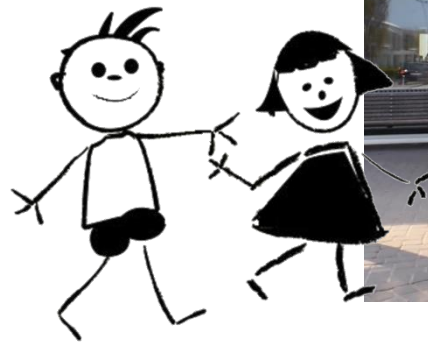


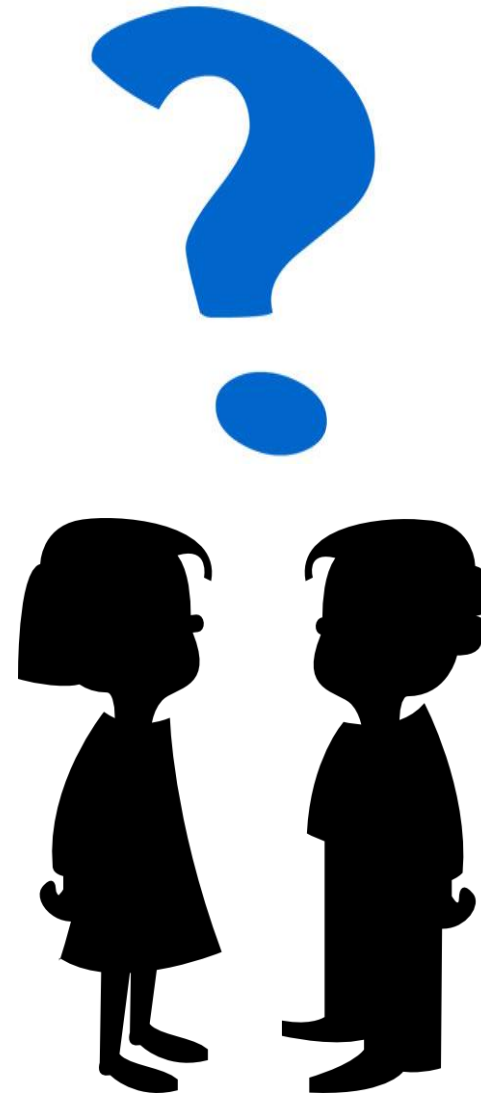
Forhistorie

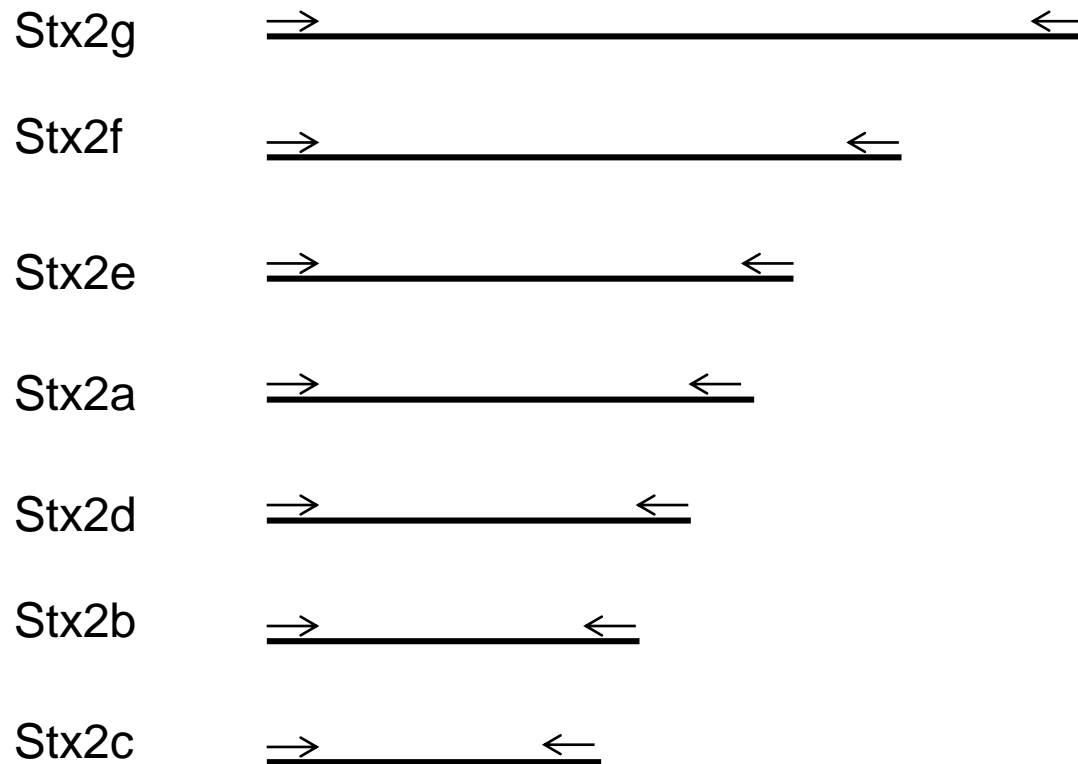




Kapillær elektroforese:

- Smart
- Hurtigt
- Nemt
- Kun lille fare for forurening





"Multicenter Evaluation of a Sequence Based Protocol for Subtyping Shigatoxins and Standardizing Stx Nomenclature
Flemming Scheutz et al. 2012

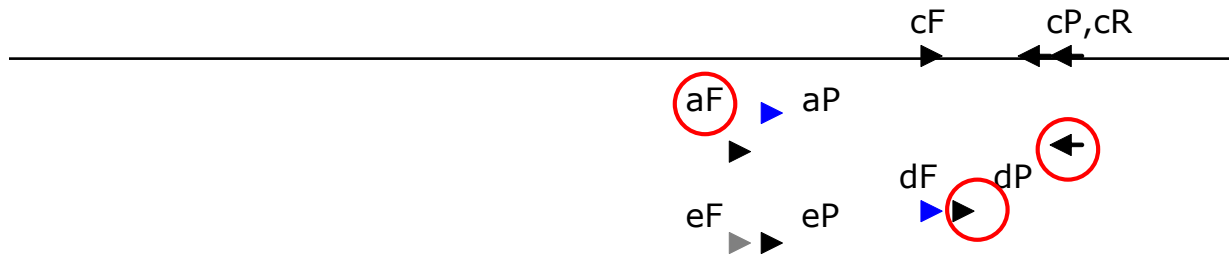
Prober lægges så de fanger det samme som den tilstødende primer



Query_149961	1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGCTTTAT	TTGCTTTTGTTCGTTAATGCAATGC	60
LM997161	173501	173560
LM996832	10134	10075
LM996529	337138	337192
LM995896	3310	3251
LK999983	7381	7440
LK999941	175611	175670
LK985420	3753	3694
LM997367	13251	13192
AB854278	969	1028
GU126552	969	1028
EF441616	969	1028
AJ567997	1044	1103
AJ567995	1030	1089
AJ313015	1045	1104
