



Ontwikkeling van Q-PCR methoden voor de kwantitatieve detectie van toxineproducerende cyanobacteriën

Ontwerp en beperkte validatie Q-PCR methoden

KWR 09.089
December 2009

KWR

Watercycle Research Institute

Ontwikkeling van Q-PCR methoden voor de kwantitatieve detectie van toxineproducerende cyanobacteriën

Ontwerp en beperkte validatie Q-PCR methoden

KWR 09.089
December 2009

© 2009 KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Colofon

Titel

Ontwikkeling van Q-PCR methoden voor de kwantitatieve detectie van toxineproducerende cyanobacteriën

Projectnummer

A308253-002

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

RWS Waterdienst van het ministerie van Verkeer en Waterstaat

Kwaliteitsborger

Gerjan Medema

Auteurs

Bart Wullings, Daniëlle van der Linde en Edwin Kardinaal (DHV)

Dit rapport is niet openbaar en slechts verstrekt aan de opdrachtgevers en uitvoerders van het contractonderzoeksproject. Eventuele verspreiding daarbuiten vindt alleen plaats door de opdrachtgever zelf.

Verklarende woorden- en afkortingenlijst

Amplicon	DNA-fragment dat middels PCR wordt vermenigvuldigd
Bepalingsgrens	Laagste DNA-kopieaantal dat in een PCR-experiment kan worden gedetecteerd
bp	Basenparen van het DNA
Detectie	Aantonen van de aanwezigheid van een organisme
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
DNA-sequentie	Nucleotide-volgorde van een bepaald stuk(je) DNA
Forward primer	Één van de twee primers noodzakelijk voor DNA-vermenigvuldiging in de PCR
Gen	Een DNA-segment dat de code bevat van een eiwit;
Genoom	Totaal aan erfelijk materiaal van een organisme (DNA)
IC	Interne controle
IS	Intergenic spacer regio is het niet-coderende DNA tussen twee genen
Multiplex-PCR	PCR-reactie waarbij gebruik gemaakt wordt van meerdere primer/probe sets. Hierbij worden in één PCR-reactie verschillende specifieke DNA-fragmenten vermenigvuldigd
Nucleotide	Bouwsteen van het DNA
Oligonucleotide	Kort synthetisch enkelstrengs DNA-fragment (meestal 10-40 nucleotiden lang)
PCR	Polymerase ketting (chain) reactie, techniek voor de vermenigvuldiging van specifieke (kenmerkende) DNA-sequenties
PC operon	Fycocyanine operon op het genomische DNA van cyanobacteriën omvat de genen die de informatie bevatten voor het cyanopigment phylocyanine
Fycocyanine	Cyanopigment onderdeel is van het fotosysteem van cyanobacteriën
Plasmide	Cirkelvormige streng DNA die zich buiten het chromosomaal DNA bevindt
Primer	Korte oligonucleotide dat gebruikt wordt in de PCR voor het vermeerderen van een specifieke DNA-sequentie

Probe	Oligonucleotide gelabeld met een fluorescentie groep waarmee in real-time PCR het vermenigvuldigde DNA wordt gedetecteerd
Q-PCR	Kwantitatieve (quantitative) PCR met behulp van real-time PCR
rRNA	Ribosomaal RNA dat onderdeel is van de eiwitsynthese in de cel
Real-time PCR	PCR waarbij online de DNA-vermenigvuldiging kan worden gedetecteerd met behulp van de kleurstof SYBR-green of een specifieke probe
Reverse primer	Één van de twee primers noodzakelijk voor DNA-vermenigvuldiging in de PCR
Selectiviteit	De mogelijkheid van een methode om uitsluitend het doelorganisme te detecteren
Specificiteit	De mate van gevoeligheid van de methode voor storende componenten aanwezig in het watermonster
Sequentie	Nucleotide-volgorde van een DNA-molecuul
Tc	Threshold cycle of drempelwaarde, is het moment van detectie van het vermenigvuldigde specifieke DNA-fragment van een monster door de Q-PCR machine na een x-aantal PCR cycli (verdubbelingen)

Samenvatting

Toxische cyanobacteriën kunnen een gezondheidsrisico vormen voor recreanten in natuurlijk zwemwater, bij veedrenking of zwemmen/drinken door huisdieren en een probleem vormen voor de drinkwaterproductie. In het advies “microbiële risico’s van zwemmen in de natuur” van de gezondheidsraad vormen cyanobacteriën het grootste microbiële risico in natuurzwemwater. Voor het kwantificeren van dit microbiële risico is in 2008 een vernieuwd blauwalgenprotocol opgesteld waarin celdichtheden van toxineproducerende cyanobactereïn centraal staan in plaats van de concentratie cyanotoxinen.

De standaard methode voor het kwantificeren van cyanobacteriën in water is met behulp van een microscopische telling. Deze methode is echter tijdrovend en enigszins subjectief. In een recentelijk uitgevoerde haalbaarheidsstudie is geconcludeerd dat kwantitatieve PCR (Q-PCR) in potentie binnen een dag, kwantitatief en specifiek toxineproducerende geslachten van cyanobacteriën in water kan detecteren.

In dit rapport is de ontwikkeling en beperkte validatie beschreven van Q-PCR methoden voor toxische cyanobacteriën behorend tot de geslachten: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* en *Aphanizomenon*. In de Q-PCR worden kenmerkende DNA-fragmenten onder gecontroleerde omstandigheden vermenigvuldigd. Het kenmerkende DNA-fragment zoals dat in dit onderzoek toegepast is maakt deel uit van het fycocyanine gen. Dit fycocyanine gen komt alleen voor bij cyanobacteriën. Het gen zorgt voor de vorming het fycocyanine pigment, dit pigment geeft cyanobacteriën de kenmerkende blauw-groene kleur. Op basis van de verschillen en overeenkomsten in de DNA-volgorde van het fycocyanine gen zijn met succes specifieke primers en probes ontworpen. Voor de geslachten *Microcystis* en *Planktothrix* zijn diverse specifieke primers en probes ontworpen en getest op specificiteit en efficiëntie. Voor de geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* was dit enigszins complexer omdat deze geslachten genetisch vermengd zijn. De indeling op basis van morfologische kenmerken komt niet geheel overeen met de indeling op basis van genetische informatie. Hierdoor is gekozen voor groepsspecifieke detectie van 4 verschillende groepen waarin beide geslachten vertegenwoordigd zijn.

Met behulp van referentiestammen zijn de verschillende Q-PCR methoden geanalyseerd op efficiëntie van de DNA-vermenigvuldiging, selectiviteit en de detectiegrens. De resultaten van deze optimalisatie zijn zeer goed en laten zien dat alle 4 de nieuwe Q-PCR methoden efficiënt, selectief en gevoelig zijn. De aanwezigheid van andere cyanobacteriën (10^4 DNA kopieën/PCR) heeft geen invloed op de specifieke detectie zowel op hoog als op laag DNA niveau (10^4 en 10^1 DNA kopieën/PCR). Ook de gecombineerde detectie van een interne controle resulteerde niet in een afname van de PCR-efficiëntie. De ontwikkelde en geëvalueerde Q-PCR methoden zijn dan ook gereed voor verdere validatie en toepassing in de praktijk. Analyse van praktijkwatermonsters met de 4 nieuw ontwikkelde Q-PCR methoden in combinatie met bestaande detectiemethoden voor cyanobacteriën zal uitwijzen of de nieuwe detectiemethoden zowel selectief als specifiek zijn.

Inhoud

Verklarende woorden- en afkortingenlijst	1
Samenvatting	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
1.1 Detectie en telling van cyanobacterien in water	7
1.2 Q-PCR	8
1.3 Doel van het onderzoek	9
2 Opzet onderzoek	11
2.1 Genkeuze voor ontwerp primers en probe	11
2.2 Stammencollectie	11
2.3 Q-PCR-efficiëntie	12
2.4 Selectiviteit	12
2.5 Onderste bepalingsgrens	13
3 Ontwerp en validatie Q-PCR methoden	15
3.1 Ontwerp van specifieke primers en probe	15
3.2 <i>Microcystis</i>	16
3.2.1 Primers en probes	16
3.2.2 Optimale annealingtemperatuur PCR	17
3.2.3 Selectiviteit	18
3.2.4 Bepalingsgrens	18
3.3 <i>Planktothrix</i>	21
3.3.1 Primers en probes	21
3.3.2 Optimale annealingtemperatuur PCR	22
3.3.3 Selectiviteit	22
3.3.4 Bepalingsgrens	23
3.4 <i>Anabaena</i> en <i>Aphanizomenon</i>	24
3.4.1 Primers en probes	24
3.4.2 Optimale annealingtemperatuur PCR	25
3.4.3 Selectiviteit	25
3.4.4 Bepalingsgrens	26
4 Conclusies	29
5 Algemene discussie	31
6 Aanbevelingen	33

7	Literatuur	34
I	Overzicht van de DNA-sequenties van cyanobacteriën gerangschikt op basis van verwantschap (dendrogram)	35
II	Ontworpen primers en probes	41

1 Inleiding

1.1 Detectie en telling van cyanobacteriën in water

Ziekteverwekkende micro-organismen in natuur-zwemwater kunnen een risico vormen voor de volksgezondheid. De microbiële risico's van zwemmen in de natuur worden gevormd door van nature in water voorkomende pathogene micro-organismen en door pathogene micro-organismen die afkomstig zijn van fecale verontreiniging van dierlijke of menselijke herkomst. Cyanobacteriën behoren tot de eerste groep van natuurlijke pathogenen die algemeen voorkomen in Nederland. Verschillende soorten cyanobacteriën produceren zeer giftige toxinen die, vooral tijdens cyanobacteriebloei, groot gezondheidsrisico kunnen vormen voor waterrecreanten en dieren (vee, vogels, huisdieren). Ook voor de drinkwaterbereiding uit oppervlaktewater vormen deze toxines een mogelijk probleem. In Nederland zijn vooral de geslachten *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Planktothrix* van belang. In 2001 is door de gezondheidsraad een advies uitgebracht waarin microbiële risico's van zwemmen in de natuur zijn geanalyseerd en een advies wordt gegeven voor beheersmaatregelen en een aanscherping van de tot dan toe aangehouden normen van fecale verontreiniging (5). In dit advies worden cyanobacteriën als grootste microbiële risico gekwalificeerd en wordt geadviseerd om voor elk natuurlijk zwemwater een risicoprofiel op te stellen en zowel de cyanobacterie- als de toxineconcentratie te monitoren. Tevens wordt het door de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) voorgestelde advieswaarde voor het zeer giftige toxine microcystine van 20 milligram microcystine per liter overgenomen (3).

Tot voor kort werden de gezondheidsrisico's van zwemwater waarin cyanobacteriën aangetroffen met name beoordeeld aan de hand van de microcystine concentratie. Microcystine is één van de toxische stoffen die door cyanobacteriën geproduceerd kunnen worden. Omdat cyanobacteriën naast microcystine nog veel meer toxines kunnen produceren werd de screening van alleen dit toxine te beperkt geacht om de risico's van een cyanobacteriebloei in te kunnen schatten. Recentelijk is men in Nederland daarom overgegaan tot tellingen van celdichtheden van cyanobacteriën. De tellingen richten zich op de vier cyanobacterie geslachten waarvan bekend is dat ze het meest voorkomen in de Nederlandse wateren en dat ze verantwoordelijk zijn voor de voornaamste toxineproductie (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Planktothrix*). Voor de beoordeling van de zwemwaterkwaliteit nemen de zwemwaterbeheerders monsters waarin de concentratie van cyanobacteriën bepaald wordt met behulp van een microscopische telling.

In de praktijk blijkt dat de microscopische telling van cyanobacteriën beperkingen heeft. De die, deling en telling door de microscopist is enigszins subjectief en lastig vanwege kolonie/filamentvorming. De methode is tijdrovend en er kan geen onderscheid gemaakt worden tussen toxische - en niet-toxische cyanobacteriën. Tevens is de telling relatief ongevoelig en werkt pas goed als er al een cyanobacteriebloei is. Datzelfde geldt overigens voor een toxine-bepaling. Vroegtijdig signaleren van een cyanobacteriebloei blijkt lastig met deze methoden. Als de populatiedichtheid van in het bijzonder de (toxische) cyanobacteriën gevoeliger kan worden gemeten, zou het mogelijk moeten zijn om vroegtijdig een toename van cyanobacteriën en eventuele toxines te signaleren. Zo kunnen risicomomenten voor de zwemmers worden voorspeld.

Moleculaire methoden zijn specifiek, snel en gevoelig. Met behulp van moleculaire technieken zou het goed mogelijk zijn om cyanobacteriën in een vroeg stadium te detecteren, tellen en

beoordelen op mogelijke toxinevorming. Ook kan kwantificeren van de aanwezige cyanobacterien op een objectieve manier uitgevoerd worden. De techniek die hiervoor in aanmerking komt is de Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) methodiek (zie 1.1). Met behulp van deze techniek kan een karakteristiek deel van het DNA van de cyanobacterie vermenigvuldigd en gedetecteerd worden. De sterkte van het signaal kan gerelateerd worden aan de hoeveelheid cellen zoals die in het water voorkomen.

