

Skimmelsvampe i vandskadede bygninger - detektion af svampe med DNA-chips

Anvendt Molekylær Biologi (AMB), Mykologigruppen ved Biocentrum-DTU samt By og Byg har i forskningsrådsprojektet »Skimmelsvampe i vandskadede bygninger« samarbejdet om at udvikle en DNA-chipbaseret metode til detektion af de hyppigst forekommende skimmelsvampefamilier i bygninger

Af Lars H. Pedersen, Pernille Skouboe, Poul Erik Højby, Dorte Lauritsen, Ida Jørring og Kim Holmstrøm, Anvendt Molekylær Biologi, Bioteknologisk Institut (BI), Hørsholm

Der har inden for de seneste år fra medie- og myndighedsside været stor fokus på en række indeklimasager i såvel offentligt som privat byggeri - især vandskadede skoler har haft og har stadig stor bevågenhed. I 1997 førte indeklimaproblemerne til, at By og Byg og Arbejdsmedicinsk Klinik, Bisbebjerg Hospital sammen med en række institutioner og virksomheder fik bevilget et tværdisciplinært forskningsprojekt, der skulle belyse skimmelsvampeproblematikken i Danmark. AMB blev sammen med Mykologigruppen inddraget i en del af projektets hurtigmetodeudvikling, idet vi havde en omfattende komplementerende morfologisk og molekylær viden om skimmelsvampedetektion.

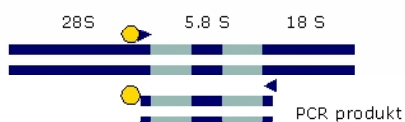
Detektion af skimmelsvampe

Skimmelsvampevækst forekommer ofte i forbindelse med vandskader på bygninger - f.eks. på tapeter. Tilkaldte eksperter kan ofte identificere skimmelsvampe på stedet, men der tages også tit aftryk af bygningsdelene på aftryksplader med vækstmedium. Aftrykspladernes svampe identificeres efterfølgende morfologisk af specialister inden for nogle dage eller uger.

Vi ønskede at udvikle en hurtig DNA-baseret metode, der kan bruges til hurtig identifikation på familie- eller artsniveau, og som er uafhængig af svampespecialister.

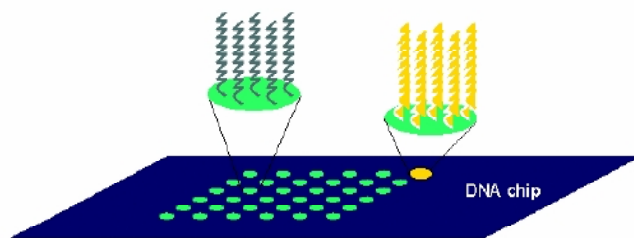
DNA-chip-metoden

Med udgangspunkt i en specifik region af skimmelsvampegenomet, som koder for strukturelle RNA-molekyler, der



Figur 1 viser et meget lille udsnit af et svampekromosom. De blå områder er de ribosomale RNA-molekyler, der transskriberes og som indgår i ribosomerne, mens de grå områder er »intergenic transcribed spacers« (ITS), der udsplej ses efter transskription. De blå områder er i store træk meget ens for alle svampe, mens de grå områder er variable og derfor egnede til familie- eller artsgruppering af svampe.

Med PCR-primere placeret i de blå områder (pile) amplificeres fluoroformærkede PCR-produkter som indeholder de variable zoner. PCR-produkterne kan sekventeres og benyttes til at konstruere en database over svampe. Databasen er udgangspunktet for konstruktionen af DNA-chips (figur 2).



Figur 2 viser princippet i en DNA-chip. En række forskellige DNA-prober (grønne pletter) dispenseres vha. en DNA-array robot og immobiliseres kovalent eller elektrostatiske. Efterfølgende kan mærkede PCR-produkter (gul farve) amplificeret fra ukendte svampekilder opfanges på en specifik probe, hvis der er komplementaritet mellem probe og PCR-produkt. Hvis et positivt signal (gult) fremkommer, indikerer det, at en given svamp (eller en tæt beslægtet) er til stede i prøven, hvorfra PCR-produktet er mangfoldiggjort.

indgår i ribosomerne, kan man gruppere svampe efter slægt og i nogen tilfælde art (figur 1). Grupperingsmuligheden opstår, fordi store dele af de ribosomale molekyler er fælles for alle svampe (de blå regioner i figur 1), mens andre dele er variable (de grå områder = ITS regionen). Vha. PCR-teknologi er det muligt at amplificere ITS PCR-produkter fra alle svampe. PCR-produkterne fra sikkert identificerede svampearter/familier (f.eks. fra Mykologigruppens stammesamling eller andre internationalt anerkendte samlinger) sekvensbestemmes og anvendes til at gruppere svampene i databaser.

By og Byg og Mykologigruppen udvalgte en række bygningsrelaterede svampeslægter og -arter. En ITS-sekvensdatabase blev etableret, og den er udgangspunkt for valg af de prober, som vores bygnings DNA-chip er udstyret med (figur 2). Afsætning og immobilisering af prober på de mikroskopsli-deformede glas- eller polymerchips kører i dag rutinemæssigt ved AMB. Udfordringen i en PCR-produktanalyse er den specifikke opfangning af PCR-produktet på de immobiliserede prober. ITS-produktet indeholder en række DNA-sekvenser, der gør, at produktet kan folde op, og det har derfor krævet nogen indkøring til at opfangningen til at fungere optimalt.