AB048238	969	1028
AB048226	969	1028
AB048225	969	1028
AB048224	969	1028
AB012101	969	1028
AF043627	1145	1204
L11078	1145	1204
X65949	1544	1603
AB048229	969	1028
AB048228	969	1028
AB048223	969	1028
AB012102	969	1028
FN252459	1235G...A.G...T.....A..A.....	1291
FN252458	1167G...A.G...T.....A..A.....	1223
EU184879	1G...A.G...T.....A..A.....	56
AF298816	978	1037

Ikke muligt at blande primere og prober for a og d i et "HUS" mix

Stx2c: KP120726



aP c/t i midten af proben, fanger kun uhyre svagt, hvis overhovedet

dF c/t i midten af proben, fanger kun uhyre svagt, hvis overhovedet

dR1 fanger 100% vil kunne lave fragment med cF og aF og eF, c P vil virke men det vil dP også, så her er et problem

aF+dP+dR1 vil kunne fange 2c

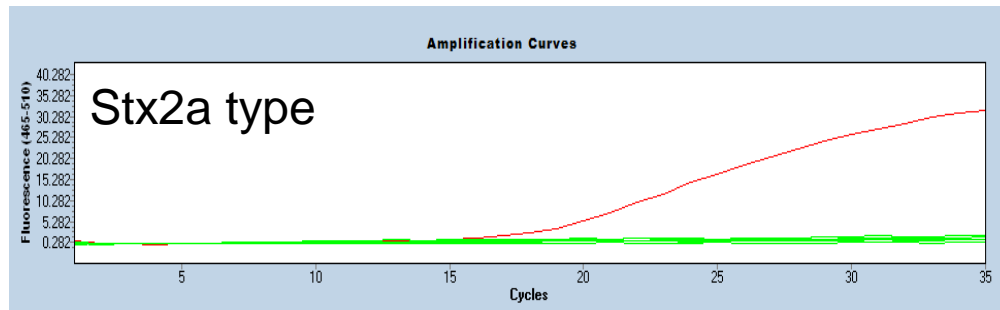
eP vil kunne fange 2c sammen med aF og cR og dR1, men det er ikke så vigtigt.