In een recentelijk uitgevoerd onderzoek is de huidige stand van de wetenschap op het gebied van Q-PCR methoden voor cyanobacterien geëvalueerd. Detectiemethoden op basis van Q-PCR beoordeeld op geschiktheid en bruikbaarheid voor detectie en kwantificatie van toxineproducerende cyanobacterie-geslachten in zwemwater (14). Dit onderzoek volgde op een in 2006 in opdracht van RIZA, RWS, Provincie Zuid-Holland en waterschappen uitgevoerd onderzoek naar andere DNA-technieken (8). De belangrijkste conclusie in deze rapporten is dat de Q-PCR methode in potentie zeer geschikt is voor screenen van oppervlaktewater op de aanwezigheid van toxineproducerende cyanobacteriën en dus een mogelijk alternatief voor de microscopische methode. Er zijn criteria opgesteld voor de geschikte Q-PCR methode voor toepassing in de Nederlandse praktijk. Geen van de beschreven Q-PCR methoden voldoen volledig aan de gestelde criteria, maar er is voldoende basis om methoden te ontwikkelen die daar wel aan voldoen. Om de 4 voor Nederlands zwemwater belangrijkste toxine producerende geslachten van cyanobacteriën te detecteerden is methodiekontwikkeling nodig om een goede Q-PCR methoden te ontwikkelen en te valideren. Voor het ontwerpen van geslachten specifieke methoden lijkt het fycocyanine gen zeer geschikt. Dit rapport beschrijft het ontwerp en beperkte validatie van Q-PCR methoden voor de 4 voor Nederland relevante geslachten *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* en *Aphanizomenon*.

1.2 Q-PCR

Specificiteit

PCR is een enzymatische reactie waarmee onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli) een DNA-fragment tot hoge aantallen kan worden vermenigvuldigd zodat het kan worden gedetecteerd. Omdat een DNA-fragment wordt vermenigvuldigd dat zeer specifiek is voor de target is PCR geschikt om een detectiemethode met "specificiteit-op-maat" te ontwerpen. De specificiteit van de PCR-reactie is gebaseerd op de verschillen in de DNA-volgorde in het gekozen fragment. Er is hier gezocht naar DNA-fragmenten die alleen voorkomen bij cyanobacteriën en waarbij de verschillende geslachten van cyanobacteriën verschillen. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen (primers) met een DNA-volgorde die specifiek is voor een bepaald cyanobacterie-geslacht vermenigvuldigd de PCR het DNA van dit geslacht selectief.

Kwantitatief

Bij Q-PCR wordt tijdens de reactie de vorming van de nieuwe fragmenten on-line gevolgd, door ze te labelen met een synthetische DNA-probe met een fluorescente kleurstof. Het aantal cycli waarbij het DNA-signaal boven de detectiegrens uitkomt (threshold-cyclus of Ct-waarde) is een maat voor de oorspronkelijke DNA-concentratie in het monster. De Ct-waarden van de referentiemonsters worden gebruikt voor berekening van een ijklijn, die wordt gebruikt om de concentratie cyanobacteriën in watermonsters af te leiden.

Interne kwaliteitsborging

Het rendement en de efficiëntie van de PCR-reactie kan worden gecontroleerd door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen. Het hiervoor gebruikte DNA-fragment wordt tegelijk met het cyanobacteriën DNA-fragment kwantitatief gedetecteerd in een zogenoemde

multiplex-reactie. Om onderscheid te maken tussen de twee DNA-fragment is de probe voor de detectie van de interne controle gelabeld met een andere fluorescente kleurgroep.

1.3 Doel van het onderzoek

- Ontwikkeling van specifieke Q-PCR methoden voor detectie en telling van cyanobacteriën van de geslachten *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* en *Aphanizomenon*;
- Optimalisatie van de Q-PCR methoden;
- Integratie van een interne controle in de detectieprocedure;
- Bepalen van de selectiviteit en de bepalingsgrens van de ontwikkelde methoden.

2 Opzet onderzoek

2.1 Genkeuze voor ontwerp primers en probe

De geslachtspecifieke detectie van de toxische cyanobacteriën is gericht op het fycocyanine gen. Uit de haalbaarheidsstudie, die voorafgaand aan dit onderzoek is uitgevoerd, is geconcludeerd dat het fycocyanine gen in potentie geschikt is voor ontwerp van specifieke primers en probes (14). Het fycocyanine gen is specifiek voor cyanobacteriën en codeert voor een pigment dat onderdeel is van het fotosysteem van cyanobacteriën. Dat maakt specifieke detectie van cyanobacteriën mogelijk. De DNA-informatie van dit gen is in verschillende wetenschappelijke publicaties toegepast voor moleculaire karakterisering van cyanobacteriën in het milieu en voor fundamenteel fylogenetisch onderzoek (9, 11, 12). De aanwezigheid van fycocyanine pigment is gebruikt als ‘early warning’ indicator voor microcystines in drinkwater (13). Omdat er al veel publicaties over het fycocyanine gen bestaan, zijn er veel DNA-sequenties van dit gen beschikbaar in DNA-databanken. In totaal zijn er bijna 1.000 DNA-sequenties gepubliceerd waaronder 86 sequenties die met meest verwant zijn aan het geslacht *Anabaena*, 41 sequenties aan het geslacht *Aphanizomenon*, 165 sequenties aan het geslacht *Microcystis* en 41 sequenties aan het geslacht *Planktothrix*. De overige sequenties hebben de grootste overeenkomst met o.a. de geslachten *Arthrospira*, *Cylindrospermopsis*, *Pseudoanabaena* en *Synechococcus*. Voor de specifieke detectie van de verschillende geslachten van toxische cyanobacteriën zijn op basis van de verschillen in de DNA-volgorde van het fycocyanine gen tussen de geslachten en de overeenkomsten in de DNA-volgorde binnen de geslachten verschillende Q-PCR primers en probes ontworpen voor de specifieke detectie en telling van de doel-cyanobacterie-geslachten (hoofdstuk 3).

2.2 Stammencollectie

De ontworpen primers en probes zijn met behulp van een collectie van referentiestammen van cyanobacteriën geëvalueerd (tabel 1). De referentiestammen zijn afkomstig uit de cultuurcollecties van het marine instituut van Schotland in Oban en de Universiteit van Amsterdam met dank aan Corrien Sigon en Petra Visser.

Tabel 1: Referentiestammencollectie cyanobacteriën

Nr	Cultuurcollectie ¹	Soort	Herkomst
S1	CCAP 1403/4b	<i>Anabaena variabilis</i>	oppervlaktewater, Utrecht NL
S2	CCAP 1403/18	<i>Anabaena circinalis</i>	oppervlaktewater, Irl, 1972
S3	CCAP 1403/19	<i>Anabaena solitaria</i>	oppervlaktewater, Eng, 1968
S4	CCAP 1446/1a	<i>Anabaena inaequalis</i>	oppervlaktewater, Utrecht NL
S5	CCAP 1446/1c	<i>Anabaena flos-aquae</i>	onbekend
S6	CCAP 1401/3	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	oppervlaktewater, UK, 1970
S7	CCAP 1401/5	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	oppervlaktewater, UK, 1982
S8	CCAP 1459/11a	<i>Planktothrix agardhii</i>	oppervlaktewater, Eng, 1975
S9	CCAP 1460/20	<i>Planktothrix agardhii</i>	oppervlaktewater, Eng, 1999
S10	CCAP 1450/1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	oppervlaktewater, USA, 1948
S11	CCAP 1450/10	<i>Microcystis aeruginosa</i>	oppervlaktewater, UK, 1977
S12	UvA 1450/11	<i>Microcystis aeruginosa</i>	oppervlaktewater, JP, 1983
S13	UvA 126/3	<i>Planktothrix agardhii cya</i>	onbekend, Fin
S14	UvA ATCC 29413	<i>Anabaena variabilis</i>	onbekend
S15	UvA 1401/7	<i>Aphinozomenon flos-aqua</i>	oppervlaktewater, Irl, 1979
S16	CCAP 1401/3	<i>Aphinozomenon flos-aqua</i>	oppervlaktewater, UK, 1970
S17	CCAP 1401/5	<i>Aphinozomenon flos-aqua</i>	oppervlaktewater, UK, 1982

1, CCAP = culture collection of algae and protozoa, SAMS Research Services Ltd, Scottish Marine institute, Oban UK; UvA = Universiteit van Amsterdam

2.3 Q-PCR-efficiëntie

De stammen uit de cultuurcollecties zijn gekweekt in vloeibaar BG11 of JM medium. De informatie over de samenstelling van de media en welk medium moet worden toegepast voor een bepaalde stam staat beschreven op de CCAP website (<http://www.ccap.ac.uk>). Van elke referentiestam is het DNA geïsoleerd en gekwantificeerd. Op basis van de grootte (lengte en gewicht) van het genomische-DNA van cyanobacteriën is het aantal DNA-kopieën per volume-eenheid berekend (6). Op het genoom van cyanobacteriën komt het fycocyanine gen één keer voor waardoor één DNA-kopie gelijk gesteld kan worden met één cel. Het DNA van de referentiestammen is vervolgens verdund tot 10.000 (genoom)DNA-kopieën/ μ l. Deze DNA-suspensies of verdere verdunning zijn vervolgens in het gehele onderzoek toegepast.

Elk ontworpen primerpaar is onderworpen aan een validatie onder laboratoriumcondities. In een eerste experiment is bepaald of de primers het DNA van de referentiestammen efficiënt vermenigvuldigen. Indien meer primerparen zijn ontworpen zijn deze onderling vergeleken.

2.4 Selectiviteit

Een tweede belangrijke aspect is het bepalen van de optimale annealingtemperatuur in de PCR. Deze annealingtemperatuur bepaalt de efficiëntie van de DNA-vermenigvuldiging en de selectiviteit van het primerpaar. Hoe hoger de temperatuur, hoe selectiever de PCR verloopt. Een te hoge temperatuur vermindert echter de efficiëntie van de DNA-vermenigvuldiging. Een robuust primerpaar is relatief weinig gevoelig voor temperatuurswisselingen en daardoor beter inzetbaar voor routinematige toepassing. De selectiviteit is vervolgens bepaald in de PCR. Van elke referentiestam zijn 10.000 DNA/kopieën toegevoegd aan een PCR met een optimale annealingtemperatuur. Een goede test detecteert alle stammen van het geslacht waar de test op is gericht, maar juist niet cyanobacteriën uit andere geslachten. Als een primerpaar aan deze criteria voldoet dan kan een probe worden toegevoegd voor detectie van het vermenigvuldigde DNA-fragment. Voor elke primer-probe combinatie is vervolgens opnieuw de efficiëntie, optimale annealingtemperatuur en selectiviteit bepaald.

2.5 Onderste bepalingsgrens

Als laatste aspect van de validatie van de Q-PCR methoden onder laboratorium condities is de bepalingsgrens van de Q-PCR. Met verschillende verdunningen van het DNA van elke specifieke stam is bepaald wat de minimale DNA-concentratie is die kan worden gedetecteerd. De bepalingsgrens is zowel bepaald op het DNA van de cyanobacterien waar de PC op is gericht als in een achtergrond van een hoge concentratie DNA van andere cyanobacterie stammen. Deze beperkte validatie zal in een vervolgonderzoek moeten worden uitgebreid met praktijkmonsters.

Alle Q-PCR experimenten zijn uitgevoerd met hetzelfde PCR-protocol dat bestaat uit een initiële denaturatie van 4 min. bij 94 °C en vervolgens een twee-staps PCR bestaande uit 42 cycli van 30 sec bij 94 °C en een DNA-vermenigvuldiging van 45 sec. bij de ingestelde annealingtemperatuur.

3 Ontwerp en validatie Q-PCR methoden

3.1 Ontwerp van specifieke primers en probe

Op basis van alle in de wereld beschikbare DNA-sequenties van het fycocyanine gen zijn voor detectie van de 4 geslachten specifieke primers en probes ontworpen (bijlagen I en II). Bij aanvang van het onderzoek zijn verschillende primers en probes ontworpen. Op basis van de resultaten van het validatieonderzoek is daar telkens één primerpaar en probe uit geselecteerd. Een primerpaar bestaat uit een zogenaamde “forward primer” en een “reverse primer”. De DNA-sequentie tussen deze twee primers (het DNA-fragment) wordt in een PCR vermenigvuldigd.

De geslachten *Microcystis* en *Planktothrix* clusteren in één cluster waardoor specifieke primers en probes voor deze geslachten konden worden ontworpen. De geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* zijn genetisch zeer verwant waardoor het vrijwel onmogelijk bleek om op basis van de fycocyanine-sequentie volledig geslachtspecifieke primers en probe te ontwerpen. Dit is duidelijk zichtbaar in de dendrogram (stamboom) die is berekend op basis van de beschikbare fycocyanine-sequenties (bijlage I). De verschillende *Anabaena* en *Aphanizomenon* sequenties zijn aanwezig in verschillende kleine en grotere clusters. Ook in de literatuur is beschreven dat de geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* genetisch zijn “vermengd” en ingedeeld kunnen worden in 9 subclusters (11). In bijlage I zijn de clusters met *Anabaena* en/of *Aphanizomenon* sequenties gelabeld van A tot D. In clusters C zijn het overgrote deel van de *Anabaena* sequenties aanwezig en in clusters D de meeste *Aphanizomenon* sequenties. Daarnaast zijn er ook enkele afwijkende *Anabaena* en *Aphanizomenon* sequenties aanwezig buiten de 4 grotere clusters. Op basis van de beschikbare sequenties is aannemelijk dat vrijwel alle voorkomende *Anabaena* en *Aphanizomenon* sequentietypen met de 4 primerparen kunnen worden gedetecteerd.

