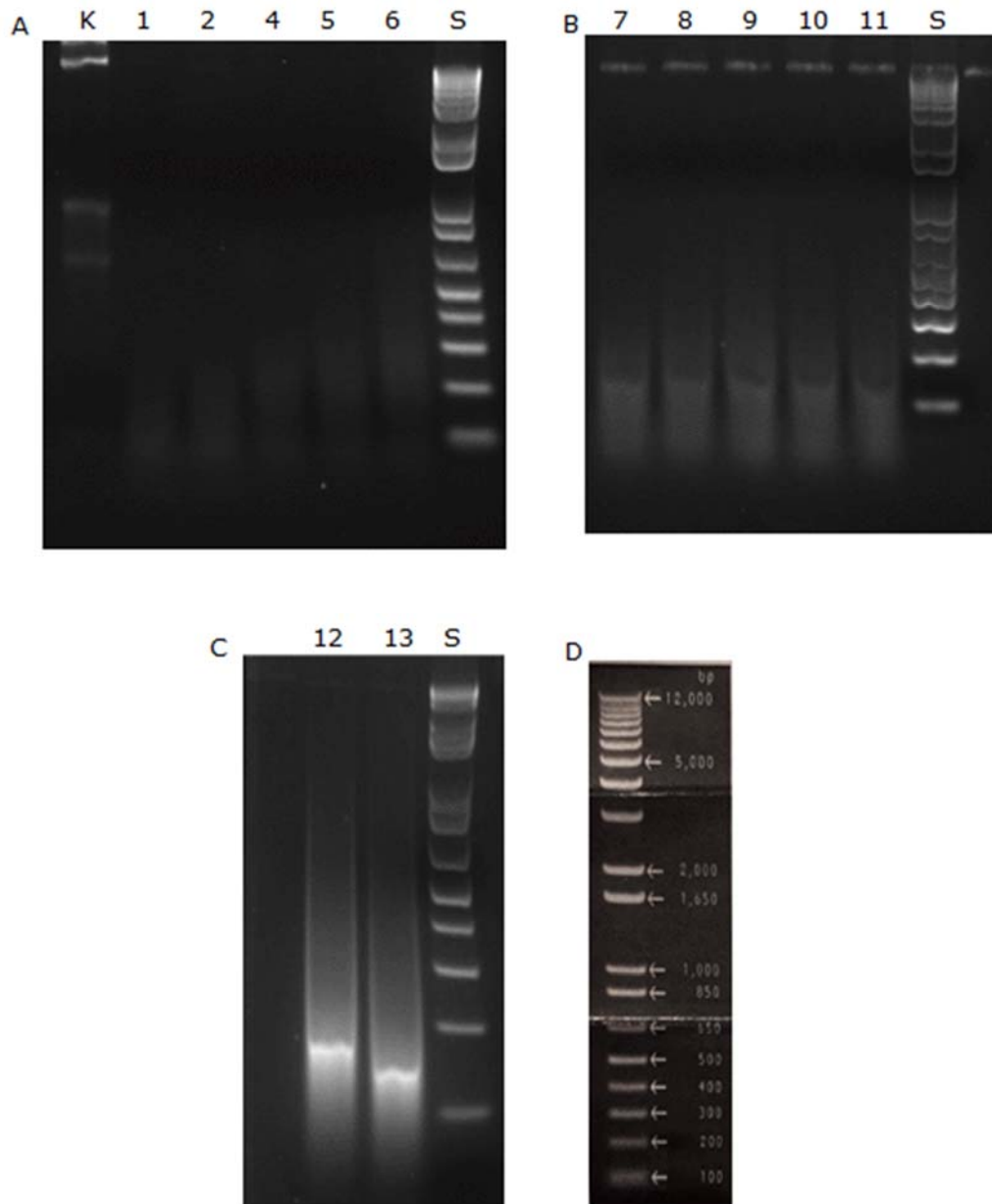
Jag vill tacka mina handledare Andreas Sjödin och Jonas Näslund för bra handledning och Linda Karlsson för laborativ assistans i denna studie. Framför allt vill jag tacka Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI) för att jag fått göra mitt examensjobb hos dem.

