

# Påvisning af Salmonella

i Levnedsmidler med PCR

Kenneth Buchwald Johansen

Oktober 2008

TEMA: LEVNEDSMIDLER II

3LABA0808

## 1 Formål

At bruge PCR-metoden til at påvise Salmonella i levnedsmidler (kødprøve).

## 2 Princip og metode

PCR-metoden bruges til at mangfoldiggøre små stykker DNA.

Der vælges primere, der bruges til at udvælge det stykke DNA, der skal mangfoldiggøres. Metoden består i at gentage en reaktionscyklus, hvor mængden af specifikt DNA-segment i prøven fordobles. De to DNA-strenger denatureres ved varmebehandling, hvorefter primerne kan binde sig til DNA-enkeltstrengene ved baseparring og virker som startsted for den efterfølgende DNA-syntese. En varmestabil DNA-polymerase (Taq DNA-polymerase) bruges idet den tillader gentagne cykler uden tilsætning af enzym. Der opnås  $10^5$ - $10^6$  gange forøgelse af DNA-stykket i løbet af ca. 35 reaktionscykler. Mangfoldiggørelsen er altså eksponentiel. Princippet i PCR kan ses i figur 1.

I praksis isoleres DNA fra levnedsmiddelprøven (kød), behandles med proteinase og koges. Derved lyses cellerne og DNA'et frigøres.

Der bruges primerne ST11 og ST15, som anneales specifikt til template-DNA fra Salmonella. Primerne afgrænser et område på 429bp, som vil blive opformeret under PCR-reaktionen.

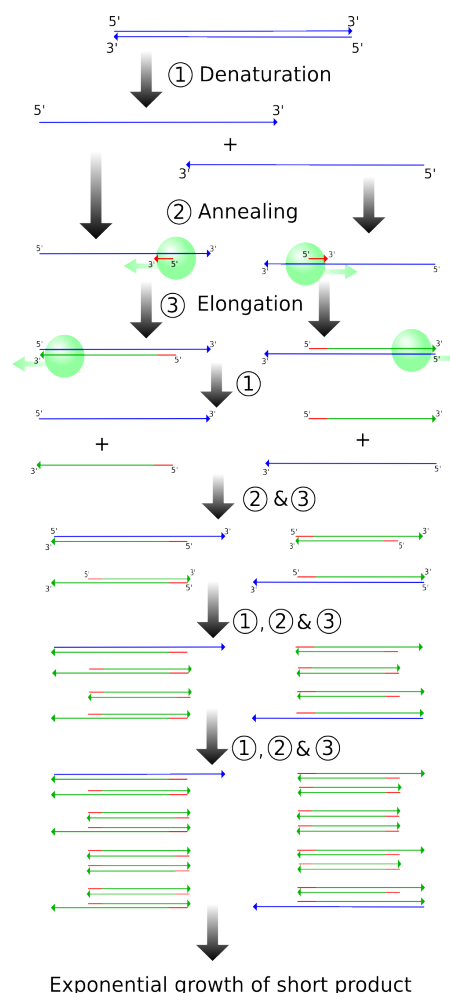
Prøver (dobbeltbestemmelse), positiv kontrol (Salmonella Adabraka), negativ kontrol (E. coli) og blindprøve køres på thermocykler blandet op med bl.a. dNTP og Taq-polymerase (30 cycles).

Der køres elektroforese på prøver, kontroller, blindprøve og markør ( $\Phi$ X174-HaeIII Digest), hvorefter det kan afgøres, om der er blevet dannet en stor (nok) mængde af bånd af størrelsen 429bp.

## 3 Resultater

Gélen kan ses i figur 2 på næste side.

Der er ikke fremkommet nogle bånd med en længde på ca. 429bp.



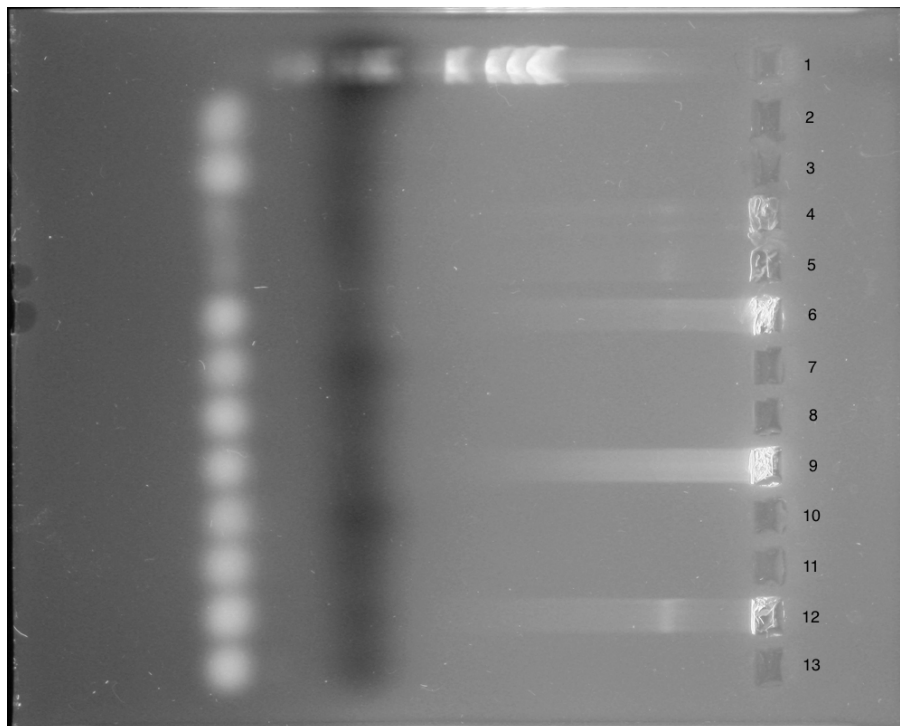
Exponential growth of short product

Figur 1: Princippet i PCR

## 4 Kommentarer

I de positive kontroller kan man se, at der er kromosomalt DNA, som ikke kommer ud fra brønde.

Der er ikke fremkommet nogle bånd af den ønskede længde, og det må derfor antages, at der er sket en fejl under mixningen af reagenser.



**Figur 2:** Gelelektroforese. Bane 1 er markøren. Bane 7 og 8 er prøver. Bane 6 og 9 er positive kontroller. Bane 4/5 og 12 er negativ kontroller. Bane 13 er blindprøve.