Eerste experimenten met de referentiestammencollectie en de primers ontworpen voor de specifieke detectie van *Anabaena* en *Aphanizomenon* resulteerde in onverwachte resultaten. Verschillende referentiestammen (S1, 4, 5 en 14) werden niet gedetecteerd met één van de vier primerparen. Om deze afwijkende resultaten te kunnen verklaren is de DNA-volgorde van het fycocyanine gen van alle referentiestammen bepaald. Met behulp van een in de literatuur beschreven werkwijze is een deel van het fycocyanine operon vermenigvuldigd (ITS cpcBA) en is de DNA-volgorde bepaald (4). De DNA-sequenties zijn vervolgens vergeleken met de DNA-database in een zogenaamde “Blast-analyse”. De resultaten van de identificatie zijn weergegeven in tabel 2. De identificatie op basis van het ITS cpcBA DNA-fragment is bij verschillende stammen beduidend afwijkend ten opzichte van de soortnaam die is opgegeven door de cultuurcollectie. De stammen S1, S2 en S4 zijn onderling zeer verwant en komen het meest overeen met een “afwijkende” *Anabaena* sp. Berrow sequentie in de database. De verwantschap met andere *Anabaena* of *Aphanizomenon* is gering (<90%). De vermenigvuldiging van de ITS cpcBA DNA-fragment van stam S8 met de beschikbare primers resulteerde in twee DNA-fragmenten van verschillende lengte. Het was hierdoor niet mogelijk de DNA-volgorde van het ITS cpcBA fragment te bepalen. De stammen S2, S3 en S10-17 zijn op soortniveau anders geïdentificeerd maar zijn genetisch zeer verwant met de opgegeven soortnaam. In de cultuur S7 is waarschijnlijk een besmetting opgetreden met *Synechococcus elongatus*. Deze stam valt af als referentiestam en kan eventueel hooguit nog worden toegepast in selectiviteitsproeven.

De opnieuw geïdentificeerde referentiestammen zijn toegepast voor optimalisatie en validatie van de verschillende Q-PCR methoden

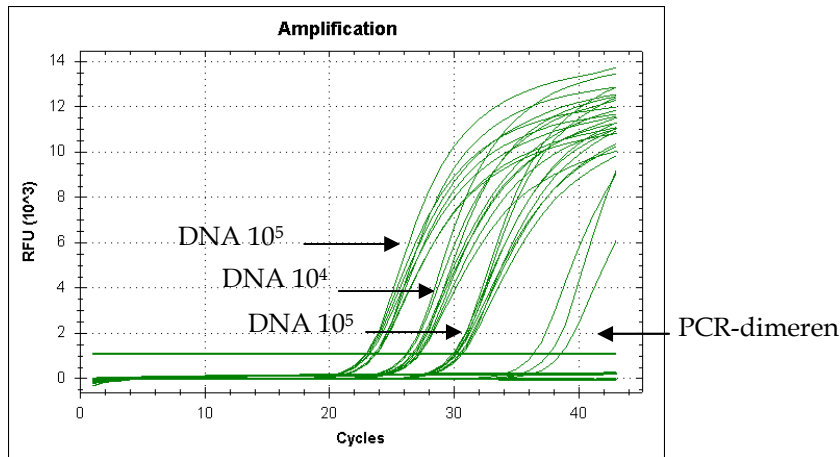
Tabel 2: Identificatie van referentiestammencollectie op basis van DNA-sequentie ITS cpcBA

Nr	CAPP	Soort (volgens collectie)	Identificatie (Sequentie ITS cpcBA)	(%)
S1	1403/4b	<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Anabaena sp.</i>	90
S2	1403/18	<i>Anabaena circinalis</i>	<i>Anabaena planktonica</i>	99
S3	1403/19	<i>Anabaena solitaria</i>	<i>Anabaena planktonica</i>	100
S4	1446/1a	<i>Anabaena inaequalis</i>	<i>Anabaena sp.</i>	97
S5	1446/1c	<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Anabaena sp.</i>	97
S6	1401/3	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Aphanizomenon sp.</i>	99
S7	1401/5	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Synechococcus elongatus</i>	99
S8	1459/11a	<i>Planktothrix agardhii</i>	geen sequentie afwijkende soort	
S9	1460/20	<i>Planktothrix rubescens</i>	<i>Planktothrix rubescens</i>	97
S10	1450/1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Microcystis sp.</i>	99
S11	1450/10	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	99
S12	1450/11	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Microcystis wesenbergii</i>	98
S13	126/3	<i>Planktothrix agardhii cya</i>	<i>Planktothrix rubescens</i>	99
S14	ATCC 29413	<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	99
S15	1401/7	<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	<i>Aphanizomenon gracile</i>	99
S16	1401/3	<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	<i>Aphanizomenon gracile</i>	99
S17	1401/5	<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	99

3.2 *Microcystis*

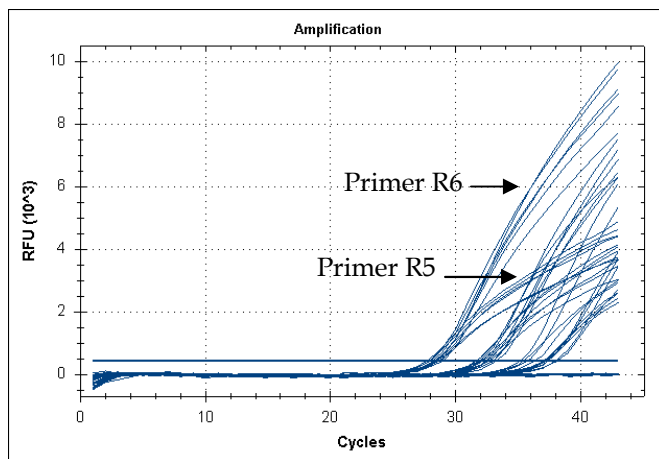
3.2.1 *Primers en probes*

Voor detectie van cyanobacteriën van het geslacht *Microcystis* zijn op basis van de 165 DNA-sequenties van het fycocyanine gen 4 forward primers, 6 reverse primers en 5 probes ontworpen (bijlage II). In de eerste fase zijn 2 forward primers (F1 en F2) en 2 reverse primers (R1 en R2) ontworpen en besteld. De verschillende primers zijn getest met de referentiestammen S10 en S11 en een DNA-concentratie van 10^5 , 10^4 en 10^3 DNA kopieën/PCR. In figuur 1 is te zien dat alle mogelijke primerparen zeer goede DNA-vermenigvuldigingscurves laten zien voor elk van de DNA-verdunningen en dat er vrijwel geen verschillen zijn tussen de primer-combinaties. In een PCR-experiment wordt in elke PCR-cyclus het specifieke DNA-fragment met een factor twee vermenigvuldigd zodat elke 3,3 PCR-cycli, bij een 100% efficiënte DNA-vermenigvuldiging, overeenkomt met een 10-voudig concentratieverschil. Helaas worden in drie blanco's ook een DNA-fragment vermenigvuldigd bij cycli 38-40. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat de twee primers bij afwezigheid van het specifieke DNA, een kort aspecifiek DNA-fragment vermenigvuldigen (dimeer).



Figuur 1: DNA-vermenigvuldiging van referentiestammen van *Microcystis* met behulp van verschillende primers gericht tegen het fycocyanine gen

Ook na optimalisatie van de PCR bleek het niet mogelijk de vorming van dimeren te voorkomen waardoor uiteindelijk nieuwe primers zijn ontworpen om dit probleem op te lossen (F3 en F4 en R5 en R6). De PCR-resultaten van deze nieuwe primerparen is vergelijkbaar als is weergegeven in figuur 1, maar zonder vorming van dimeren. De combinatie F3-R6 bleek uiteindelijk de beste resultaten te geven. Voor het testen van de probe P1 zijn alle primercombinaties in een PCR-experiment vergeleken met de stammen S10, S11 en S12 en een DNA-concentratie van 10⁴, 10³ en 10² DNA kopieën/PCR (figuur 2)



Figuur 2: DNA-vermenigvuldiging van referentiestammen van *Microcystis* met behulp van verschillende primers en probe gericht tegen het fycocyanine gen

In figuur 2 is duidelijk een verschil te zien tussen de verschillende primers en probe combinaties. De PCR resultaten met de R6 primer in combinatie met de primers F3 en F4 verloopt efficiënter en er wordt (veel) meer PCR-product gevormd. De primers F3 en F4 in combinatie met R6 en P1 resulteren dan ook in de beste PCR-resultaten.

3.2.2 Optimale annealingtemperatuur PCR

Een belangrijk onderdeel van de optimalisatie van de PCR is het analyseren bij welke annealingtemperatuur de DNA-vermenigvuldiging optimaal is. Bij een hogere annealingtemperatuur zal de selectiviteit van de primers toenemen maar kunnen uiteindelijk de primers en/of probe niet meer optimaal binden aan het DNA. De annealingtemperatuur in

de PCR kan ingesteld worden als een gradiënt waarbij de temperatuurgradiënt gelijkelijk wordt verdeeld over de 8 rijen (8 verschillende temperaturen in een 96 wells PCR-plaat). In tabel 3 zijn de resultaten weergegeven van de gradiënt van de annealingtemperatuur van 54 tot 65 °C. De annealingtemperatuur van de PCR is optimaal als een lage of laagste Tc-waarde. Bij deze lage Tc-waarde is de DNA-vermenigvuldiging het meest efficiënt en wordt het vermenigvuldigde DNA-fragment het vroegst gedetecteerd.

Tabel 3: Tc-waarde van de detectie van *Microcystis* met behulp van twee primer-probe combinaties, verschillende DNA-concentraties, referentiestammen S10, S11 en S12 en een gradiënt van de annealingtemperatuur van 54 tot 65 °C.

		A	B	C	D	E	F	G	H
		65	64,4	63,2	61	58,3	56,2	54,7	54
Mc_F3/Mc_R6	S10e3	30,3	29,7	29,6	29,3	29,4	29,4	29,3	29,6
	S10e2	34,1	33,8	33,1	32,8	33,1	33,2	33,2	33,1
	S11e3	29,5	29,1	29,0	28,7	28,8	29,0	29,0	29,2
	S11e2	34,3	35,0	33,3	33,3	33,8	34,2	34,0	34,3
	S12e3	30,3	29,6	29,4	29,0	29,2	29,5	29,3	29,5
	S12e2	33,7	33,2	33,1	32,7	32,9	32,9	33,3	33,4
Mc_F4/Mc_R6	S10e3	32,1	31,1	29,4	29,3	28,6	28,7	28,7	28,9
	S10e2	37,1	35,0	33,8	32,8	33,1	32,4	32,3	32,6
	S11e3	31,7	30,1	20,0	28,5	28,1	28,3	28,0	28,4
	S11e2	36,8	35,1	33,8	33,4	32,9	33,0	32,8	33,2
	S12e3	32,5	30,9	29,4	29,0	28,9	28,6	28,6	29,0
	S12e2	36,1	34,9	33,2	32,8	32,6	32,4	32,3	32,7

In tabel 3 zijn per rij (primer/DNA-concentratie), de TC-waarden die minder dan 0,5 cyclus van elkaar verschillen grijs gekleurd, de laagste Ct-waarde (snelste detectie) is geel gekleurd. Op basis van deze resultaten is de optimale annealingtemperatuur voor de combinatie F3-R6 met de probe P1 ongeveer 61 °C en voor de combinatie F4-R6 met de probe P1 54,7 °C. Een annealingtemperatuur van ongeveer 60 °C heeft de voorkeur. Door te streven naar een overeenkomende annealingtemperatuur voor alle nieuw te ontwikkelen Q-PCR methoden is het uiteindelijk makkelijker om verschillende Q-PCR methoden in één experiment te combineren. Om deze reden is voor volgende experimenten gekozen voor de combinatie F3-R6 met de probe P1.

3.2.3 Selectiviteit

De selectiviteit van de primer-probe combinatie is bepaald door het DNA van alle beschikbare referentiestammen te analyseren in een PCR-experiment. De DNA-concentratie die van elke stam aan de PCR is toegevoegd komt overeen met ongeveer 10⁴ DNA-kopieën/PCR. Van alle 17 geanalyseerde referentiestammen worden alleen de drie *Microcystis* stammen gedetecteerd (resultaten niet weergegeven) en is de selectiviteit van de F3-R6_P1 combinatie dus goed.

3.2.4 Bepalingsgrens

Naast de selectiviteit is de bepalinggrens een belangrijk aspect van de Q-PCR methode. De Q-PCR methode moet in staat zijn om specifieke cyanobacteriën bij lage concentratie te detecteren, eventueel in aanwezigheid van een hoge concentratie andere cyanobacteriën. Voor het onderzoeken van de bepalinggrens zijn twee experimenten uitgevoerd. In één experiment is het DNA van de *Microcystis*-stammen S10, S11 en S12 in kleine stappen verdund en vervolgens toegevoegd aan de PCR tot uiteindelijk minder dan 1 DNA kopie/PCR (tabel 4).

Tabel 4: DNA-verdunningen van *Microcystis*-stammen geanalyseerd met de specifieke F3-R6-P1 primer-probe combinatie

S10 (DNA kopieën/PCR)	Ct	S11 (DNA kopieën/PCR)	Ct	S12 (DNA kopieën/PCR)	Ct
1,8*10 ²	31,6	2,8*10 ²	30,79	1,1*10 ²	31,2
1,8*10 ¹	36,8	2,8*10 ¹	34,87	1,1*10 ¹	34,,
9,1	37,5	13,3	36,29	5,6	35,6
4,6	N/A	6,7	N/A	2,8	38,3
2,3	N/A	3,3	N/A	1,4	37,3
1,1	37,3	1,7	N/A	0,7	N/A
0,6	N/A	0,8	N/A	0,4	N/A
PCR Blanco	N/A	PCR Blanco	N/A	PCR Blanco	N/A

De bepalingsgrens van de PCR is ongeveer 14 DNA kopieën. Dit is echter een globale schatting en moet statistisch verder worden onderbouwd. In een tweede experiment zijn DNA-monsters van referentiestammen gemengd en vervolgens in een Q-PCR geanalyseerd. In dit experiment is tevens een interne controle toegevoegd die tegelijk in een zogenaamd multiplex Q-PCR is gedetecteerd. Deze interne controle wordt in praktijkmonsters toegevoegd voorafgaande aan de DNA-isolatie en het resultaat van de interne controle geeft inzicht in de efficiëntie van de DNA-isolatie en het optreden van mogelijke remming van de PCR. Een voorbeeld van een mengschema voor *Microcystis* stam S10 is weergegeven in tabel 5. Elk mengmonster is in viervoud geanalyseerd in een Q-PCR experiment. In mengmonsters A is geen *Microcystis* DNA toegevoegd maar wel DNA van de andere stammen in een concentratie van ongeveer 10⁴ DNA kopieën/PCR. In monster B is het DNA van de *Microcystis* stam in lage concentratie overeenkomend met de bepalingsgrens toegevoegd, samen met een relatief hoge concentratie DNA van de andere stammen. In mengmonster C zijn zowel het DNA van de *Microcystis* stam als de andere stammen in hoge concentratie aan de PCR toegevoegd (10⁴ DNA kopieën/PCR).