Referenser

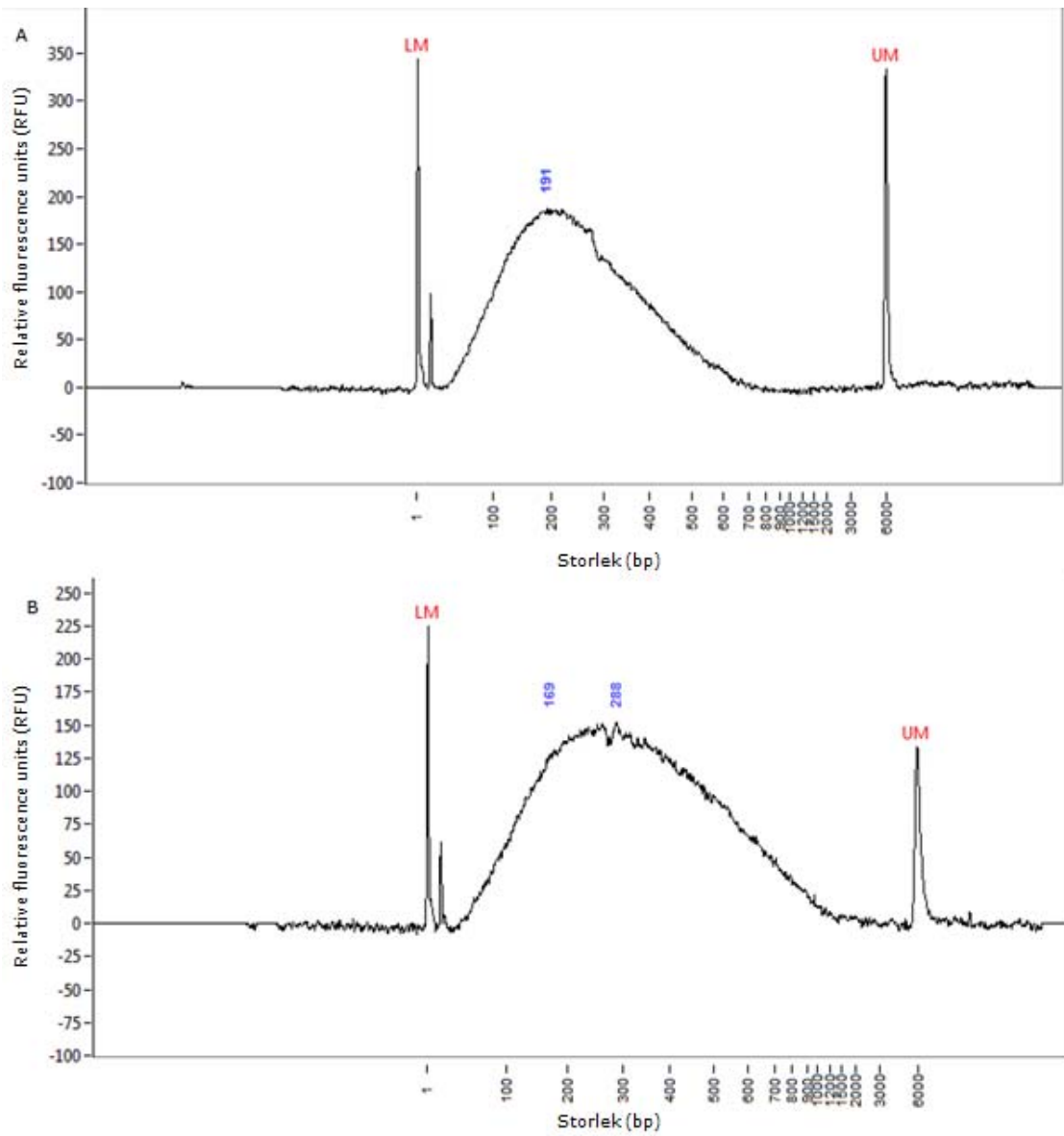
1. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 1986; 321 (6071): 674-679
doi:10.1038/321674a0
2. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms, *Annu Rev Anal Chem*, 2013; 6: 287-303 doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628
3. *Francisella tularensis*, Internetmedicin
<http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=1828> 2017-04-10
4. Aravena-Román M, Merritt A, Inglis TJJ. First case of *Francisella* bacteraemia in Western Australia. *New Microbes New Infect.* 2015;8:74-77 doi: 10.1016/j.nmni.2015.10.004.
5. Owen CR, Buker EO, Jellison WL, Lackman DB, Bell JF. Comparative studies of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *J Bacteriol.* 1964;87 (3): 676-683.
6. Huber B, Escudero R, Busse HJ, Seibold E, Scholz HC, Anda P, Kämpfer P Et al. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int j Syst Evol Microbiol.* 2010;60 (8): 1887- 1896. doi: 10.1099/ijs.o.015941-0
7. Carpenter ML, Buenrostro JD, Valdiosera C, Schroeder H, Allentoft ME, Sikora M, Rasmussen M, et al. Pulling out the 1%: whole-genome capture for the targeted enrichment. of ancient DNA sequencing libraries. *Am J Hum Genet*, 2013;93(5): 852-864. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.002
8. Snyder-Macker N, Majoros WH, Yan ML, Shaver AO, Gordon JB, Kopp GH, Schlebusch SA, et al. Efficient genome- wide sequencing and low-coverage pedigree analysis from noninvasively collected samples. *Genetics*, 2016; 203(2): 699-714. DOI: 10.1534/genetics.116.187492.
9. Rohland N, Reich D. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res.* 2012;22(5): 939-946. doi: 10.1101/gr.1281124.111
10. Lee LJ, Abdullah. Optimization of genomic DNA shearing by sonication for nextgeneration sequencing library preparation. *AsPac J Mol Biol Biotechnol.* 2014;22 (3): 200-208
11. Human Cot 1 DNA, Thermo Fischer
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15279011> 2017-05-16
12. Lan JH, Yin Y, Reed EF, Moua K, Thomas K, Zhang Q. Impact of three illumina library construction methods on GC bias and HLA genotype calling. *Hum Immunol.* 2015;76(2-3):166-75. doi: 10.1016/j.humimm.2014.12.016