Konklusion: HUS mixet med a og d primer prober fanger en c variant, nok nødvendigt at skille a og d.

PROCEDURE:



Bakteriekolonierne opslemmes i 0,5 ml vand og koges i 10 min



Stx2: a,b,e,f,g,

MASTERMIX

TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems).

5 µl prøve til 10 µl mix

7 singleplex reaktioner

PCR cycling program:

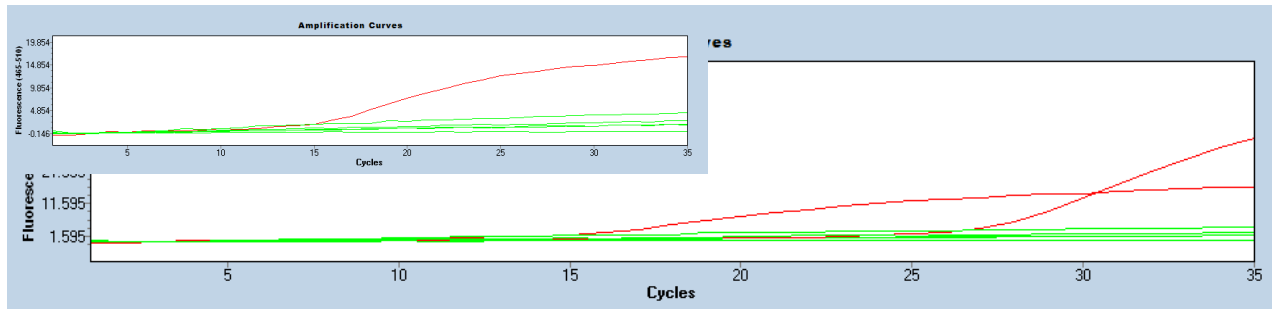
UNG: 2 min 50 °C

Init denat: 10 min 95 °C

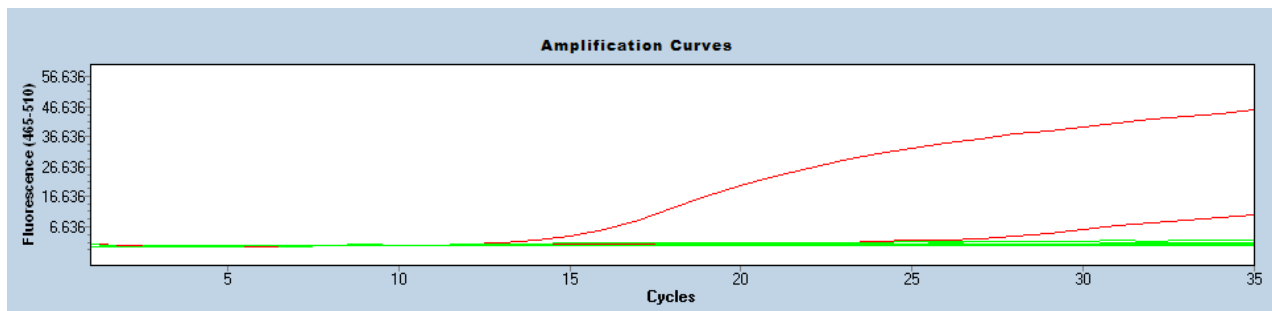
Cycling (35) 1 sek 95 °C

45 sek 64 °C

Krydshybridisering finder sted mellem stx2d og stx2c, primer/prober men er ikke et problem for typningen



Stx2d type kørt med de 7 PCR reaktioner, svagt signal med stx2c primer/probe



Stx2c type kørt med de 7 PCR reaktioner, svagt signal med stx2d probe

KONKLUSION: MULIGT AT LAVE STX2 TYPNING UDEN GELKØRSEL