Tabel 5: Mengschema's van DNA-monsters van verschillende cyanobacteriën

Mix A: Mc S10

Soort	Stam	Toevoegen	Concentratie in well
<i>Microcystis</i>	S10	0	
<i>Planktothrix</i>	S9	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
<i>Anabaena</i>	S2	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
<i>Aphanizomenon</i>	S6	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
IC		Stock → 10	1 µl stock

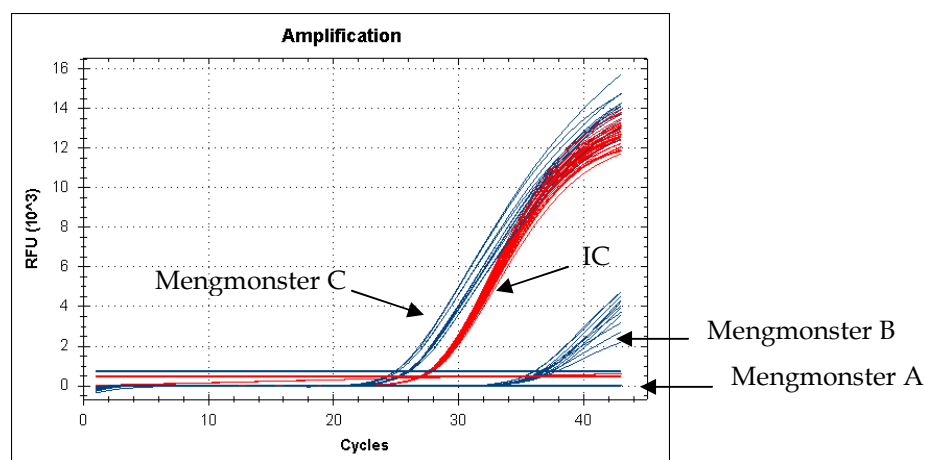
Mix B: Mc S10

Soort	Stam	Toevoegen	Concentratie in well
<i>Microcystis</i>	S10	1,8 * 10 ² → 10µl	1,8* 10 ¹
<i>Planktothrix</i>	S9	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
<i>Anabaena</i>	S2	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
<i>Aphanizomenon</i>	S6	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
IC		Stock → 10	1 µl stock

Mix C: Mc S10

Soort	Stam	Toevoegen	Concentratie in well
<i>Microcystis</i>	S10	1,8 * 10 ⁵ → 10µl	1,8* 10 ⁴
<i>Planktothrix</i>	S9	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
<i>Anabaena</i>	S2	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
<i>Aphanizomenon</i>	S6	10 ⁵ → 10µl	10 ⁴
IC		Stock → 10	1 µl stock

In figuur 3 is de DNA-vermenigvuldiging weergegeven van de verschillende mengmonsters A, B en C en de *Microcystis* stammen S10, S11 en S12. De PCR-monsters met *Microcystis* DNA van ongeveer 10^4 DNA kopieën/PCR worden gedetecteerd bij een Tc-waarde van 25 cycli, de monsters met een lage concentratie *Microcystis* DNA worden gedetecteerd bij ongeveer Tc 36.



Figuur 3: DNA-vermenigvuldiging van verschillende mengmonsters (A, B en C) waarin DNA van *Microcystis* stammen (S10, S11 en S12) is gemengd met DNA van andere referentiestammen. De blauwe curven zijn afkomstig van de *Microcystis* detectie, de rode curven van de detectie van de interne controle.

De resultaten van de mengmonsters zijn zeer reproduceerbaar. In tabel 6 zijn de resultaten van de *Microcystis* detectie en de interne controle weergegeven. De *Microcystis* DNA-monsters worden zowel bij lage concentratie als bij hogere concentratie gedetecteerd en niet waarneembaar beïnvloed door een relatief hoge concentratie DNA van andere referentiestammen. De spreiding tussen de 4 PCR reacties is in alle monsters lager dan 1 cyclus. Een spreiding van 1 cyclus komt overeen met een concentratieverschil van een factor 2.

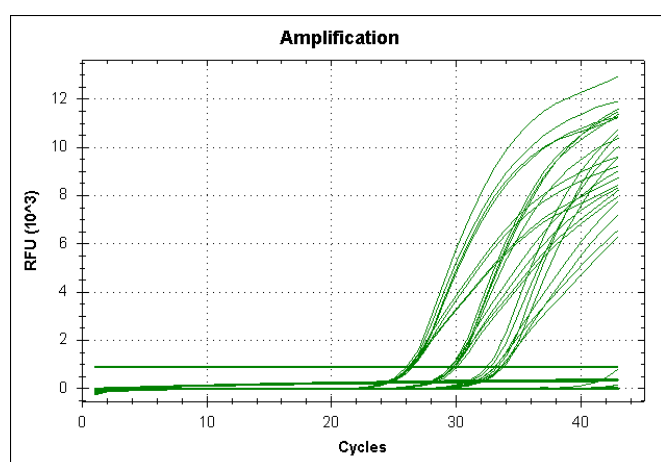
Tabel 6: Tc-waarden van de mengmonsters waarin *Microcystis* DNA is gemengd met DNA van andere referentiestammen

	<i>Interne controle</i> gem. Tc-waarde	<i>Microcystis detectie</i> gem. Tc-waarde	<i>spreiding TC-waarde</i> (sd)
Mix A	27,2	N/A	
Mix B-S10	27,0	37,3	0,3
Mix C-S10	26,9	26,1	0,1
Mix A	27,1		
Mix B-S11	27,0	36,8	0,2
Mix C-S11	26,9	25,1	0,1
Mix A	27,2		
Mix B-S12	27,0	36,8	0,9
Mix C-S12	26,9	26,0	0,1
IC	27,2	N/A	
PCR blanco	N/A	N/A	

3.3 Planktothrix

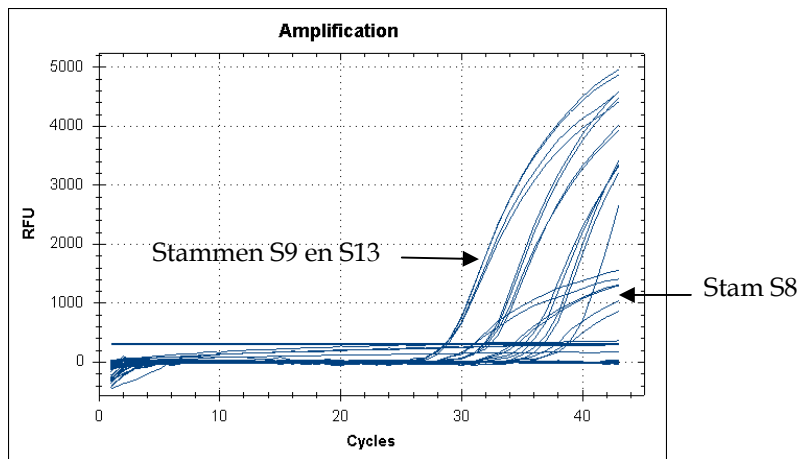
3.3.1 Primers en probes

Voor detectie van cyanobacteriën van het geslacht *Planktothrix* zijn op basis van de 41 bekende DNA-sequenties van het fycocyanine gen 4 forward primers, 3 reverse primers en 5 probes ontworpen (bijlage II). In eerste fase zijn 2 forward primers (F2 en F4) en 2 reverse primers (R2 en R3) besteld. Aanvankelijk waren alleen de referentiestammen S8 en S9 beschikbaar, in de loop van het onderzoek is tevens stam S13 beschikbaar gekomen. De verschillende primers zijn met deze twee referentiestammen getest in een DNA-concentratie van 10^4 , 10^3 en 10^2 DNA kopieën/PCR. In figuur 1 is te zien dat de vier mogelijke combinaties van primers mooie DNA-vermenigvuldigingscurves laten zien met elk van de DNA-verdunningen. De Tc-waardes van alle geteste DNA-monsters met de verschillende primercombinaties zijn vrijwel gelijk, maar er is wel een verschil in DNA-eindconcentratie tussen de primerparen. De combinatie primer F2 geeft een hogere DNA-eindconcentratie en heeft daardoor licht de voorkeur. Er worden vrijwel geen dimere gevormd.



Figuur 4: DNA-vermenigvuldiging van referentiestammen van *Planktothrix* met behulp van verschillende primers gericht tegen het fycocyanine gen.

Op basis van de goede resultaten met de verschillende primercombinaties zijn de probes P4 en P5 op gelijke wijze geanalyseerd met de referentiestammen en nu inclusief S13. Er is een relatief groot verschil tussen probe P4 en P5. P4 resulteert in slechte amplificatiecurves, daarentegen geeft P5 in combinatie met de primers F4 en R2 prima resultaten. De detectie van stam 8 is duidelijk verschillend ten opzichte van stam S9 en S13. In figuur 5 is duidelijk de afwijkende lage amplificatiecurves van stam S8 te zien. Omdat de sequentieanalyse van het IPC *cpcBA* is mislukt kan niet worden achterhaald waardoor dit wordt veroorzaakt en zal vervolgonderzoek moeten uitwijzen of er DNA-verschillen bestaan tussen de probesequentie en stam S8. In vervolgonderzoek is de primer-probe F4-R2-P5 combinatie verder geanalyseerd.



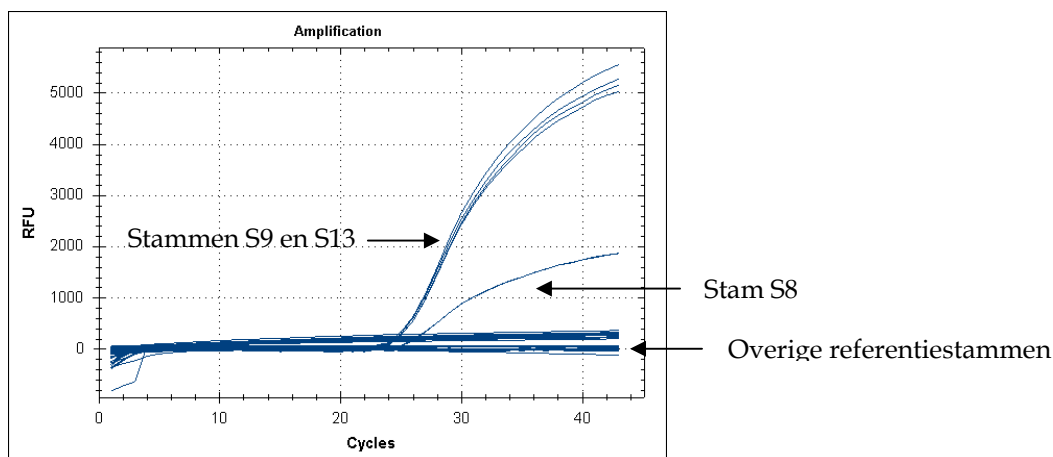
Figuur 5: DNA-vermenigvuldiging van referentiestammen van *Planktothrix* met behulp van de primers F4 en R2 en probe P5.

3.3.2 Optimale annealingtemperatuur PCR

Voor elk van de vier primercombinaties is de optimale annealingtemperatuur bepaald. Een experiment is uitgevoerd met een gradiënt van de annealingtemperatuur van 50-65 °C met de stammen S8 en S9. Stam S8 geeft opnieuw afwijkende resultaten en dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door mismatches in de probesequentie. De primer-probe combinatie met stam S9 is zeer robuust, over een groot temperatuurbereik zijn de resultaten goed en overeenkomend. Voor verdere experimenten is 60 °C aangehouden als annealingtemperatuur.

3.3.3 Selectiviteit

Alle 17 beschikbare referentiestammen zijn geanalyseerd door 10^4 DNA-kopieën van elke stam in een PCR-experiment toe te voegen. Van alle 17 geanalyseerde referentiestammen worden alleen de drie *Planktothrix* stammen gedetecteerd hoewel opnieuw stam S8 later wordt gedetecteerd (figuur 6).