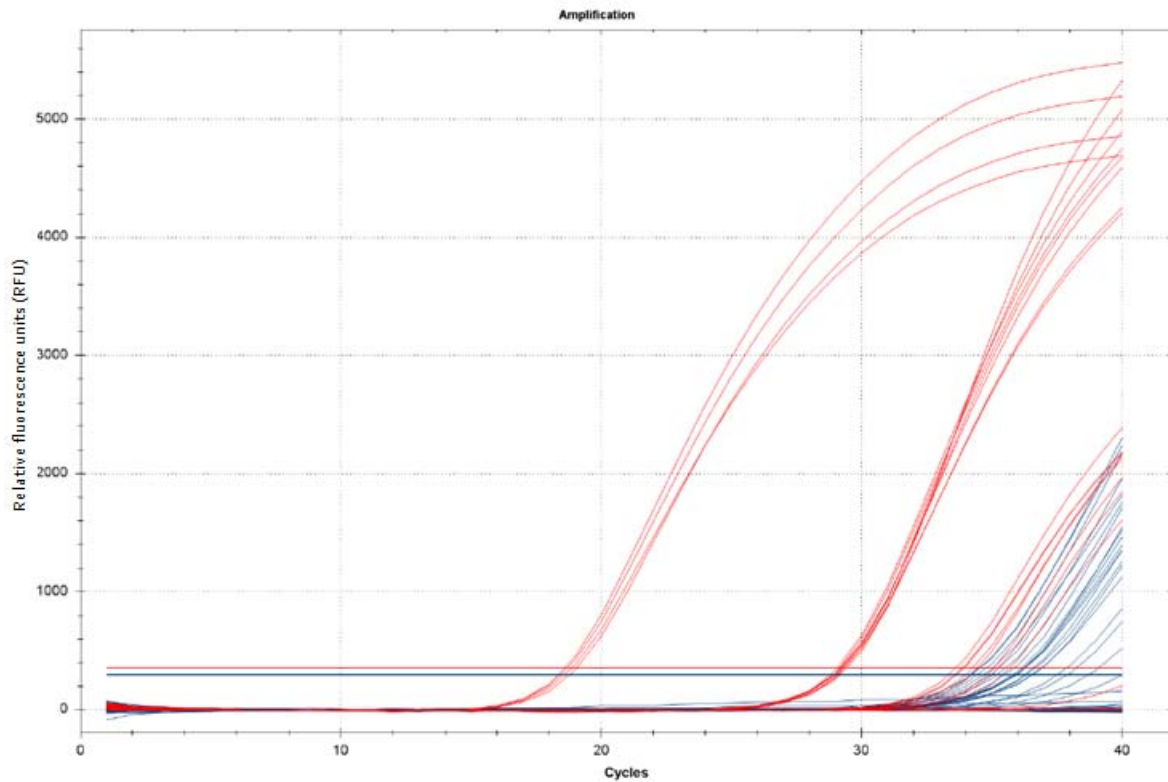
Figur 1. AMPure XP kontra hemmagjorda magnetkolor blandade med 1 kb Generuler standard, med olika spädningar, i 2 % agarosgel. 1: AMPure 1/10 2: Hemmagjorda 1/10 3: AMPure 1/100 4: Hemmagjorda 1/100 5: AMPure 1/1000 6: Hemmagjorda 1/1000 S: standard.



Figur 2: Olika inställningar på sonikator från Covaris. A) Samtliga brunnar hade inställningarna PIP 50 V, DF 20 %, cpb 200. Brunn 1 innehöll DNA som inte hade sonikerats, det användes som kontroll. Resterande brunnar hade sonikerats i 100 sek, 150 sek, 200 sek och 300 sek. B) Brunnar 6–10 hade gemensamma inställningar PIP 75, DF20, cpb 200. I ordning sonikerades de 170 sek, 180 sek, 190 sek, 200 sek och 330 sek. C) Slutinställning på PIP 75, DF 20, cpb 250, 210 sek. Brunn 11–12 innehöll DNA från olika *Francisella*. D) Den standard som användes var 1 kb Plus DNA storleksstandard (Invitrogen).



Figur 3. Fragmentstorlek för respektive bakterie efter sonikering med inställningarna PIP: 75, DF: 20, cpb: 250, tid: 210s. LM visar den låga kontrollen och UM visar den övre kontrollen. A) *F. novicida*. B) *F. hispaniensis*



Figur 4. Resultat erhållet från kvantitativ PCR analys. De prover som använts är tre olika fästing-cellinjer som kan innehålla *Francisella*-like endosymbiont (FLE). Röd visar prover innehållande fästing DNA. Blå visar prover för *Francisella*.