Identifikation af svampe fra inficerede tapeter

Fra at have opfanget blandede PCR-produkter fra forskellige svampe simultant på den samme chip, lykkedes det at demonstrere den praktiske anvendelse af en bygnings DNA-chip. En række tapeter indsamlet af By og Byg blev udleveret til BI, der

efterfølgende ekstraherede DNA fra tapeterne og amplificerede ITS-produkter. Figur 3 er et eksempel på, at det var muligt at identificere en ukendt svamp (*Chaetomium* spp) med denne metode, og det lykkedes efterfølgende med sekvensanalyse at bekræfte resultatet.

Status

Identifikation af en given art forudsætter naturligvis, at den/de nødvendige prober er til stede på chippen, og at der ikke sker krydsreaktioner til andre arter. Det er derfor nødvendigt at teste chippen over for en række slægter/arter som led i validering af metoden, og det er nødvendigt at teste, om det er muligt at ekstrahere DNA fra en række materialer/skrab fra materialer. Det skal endvidere understreges, at chipanalysen i sin nuværende form udelukkende er kvalitativ, men der arbejdes også med udvikling af kvantitative DNA-analyser.

Tidsmæssigt tager en DNA-analyse fra ca. 8-24 timer pga. reaktionerne, dog med en kort hands-on-tid, hvilket gør metoden meget konkurrencedygtig - især hvis flere prøver skal analyseres. Anvendelsesområderne for chippen er brede (alle svampe), men der fokuseres på indeklimaproblemer (ventilation) og bygningssvampe samt fødevarerborne svampe.

Tak til samarbejdspartnere

Suzanne Gravesen (By og Byg), Birgitte Andersen, Ulf Thrane, Kristian Fog Nielsen (Mykologigruppen, Biocentrum-DTU), Svend Erik Rasmussen (Teknologisk Institut). En mindre del af



Figur 3 viser resultatet af en DNA-chip analyse. DNA ekstraheredes fra et tapet (billedet til højre). Et PCR-produkt blev amplificeret som indikeret i figur 1 og søgt opfanget på DNA-chippen. På dette tapet lyser 4 spots op, svarende til at svampen på tapetet med stor sandsynlighed var en *Chaetomium* spp. Den hvide streg på DNA-chippen svarer til 500 µm. Pletterne til højre i billedet er optiske artefakter.

projektet var finansieret af Forskningsprogrammet »Skimmel-svampe i vandskadede bygninger«.

E-mail-adresse

Lars H. Pedersen: lap@bioteknologisk.dk

Holm & Halby

TIL LABORATORIER I UDVIKLING

Holm & Halby A/S er en af Danmarks førende udbydere af laboratorieudstyr og tilhørende serviceydelser. Holm & Halby A/S er en selvstændig virksomhed i den svenske Bergman & Beving koncern, der har specialiseret sig i handel med teknologiske produkter på de nordiske markeder. Koncernen beskæftiger 1400 medarbejdere i Norden. Holm & Halby afsætter deres produkter til den farmaceutiske industri, uddannelsessektoren, sundhedssektoren samt levnedsmiddelsektoren og søger nu til Danmark en

Produktspecialist

• Væske-(HPLC) og gaskromatografi • Markedsledende produkter

Med reference til salgsschefen skal du indgå i Analytisk Team, hvor du skal supportere de eksterne sælgere i salget af væsekromatografi (HPLC) og gaskromatografi, hvilket indebærer behovsafdekning hos kunderne i samarbejde med sælgerne. Endvidere bliver det din opgave at installere og implementere udstyret hos kunden samt at undervise brugerne. Du skal foretage aftersales og supportere ved applikations- og softwarespørgsmål hos kunden.

Du bliver produktansvarlig for en eller to produktlinier inden for HPLC samt øvrigt kromatografiudstyr, hvilket indebærer, at du skal varetage kontakten til leverandører af disse. Du skal endvidere i samarbejde med sælgerne forestå tiltag i relation til markedsføring af produkterne.

Vi forventer, at du holder dig ajour med markedsudviklingen samt deltager på udstillinger og seminarer.

Faglige kvalifikationer

- Du har en uddannelse som kemiker, kemiingeniør, laborant eller en anden relevant uddannelse.
- Du har en god forståelse for og praktisk erfaring i brug af teknisk udstyr og IT, herunder har du en god forståelse for software samt erfaring med eller interesse i at formidle din viden til kunder på et højt fagligt niveau.
- Har du en merkantil uddannelse og/eller erfaring med kundesupport og salg, er det ligeledes en fordel, men ingen betingelse.
- Du har erfaring med selvstændigt at planlægge din arbejdsdag.
- Du behersker engelsk i skrift og tale.

Virksomheden tilbyder

Et krævende job i en virksomhed i vækst og med ambitioner. Stillingen bliver aflønnet efter kvalifikationer.

Send din ansøgning mærket "233368" sammen med dit C.V. til rekrutteringsfirmaet Laigaard & Partners A/S, Store Kongensgade 40H, 1264 København K eller på E-mail HRM@Laigaard-Partners.dk. Vi behandler din henvendelse fortroligt og videregiver kun dine oplysninger efter nærmere aftale med dig. Yderligere oplysninger kan fås på telefon 33 91 18 00.

LAIGAARD & PARTNERS
SEARCH - SELECTION