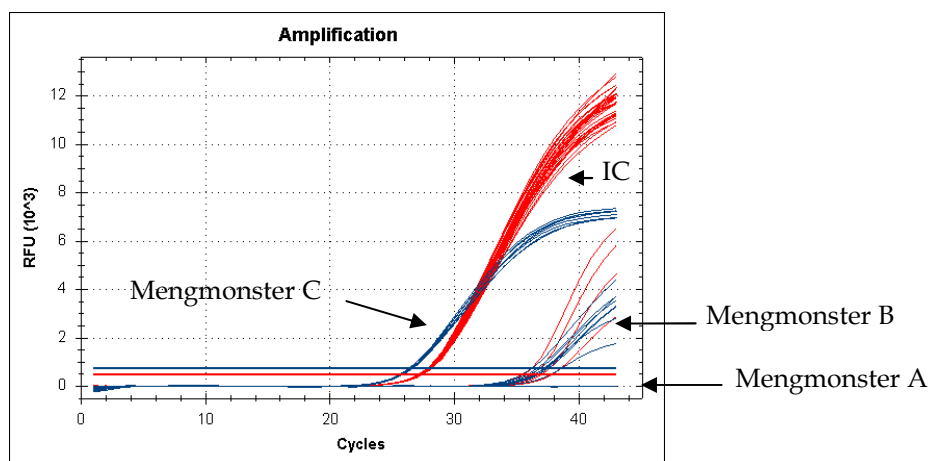


Figuur 6: DNA-vermenigvuldiging van alle 17 referentiestammen met behulp van de *Planktothrix* primers F4 en R2 en probe P5.

3.3.4 Bepalingsgrens

De bepalinggrens van de PCR is geanalyseerd met de stammen S9 en S13. De uitvoering is gelijk aan de experimenten beschreven voor *Microcystis* (3.2.4). In de PCR zijn 6 DNA-kopieën nog aantoonbaar. Vervolgonderzoek moet uitwijzen wat de exacte bepalinggrens van deze Q-PCR methode is.

In een tweede experiment zijn DNA-monsters van referentiestammen gemengd en vervolgens tegelijk met een interne controle in een Q-PCR geanalyseerd. Het mengschema is overeenkomend met het mengschema voor *Microcystis* zoals is weergegeven in tabel 5. In figuur 7 is de DNA-vermenigvuldiging weergegeven van de verschillende mengmonsters A, B en C en de *Planktothrix* stammen S9 en S13. De PCR-monsters met *Planktothrix*-DNA van ongeveer 10^4 DNA kopieën/PCR worden gedetecteerd bij een Tc-waarde van 26 cycli, de monsters met een lage concentratie *Planktothrix* DNA worden gedetecteerd na ongeveer Tc 36. Ook in de blancomonsters wordt de interne controle aangetoond. Waarschijnlijk zijn deze monsters in het laboratorium besmet met een zeer laag aantal kopieën van de interne controle.



Figuur 7: DNA-vermenigvuldiging van verschillende mengmonsters (A, B en C) waarin DNA van *Planktothrix* stammen (S9 en S13) is gemengd met DNA van andere referentiestammen. De blauwe curven zijn afkomstig van de *Planktothrix* detectie, de rode curven van de detectie van de interne controle.

De resultaten van alle mengmonsters zijn zeer reproduceerbaar en vergelijkbaar met de *Microcystis* resultaten. In tabel 7 zijn de resultaten van de *Planktothrix* detectie en de interne controle weergegeven. De spreiding tussen de PCR-resultaten is zeer gering en wordt ook niet waarneembaar beïnvloed door een relatief hoge concentratie DNA van andere referentiestammen.

Tabel 7: Tc-waarden van de mengmonsters waarin *Planktothrix* DNA is gemengd met DNA van andere referentiestammen

Mix	Interne controle gem. Tc-waarde	<i>Planktothrix</i> detectie gem. Tc-waarde	spreiding TC-waarde (sd)
Mix A	27,4	N/A	
Mix B-S9	27,3	37,2	0,5
Mix C-S9	27,2	26,7	0,1
Mix A	27,2	N/A	
Mix B-S13	27,2	37,3	0,8
Mix C-S13	27,9	26,4	0,1
IC	27,4	N/A	
PCR blanco	36,2	N/A	

3.4 *Anabaena* en *Aphanizomenon*

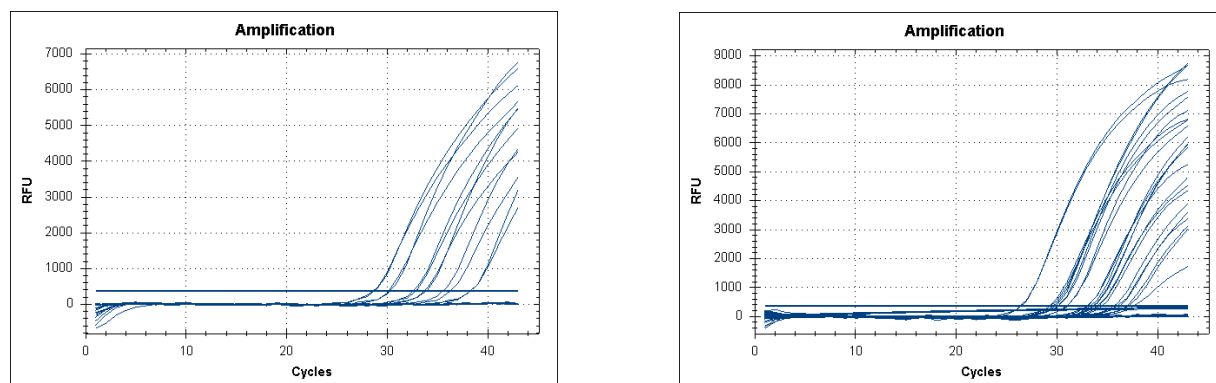
3.4.1 Primers en probes

Voor detectie van de geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* zijn 4 verschillende Q-PCR methoden ontwikkeld (zie 3.1). De *Anabaena* en *Aphanizomenon* sequenties zijn in 4 groepen geclusterd en voor elke groep zijn specifieke primers en probes ontwikkeld (bijlagen I en II). Zo kunnen alle bekende *Anabaena* en *Aphanizomenon* soorten in die clusters worden gedetecteerd, maar niet als soorten van elkaar worden onderscheiden. Alle beschikbare *Anabaena* en *Aphanizomenon* referentiestammen zijn geanalyseerd met primers specifiek voor de 4 groepen (tabel 8). Clustering van de referentiestammen op basis van de sequentieanalyse (3.1) laat zien dat geen enkele referentiestam geclusterd wordt in de groepen A en B (bijlage I). Voor deze groepen zijn dan ook geen referentiestammen beschikbaar en is het dan ook niet mogelijk gebleken de specifieke Q-PCR methoden te valideren. Voor vervolgonderzoek is het dan ook noodzakelijk te beschikken over referentiestammen die overeenkomen met deze groepen. Voor de groepen C en D zijn echter wel referentiestammen beschikbaar en zijn de Q-PCR methoden gevalideerd. In tabel 8 is samengevat welke referentiestammen worden gedetecteerd met de verschillende primers voor detectie van de verschillende groepen waarbij A1: F1-R1, A2:F2-R2, B1:F3-R3, B2: F4-R3, C1: F5-R4, C2: F6-R4, D1: F7-R5, D2: F7-R6 en D3: F7-R7 (zie ook bijlage II).

Tabel 8: Q-PCR detectie van de *Anabaena* en *Aphanizomenon* referentiestammen met de verschillende primers ontworpen tegen de groepen A-D

Referentiestam	Primerparen								
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	D3
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	+	+	-	-	+
S3	-	-	-	-	+	+	-	-	+
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	+	+	+
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	-	-	+	+	+
S16	-	-	-	-	-	-	+	+	+
S17	-	-	-	-	-	-	+	+	+

De primers en probe specifiek voor groep C (*Anabaena*) detecteren zoals verwacht de referentiestammen S2 en S3. De groep-D primers detecteren referentiestammen S6, S15, S16 en S17. Primercombinatie D3 (F7-R7) geeft ook een niet-gewenst DNA-signaal met de stammen S2 en S3 en valt daardoor af voor verdere experimenten. In figuur 8 zijn de Q-PCR resultaten weergegeven van detectie van de groepen C en D in combinatie met respectievelijk de probes P5 en P7.



Figuur 8: DNA-vermenigvuldiging van referentiestammen van groep C (links) en D (rechts) met behulp van verschillende primers en probes gericht tegen het fycocyanine gen.

De verschillende primers en probe voor groep C geven allemaal goede resultaten maar omdat het DNA-signaal met primers F5-R4 iets hoger is, zijn deze primers geselecteerd voor verdere validatie. Dit geldt ook voor de verschillende primers en probe voor groep D en hierbij is gekozen voor de primers F7-R5. In de blanco monsters worden geen dimere gevormd.

3.4.2 Optimale annealingtemperatuur PCR

De primer-probe combinatie voor de groepen C en D zijn zeer robuust en over een groot temperatuurbereik zijn de resultaten goed en overeenkomend. Voor verdere experimenten is 60 °C aangehouden als annealingtemperatuur.

3.4.3 Selectiviteit

De selectiviteit van de primers voor detectie van de groepen C en D is goed (zie ook tabel 8 en 9). Alle 17 beschikbare referentiestammen zijn geanalyseerd door 10⁴ DNA-kopieën van elke stam in een PCR-experiment toe te voegen. Stam S4 geeft een zeer laat/zwak signaal met de detectie van groep D. Het DNA-signaal komt echter zo laat op dat dit geen probleem oplevert.

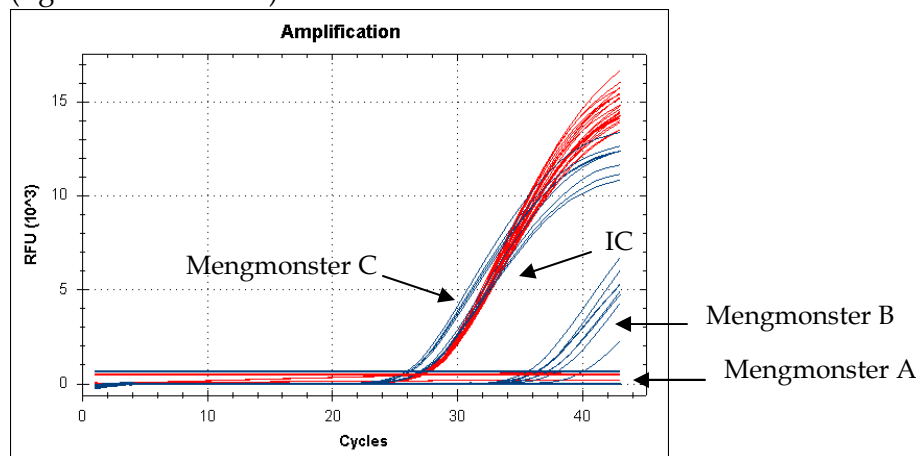
Tabel 9: Tc-waarden van de detectie van referentiestammen met de specifieke primers en probe voor de detectie van de groepen C en D

Stam	Groep C	Groep D	Stam	Groep C	Groep D
S1	N/A	N/A	S10	N/A	N/A
S2	26,5	N/A	S11	N/A	N/A
S3	27,3	N/A	S12	N/A	N/A
S4	N/A	39,8	S13	N/A	N/A
S5	N/A	N/A	S14	N/A	N/A
S6	N/A	26,6	S15	N/A	28,1
S7	N/A	N/A	S16	N/A	23,8
S8	N/A	N/A	S17	N/A	27,1
S9	N/A	N/A	PCR BL	N/A	N/A

3.4.4 Bepalingsgrens

De bepalinggrens van de Q-PCR detectie van de groepen C en D is goed. Een zeer lage DNA-concentratie van ongeveer 1-10 DNA-kopieën kan worden gedetecteerd maar vervolgonderzoek moet deze resultaten verder onderbouwen.

De bepalinggrens van de Q-PCR in combinatie met andere cyanobacteriën in mengmonsters is uitgevoerd zoals beschreven voor de *Microcystis* PCR. De groep C Q-PCR is geanalyseerd met het DNA van de stammen S2 en S3 in combinatie met het DNA van de stammen S10, S9 en S6 (figuur 9 en tabel 10).



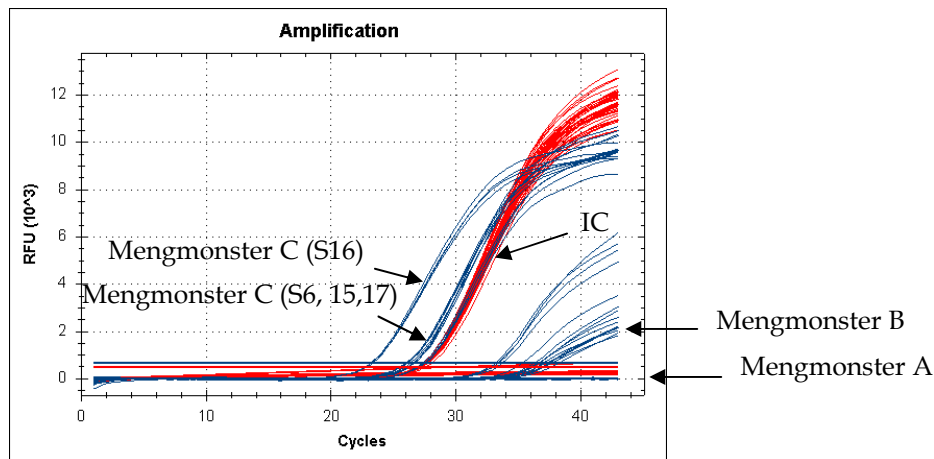
Figuur 9: DNA-vermenigvuldiging met behulp van groep C primers en probe van verschillende mengmonsters (A, B en C) waarin DNA van *Anabaena* stammen (S2 en S3) is gemengd met DNA van andere referentiestammen. De blauwe curven zijn afkomstig van de Groep C detectie, de rode curven van de detectie van de interne controle.

Tabel 10: Tc-waarden van de mengmonsters van *Anabaena* DNA gemengd met DNA van andere referentiestammen en gedetecteerd met de groep C Q-PCR

Mix	Interne controle gem. Tc-waarde	Groep C detectie gem. Tc-waarde	spreiding TC-waarde (sd)
Mix A	27,3	N/A	
Mix B-S2	27,2	36,4	0,4
Mix C-S2	27,2	26,2	0,1
Mix B-S3	27,1	38,0	1,3
Mix C-S3	27,2	27,2	0,1
IC	27,2	N/A	
PCR blanco	N/A	N/A	

De resultaten van alle mengmonsters zijn zeer reproduceerbaar en vergelijkbaar met de *Microcystis* en *Planktothrix* resultaten. De spreiding tussen de PCR-resultaten is zeer gering en wordt ook niet waarneembaar beïnvloed door een relatief hoge concentratie DNA van andere referentiestammen. Uitzondering is de relatief grotere spreiding in mengmonster B-S3. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de zeer lage DNA concentratie in dit monster waardoor kleine concentratieverschillen in de verschillende PCR's resulteren in een relatief grote spreiding.

De bepalinggrens van de Q-PCR van groep D is geanalyseerd met de DNA van de stammen S6, S15, S16 en S17 in combinatie met DNA van de stammen S10, S9 en S2 (figuur 10 en tabel 11).



Figuur 10: DNA-vermenigvuldiging met behulp van groep D primers en probe van verschillende mengmonsters (A, B en C) waarin DNA van *Aphanizomenon* stammen (S6, S15, S16 en S17) is gemengd met DNA van andere referentiestammen. De blauwe curven zijn afkomstig van de Groep D detectie, de rode curven van de detectie van de interne controle.

Tabel 11: Tc-waarden van de mengmonsters van *Aphanizomenon* DNA gemengd met DNA van andere referentiestammen en gedetecteerd met de groep D Q-PCR

Mix	<i>Interne controle</i> gem. Tc-waarde	<i>Groep D detectie</i> gem. Tc-waarde	<i>spreiding TC-waarde</i> (sd)
Mix A	27,6	N/A	
Mix B-S6	27,2	36,2	0,6
Mix C-S6	26,9	26,1	0,2
Mix B-S15	27,3	37,7	0,5
Mix C-S15	27,2	27,5	0,1
Mix B-S16	27,0	33,4	0,2
Mix C-S16	27,2	23,2	0,1
Mix B-S17	27,1	37,2	0,4
Mix C-S17	27,0	26,6	0,1
IC	27,2	N/A	
PCR blanco	N/A	N/A	

De resultaten van alle mengmonsters zijn zeer reproduceerbaar en vergelijkbaar met eerdere resultaten. De spreiding tussen de PCR-resultaten is zeer gering en wordt ook niet waarneembaar beïnvloed door een relatief hoge concentratie DNA van andere referentiestammen.

4 Conclusies

- De ontworpen Q-PCR primers en probes op basis van het fycocyanine gen zijn specifiek voor detectie van de toxische cyanobacteriën *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* en *Aphanizomenon*;
- De fycocyanine DNA-sequenties van de geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* zijn op basis van overeenkomst geclusterd in vier groepen (A, B, C en D). Tegen elk van deze groepen zijn specifieke primers en probes ontworpen;
- Voor de groep C waarbinnen de meeste *Anabaena* sequenties vallen en groep D met vrijwel alleen *Aphanizomenon* sequenties zijn specifieke Q-PCR methoden ontwikkeld;
- De nieuw ontwikkelde Q-PCR methoden voor de detectie van de geslachten *Microcystis* en *Planktothrix* en de *Anabaena/Aphanizomenon* groepen C en D zijn kwantitatief, selectief en gevoelig;
- De sterke genetische verwantschap tussen de geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* maakt het onmogelijk om volledig geslachtspecifieke primers en probes te ontwerpen. Deze geslachten kunnen wel gezamenlijk worden gedetecteerd;
- Geen van de referentiestammen valt binnen de kleinere groepen A en B waardoor voor deze twee groepen geen specifieke detectiemethoden konden worden ontwikkeld;
- De aanwezigheid van andere cyanobacteriën (10^4 DNA kopieën/PCR) heeft voor geen van de methoden een meetbare invloed op de specifieke Q-PCR detectie zowel op hoog als op laag concentratieniveau (10^4 en 10^1 DNA kopieën/PCR);
- De gecombineerde detectie van een interne controle met de detectie met de specifieke Q-PCR methoden in een multiplex reactie resulteert niet in afname van de PCR-efficiëntie. De interne controle is dus geschikt voor toepassing;
- De ontwikkelde Q-PCR methoden zijn klaar om verder te worden gevalideerd voor toepassing van de methoden met praktijkmonsters.

5 Algemene discussie

De ontwikkelde detectiemethoden op basis van Q-PCR zijn in de labvalidatie specifiek, gevoelig, kwantitatief en robuust gebleken. Ze hebben dus veel potentie om te worden toegepast voor kwantitatieve analyse van zwemwater op de aanwezigheid van toxineproducerende cyanobacterië-geslachten. Deze analysemethode maakt het mogelijk om binnen een dag kwantitatief en specifiek toxineproducerende cyanobacteriën in water te analyseren. Het nieuwe blauwalgenprotocol (1) schrijft voor dat de celdichtheid van cyanobacteriën moet worden bepaald, in plaats van cyanotoxinen. De Q-PCR methode is in potentie dan ook uitermate geschikt voor het toepassen in dit blauwalgenprotocol.

Voor detectie van de in Nederland voorkomende toxineproducerende geslachten van cyanobacteriën *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* en *Aphanizomenon* zijn met succes nieuwe kwantitatieve Q-PCR methoden ontwikkeld. De selectieve detectiemethoden zijn ontworpen op basis van de verschillen tussen de geslachten van de DNA-volgorde op het fycocyanine gen (cpc). Dit cyanobacteriën specifieke gen is in enkelvoud aanwezig op het bacteriegenoom met relatief veel DNA-variatie tussen de verschillende geslachten. Dit bleek het uitermate geschikt te maken voor ontwerp van specifieke Q-PCR methoden.

De geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* zijn niet mono-fylogenetisch maar genetisch vermengd. Ze zijn dus zeer verwant en met de onderzochte genetische methoden niet te onderscheiden. De meeste andere geslachten zoals *Microcystis*, *Planktothrix* en *Cylindrospermopsis* zijn wel mono-fylogenetisch (4, 7, 9, 11, 12). Op basis van de DNA-volgorde van verschillende functionele genen zoals 16S rRNA, rpoB, rbcLX en cpcBA worden de stammen van de geslachten *Anabaena* en *Aphanizomenon* verdeeld over verschillende clusters (11). Deze genetische vermenging van twee geslachten is veroorzaakt doordat de indeling in eerste instantie is gebaseerd op morfologische analyse. Morfologische indeling en fylogenetische analyse blijken bij cyanobacteriën niet altijd overeen te komen. Dit lijkt ook de oorzaak van het verschil tussen de identificatie van de referentiestammen op basis van de DNA-volgorde van het cpcBA gen en de informatie van de cultuurcollectie. Waarschijnlijk is dit ook een gevolg van de beperking of moeilijkheid om cyanobacteriën in te delen op basis van morfologie. Voor een op DNA-volgorde gebaseerde detectiemethode heeft dit tot gevolg dat het voor deze geslachten vrijwel onmogelijk is om volledig geslachtsspecifieke detectiemethoden te ontwikkelen. Q-PCR detectie van *Anabaena* en *Aphanizomenon* sequenties is dus alleen mogelijk zijn op basis van methoden die zijn gebaseerd op detectie van bepaald cluster van verwante stammen die mogelijk afkomstig zijn uit beide geslachten. Dit neemt niet weg dat met behulp van de ontwikkelde primersets vrijwel alle bekende sequentietypen worden gedetecteerd. Indien nodig kunnen de primersets worden aangepast of uitgebreid als blijkt dat bepaalde in Nederland voorkomende typen ondanks zorgvuldig ontwerp toch worden gemist.

De ontwikkeling en optimalisatie van Q-PCR methoden voor de geslachten *Microcystis* en *Planktothrix* heeft geresulteerd in methoden die geschikt zijn voor verdere validatie in de praktijk. Ook methoden gericht tegen twee clusters waarbinnen een groot deel van de beschikbare *Anabaena* en *Aphanizomenon* sequenties vallen, zijn de resultaten goed. Voor twee kleinere clusters ontbreken de referentiestammen en is validatie pas mogelijk als deze referentiestammen beschikbaar zijn. Onduidelijk is of de (sequentie)typen die voorkomen in het zwemwater in Nederland aanwezig zijn in de sequentiedatabase die is gebruikt voor het ontwerp van de specifieke primers en probes. Dit kan echter alleen worden onderzocht door de methoden naast de klassieke telmethoden toe te passen in de praktijk. Bij een verschillend

analyseresultaat kan sequentieanalyse van de al dan niet gedetecteerde cyanobacteriën hierover inzicht geven. Indien nodig kan het ontwerp van de detectiemethode worden aangepast aan deze nieuwe inzichten.

Voor toepassing van de Q-PCR methoden in de praktijk is het noodzakelijk zowel de validatie verder uit te breiden, als een referentiesysteem te ontwikkelen. De beschreven validatie van de Q-PCR methoden is zeer beperkt en zal moeten worden uitgebreid volgens de richtlijnen die zijn opgenomen in het document "Toelichtend document Microbiologie" van de raad van Accreditatie (RvA-T2) (2). Onvoldoende bekende prestatiekenmerken zijn onder andere de specificiteit, reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid, lineariteit en de onderste analysegrens. Tevens is het noodzakelijk om een referentiesuspensie van DNA of cellen te ontwikkelen om de cyanobacteriën in monsters te kunnen kwantificeren en moet een duidelijke relatie worden aangetoond tussen aantal cellen (microscopische telling) en het aantal DNA-kopieën geanalyseerd met de Q-PCR methode. De implementatie van Q-PCR methoden in een laboratorium vraagt een behoorlijke personele en organisatorische inspanning, maar een modern laboratorium heeft de kennis en middelen wel beschikbaar. Er moet kennis aanwezig zijn bij de uitvoerende analisten en ook moet het laboratorium uitgerust zijn voor het uitvoeren van op PCR gebaseerde detectietechnieken. Normalisering van de nieuw ontwikkelde Q-PCR methoden is een belangrijk stap voor implementatie van deze methoden in de testlaboratoria.

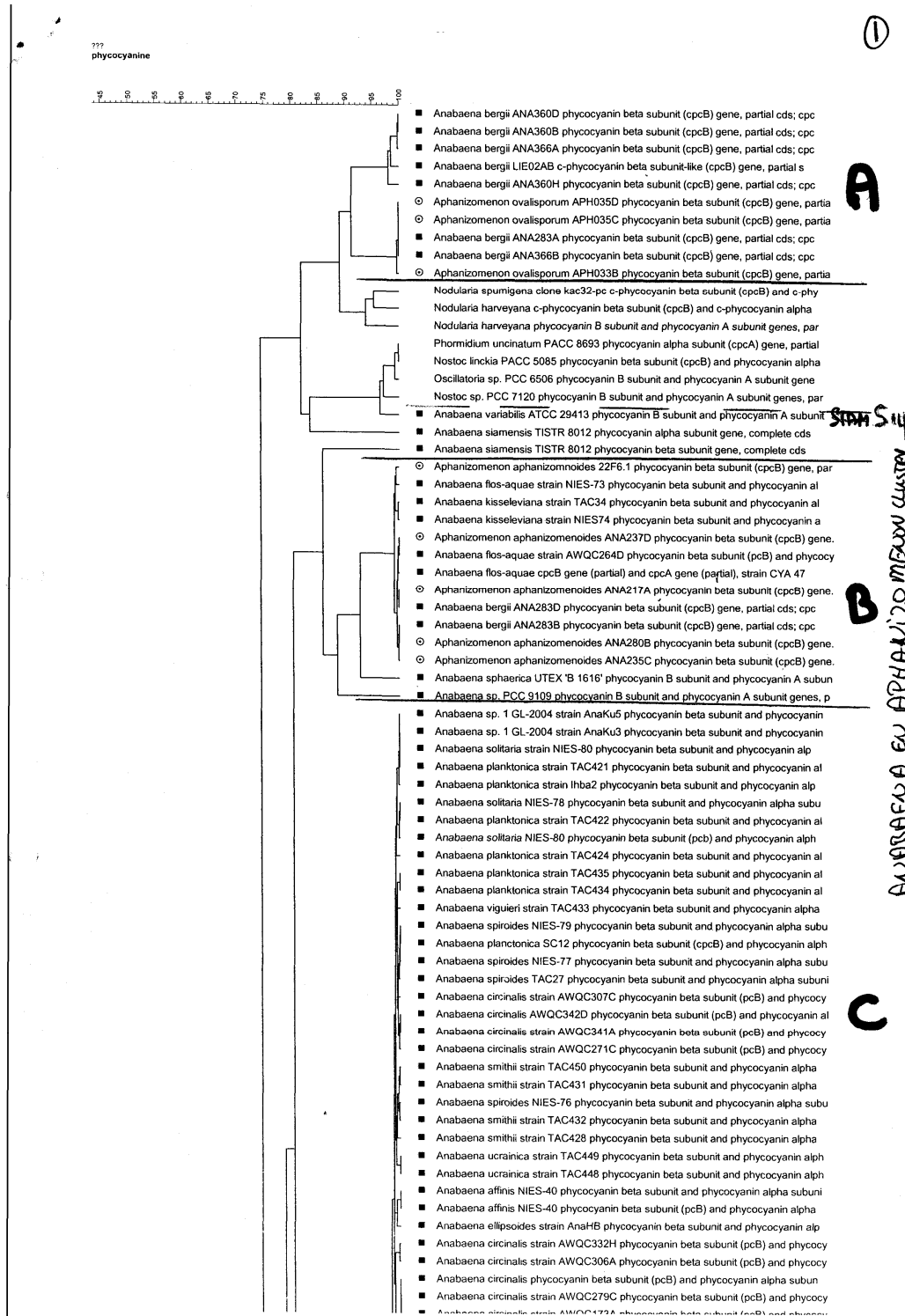
6 Aanbevelingen

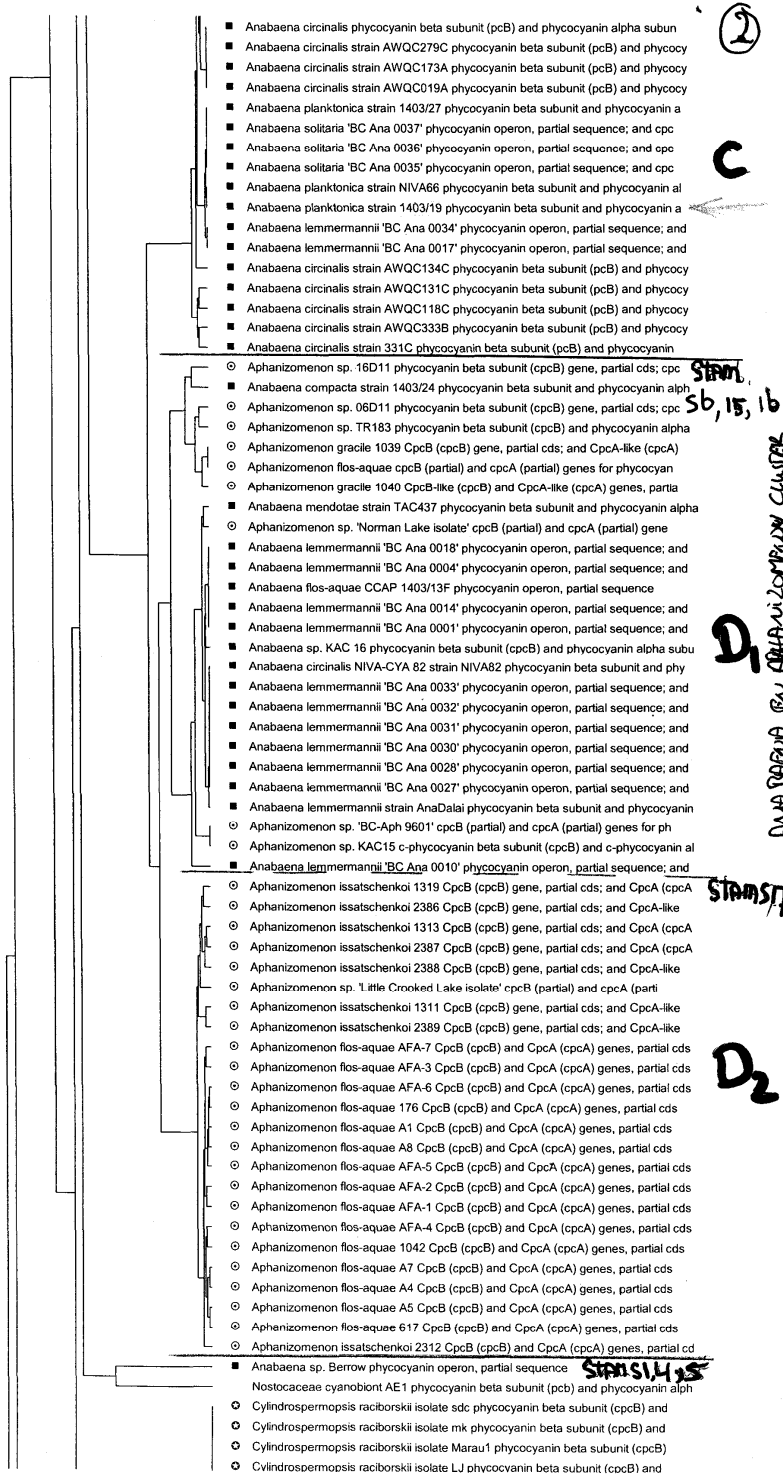
- Verder validatie van de ontwikkelde Q-PCR methoden volgens de richtlijnen die zijn opgenomen in het document “Toelichtend document Microbiologie” van de raad van Accreditatie (RvA-T2) (2);
- Ontwikkelen van de DNA-referentiesuspensie voor kwantificeren van cyanobacteriën in watermonsters met Q-PCR (ijklijn);
- Uitbreiden van de referentiestammencollectie met stammen die vallen binnen de groepen A en B waardoor ook voor deze groepen specifieke methoden kunnen worden ontwikkeld en gevalideerd;
- Toepassen van de ontwikkelde Q-PCR methoden in de praktijk in combinatie met bestaande detectiemethoden voor cyanobacteriën en eventueel isoleren van in Nederland voorkomende cyanobacteriën;
- Onderbouwing van de kwantificering van cyanobacteriën door middel van Q-PCR door de resultaten te vergelijken met bestaande telmethoden;
- Voor zover mogelijk samenvoegen van verschillende Q-PCR methoden en interne controle in een multiplex Q-PCR experiment;
- Opstellen van een normvoorschrift voor kwantitatieve detectie van cyanobacteriën in oppervlaktewater/recreatiewater/zwemwater

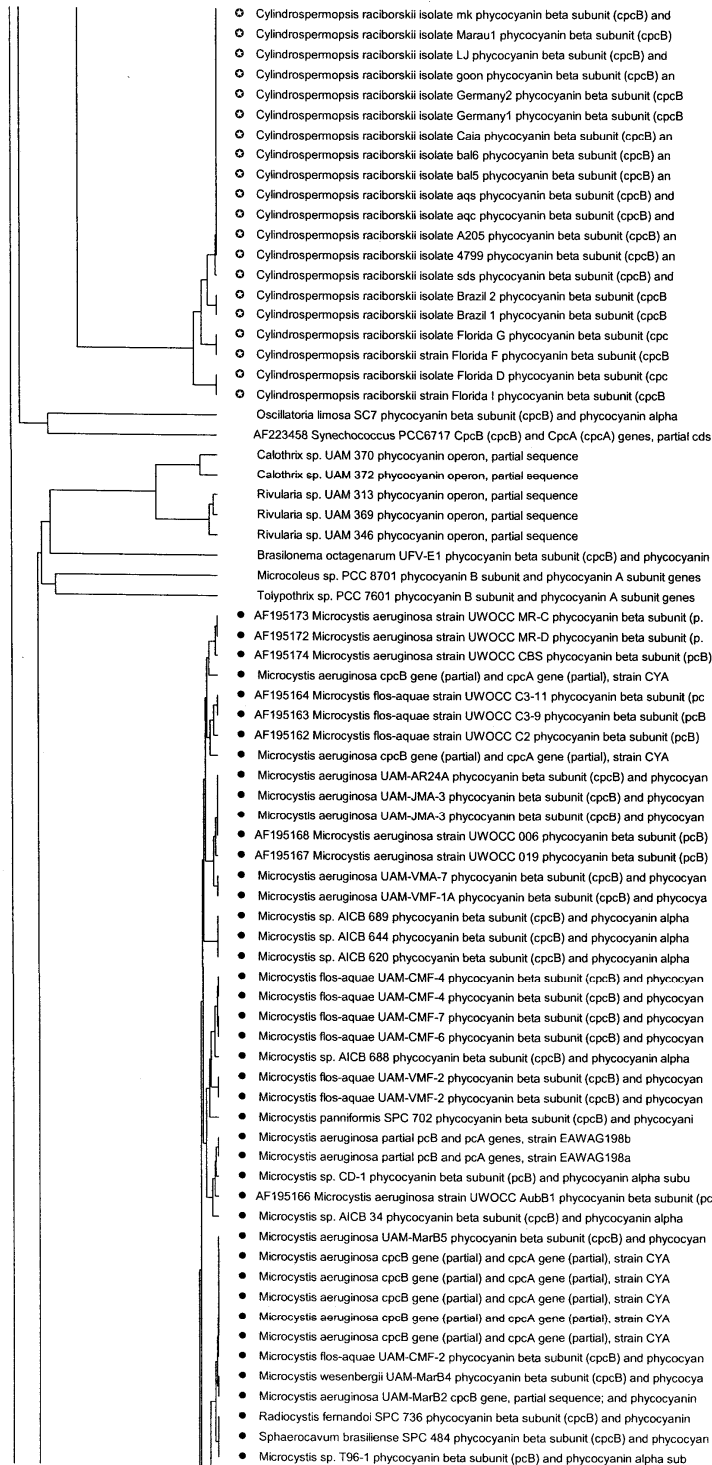
7 Literatuur

1. **Anonymous.** 2007. Blauwalgenprotocol, aangepast vernieuwede protocolversie 18.
2. **Anonymous.** 2004. RvA-T2. Toelichtend document microbiologie.
3. **Chorus, I., and J. Bartram (ed.).** 1999. Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, E & FN Spon, an imprint of Routledge, London, London and New York.
4. **Crosbie, N. D., M. Pockl, and T. Weisse.** 2003. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-intergenic spacer sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* **69**:5716-21.
5. **Gezondheidsraad.** 2001. Microbiële risico's van zwemmen in de natuur. Gezondheidsraad.
6. **Herdman, M., M. Janvier, R. Rippka, and r. Y. Stanier.** 1979. Genome size of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**:73-85.
7. **Ivanikova, N. V., L. C. Popels, R. M. McKay, and G. S. Bullerjahn.** 2007. Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Appl Environ Microbiol* **73**:4055-65.
8. **Kardinaal, W. E. A., R. Bissesar, and G. Zwart.** 2006. DNA technieken voor detectie van cyanobacteriën; praktijktesten CYANOKIT en Q-MAAP in Nederlandse oppervlaktewateren. NIOO rapport.
9. **Kim, S. G., S. K. Rhee, C. Y. Ahn, S. R. Ko, G. G. Choi, J. W. Bae, Y. H. Park, and H. M. Oh.** 2006. Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of cpcBA intergenic spacer region analysis. *Appl Environ Microbiol* **72**:3252-8.
10. **Kurmayer, R., and T. Kutzenberger.** 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol* **69**:6723-30.
11. **Rajaniemi, P., P. Hrouzek, K. Kastovska, R. Willame, A. Rantala, L. Hoffmann, J. Komarek, and K. Sivonen.** 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:11-26.
12. **Robertson, B. R., N. Tezuka, and M. M. Watanabe.** 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:861-71.
13. **Schmidt, W., H. Petzoldt, K. Bornmann, L. Imhof, and C. Moldaenke.** 2009. Use of cyanopigment determination as an indicator of cyanotoxins in drinking water. *Wat. Sci. Tech.* **59**:1531-1540.
14. **Wullings, B., E. kardinaal, and G. Medema.** 2009. Ontwikkeling van Q-PCR methoden voor de kwantitatieve detectie van de verschillende toxineproducerende cyanobacteriën. KWR **09.055**.

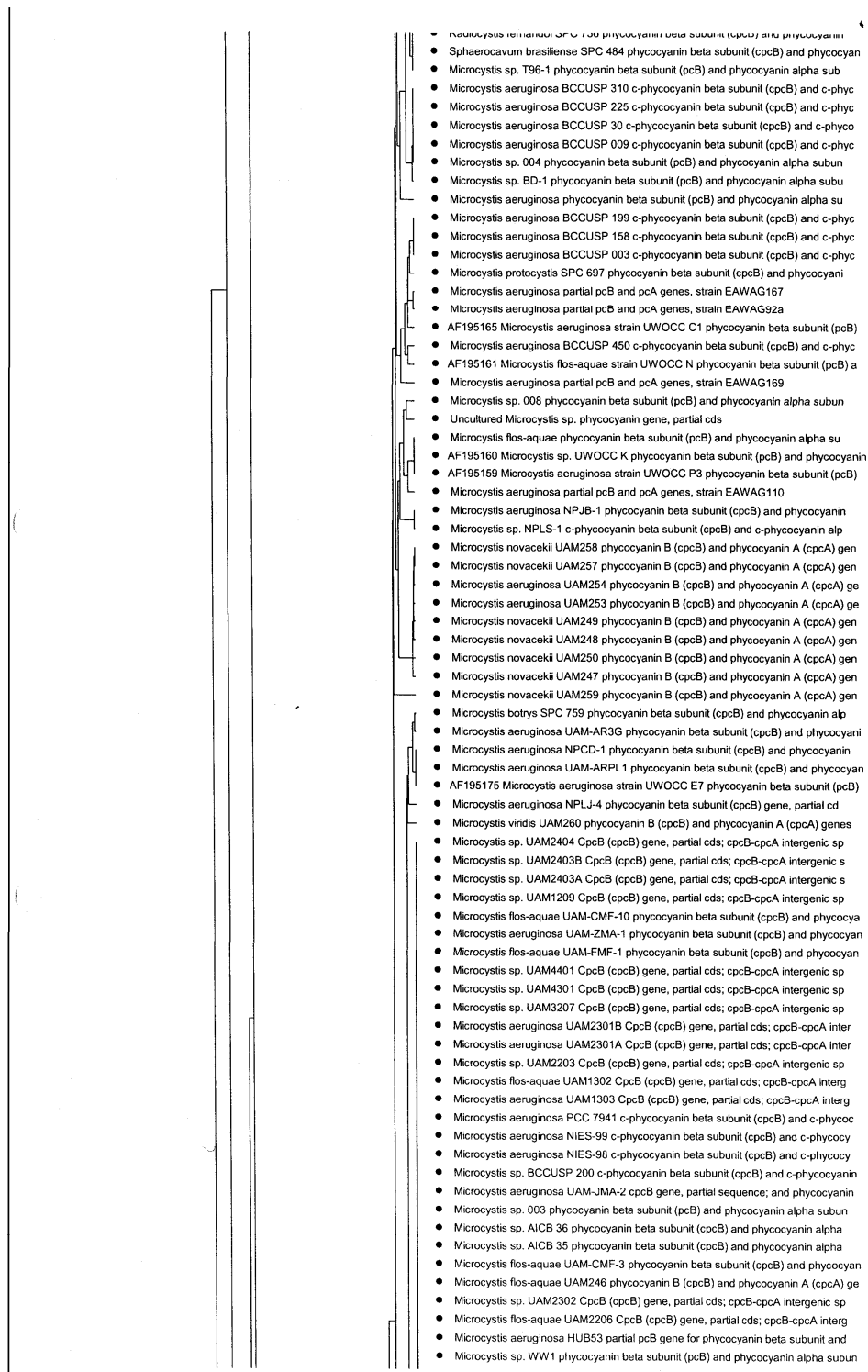
I Overzicht van de DNA-sequenties van cyanobacteriën gerangschikt op basis van verwantschap (dendrogram)



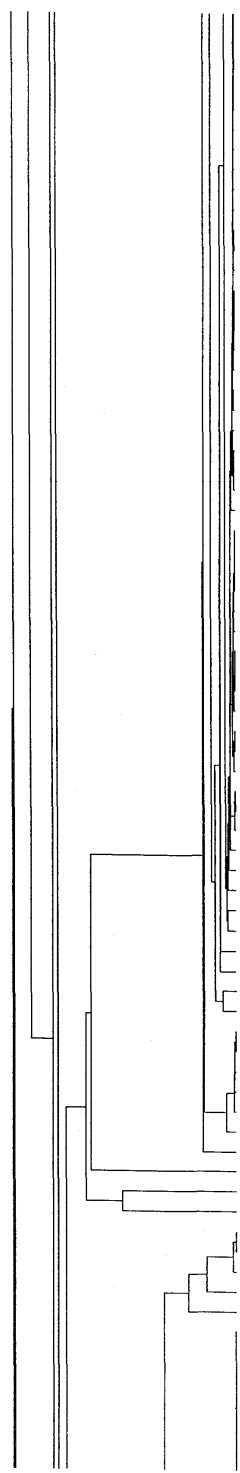




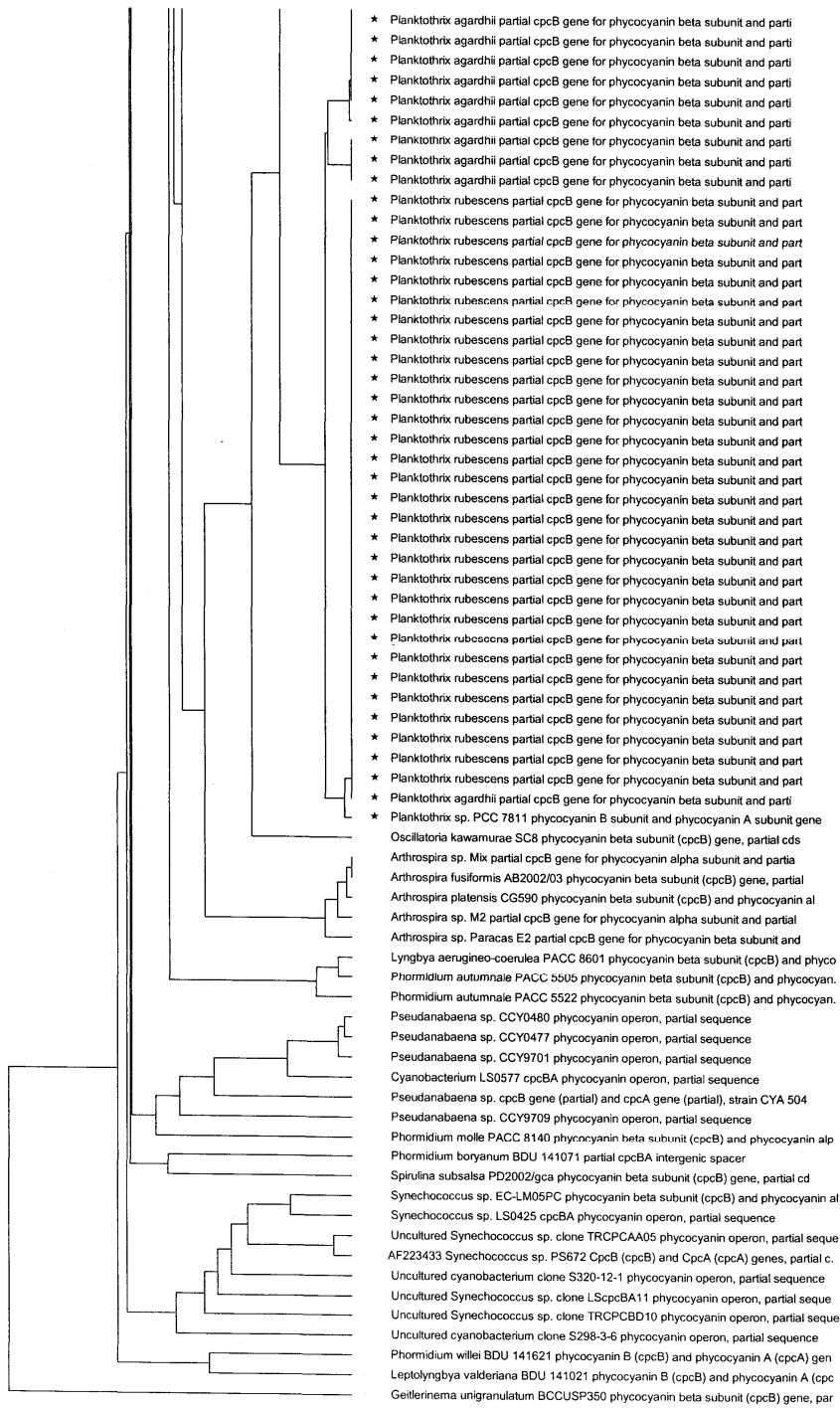
④



5



- *Microcystis aeruginosa* HUB53 partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and
- *Microcystis* sp. WW1 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- *Microcystis* sp. CaD-1 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- *Microcystis* sp. UAM3301 *CpcB* (*cpcB*) gene, partial cds; *cpcB-cpcA* intergenic space
- *Microcystis* sp. UAM2208 *CpcB* (*cpcB*) gene, partial cds; *cpcB-cpcA* intergenic space
- *Microcystis flos-aquae* UAM2501 *CpcB* (*cpcB*) gene, partial cds; *cpcB-cpcA* intergenic space
- *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis flos-aquae* UAM256 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes
- *Microcystis aeruginosa* SPC 777 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* UAM-ZMA-3 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain EAWAG171
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain PCC7820
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain EAWAG94a
- *Microcystis aeruginosa* UAM-MarAF phycocyanin beta subunit (*cpcB*) gene, partial cds; an
- *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- AF195170 *Microcystis aeruginosa* strain UWOC017 phycocyanin beta subunit (*cpcB*)
- AF195169 *Microcystis aeruginosa* strain UWOC023 phycocyanin beta subunit (*cpcB*)
- *Microcystis flos-aquae* UAM-KMF phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* UAM-VMA-12 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* UAM-VMA-4 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis flos-aquae* UAM255 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes
- AF195177 *Microcystis aeruginosa* strain PCC7806 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and
- AF195158 *Microcystis aeruginosa* strain UWOC001 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and
- AF195176 *Microcystis aeruginosa* strain PCC7820 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain PCC7806Pi
- *Microcystis* sp. UAM-CPM1 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) gene, partial cds; an
- *Microcystis* sp. UAM3403 *CpcB* (*cpcB*) gene, partial cds; *cpcB-cpcA* intergenic space
- *Microcystis* sp. UAM1301 *CpcB* (*cpcB*) gene, partial cds; *cpcB-cpcA* intergenic space
- *Microcystis flos-aquae* UAM242 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes
- *Microcystis flos-aquae* UAM243 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes
- *Microcystis aeruginosa* *cpcB* gene (partial) and *cpcA* gene (partial), strain CYA
- *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 299 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 298 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 262 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 235 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis flos-aquae* UAM-TMF-2 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* UAM-TMA-1 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* HUB524 partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and
- *Microcystis viridis* NIES-102 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis* sp. AICB 702 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- AF195178 *Microcystis* sp. UWOC F phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain PCC7806Fr
- *Microcystis flos-aquae* phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- AF195171 *Microcystis aeruginosa* strain UWOC C5 phycocyanin beta subunit (*cpcB*)
- *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 232 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- AF195179 *Microcystis* sp. UWOC Q phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* UAM-MarAZ *cpcB* and *cpcA* genes, partial sequence
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain EAWAG120a
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain EAWAG127c
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain EAWAG127a
- *Microcystis wesenbergii* NIES-112 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis wesenbergii* NIES-111 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis wesenbergii* UAM244 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes, partial
- *Microcystis* sp. UAM241 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes, partial
- *Microcystis* sp. UAM240 phycocyanin B (*cpcB*) and phycocyanin A (*cpcA*) genes, partial
- *Microcystis wesenbergii* BCCUSP 011 c-phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and c-phycocyanin
- *Microcystis aeruginosa* partial *cpcB* and *cpcA* genes, strain EAWAG170
- AF223461 *Synechococcus* PCC7902 *CpcB* (*cpcB*) and *CpcA* (*cpcA*) genes, partial cds
- *Chroococcus dispersus* partial *cpcB* and *cpcA* genes, clone SA01P73
- *Acaryochloris marina* phycocyanin alpha subunit (*cpcA*) gene, partial cds
- *Arthrospira masartii* SC4 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- *Oscillatoria kawamurae* SC7 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- *Planktolyngbya limnetica* SC3 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- * *Planktothrix agardhii* SC11 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- *Phormidium tergestinum* SC6 phycocyanin beta subunit (*cpcB*) and phycocyanin alpha subunit
- * *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 537 partial phycocyanin operon, strain NIVA-CYA
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial
- * *Planktothrix agardhii* partial *cpcB* gene for phycocyanin beta subunit and partial



PLANKTOTHRIX CLUSTER
 ⑧

II Ontworpen primers en probes

Tabel 12: Ontwikkelde primers en probes voor detectie van *Microcystis*

<i>naam</i>	<i>Type</i>	<i>Lengte (nt)</i>	<i>GC (%)</i>	<i>Tm² (°C)</i>
188F ¹	F	17	71	60
Mc_F1	F	20	50	58
Mc_F2	F	21	48	60
Mc_F3	F	22	45	60
Mc_F4	F	22	41	58
254R ¹	R	25	44	64
Mc_R1	R	23	39	59
Mc_R2	R	22	41	58
Mc_R3	R	18	67	61
Mc_R4	R	19	53	58
Mc_R5	R	22	41	58
Mc_R6	R	19	58	60
taqP ¹	P	23	70	72
Mc_P1	P	20	70	67
Mc_P2	P	23	57	67
Mc_P3	P	22	55	64
Mc_P4	P	23	57	67
Mc_P4	P	25	40	63

1, primers en probe ontwikkeld door Kurmayer and Kutzenberger (10); 2, smelttemperatuur op basis van "Oligo Calc" salt adjusted.

Tabel 13: Ontwikkelde primers en probe voor detectie van *Planktothrix*

<i>naam</i>	<i>Type</i>	<i>Lengte (nt)</i>	<i>GC (%)</i>	<i>Tm¹ (°C)</i>
PI_F1	F	21	57	63
PI_F2	F	19	53	57
PI_F3	F	21	57	63
PI_F4	F	19	53	57
PI_R1	R	22	45	60
PI_R2	R	21	48	60
PI_R3	R	19	53	57
PI_P1	P	26	38	63
PI_P2	P	25	40	63
PI_P3	P	24	42	62
PI_P4	P	26	42	65
PI_P5	P	27	44	67

1, smelttemperatuur op basis van "Oligo Calc" salt adjusted.

Tabel 14: Ontwikkelde primers en probe voor detectie van *Anabaena* en *Aphanizomenon*

<i>naam</i>	<i>Type</i>	<i>Target</i> ¹	<i>Lengte</i> (<i>nt</i>)	<i>GC</i> (%)	<i>Tm</i> ² (°C)
Anp_F1	F	gr A	21	43	57
Anp_F2	F	gr A	18	56/61	56/58
Anp_F3	F	gr B	23	39	59
Anp_F4	F	gr B	20	50	58
An_F5	F	gr C	21	48	60
An_F6	F	gr C	20	45	56
Anp_F7	F	gr D	20	50	58
Ap_F8	F	gr D2	20	50	58
Anp_R1	R	gr A	20	50	58
Anp_R2	R	gr A	23	39	59
Anp_R3	R	gr B	23	39	59
An_R4	R	gr C	20	50	58
Anp_R5	R	gr D	22	45	60
Anp_R6	R	gr D	21	43	57
Anp_R7	R	gr D	20	50	58
Anp_R8	R	gr D1/2	21	43	57
Anp_R9	R	gr D2	21	43	57
Anp_R10	R	gr D2	22	45	60
Anp_P1	P	gr A	25	48	66
Anp_P2	P	gr AB	24	46	64
An_P3	P	gr C	25	48	67
Anp_P4	P	gr D1	25	48	66
Ap_P5	P	gr D2	26	42	65
Ap_P6	P	gr D	27	44/48	67/68
Ap_P7	P	gr D	26	46/50	66/68

1, groepsindeling van *Anabaena* en *Aphanizomenon* DNA-sequentie op basis van dendrogram bijlage 1; 2, smelttemperatuur op basis van "Oligo Calc" salt adjusted.

