

10001  
10004  
10006  
10009

# Genekspresjonsanalyse av *muc5*, *muc18* og *il4/13a* fra gjellelev i atlantisk laks ved bruk av RT-qPCR – før, under og tre uker etter brønnbåttransport

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Ann-Kristin Tveten  
Mai 2022



10001  
10004  
10006  
10009

# **Genekspresjonsanalyse av *muc5*, *muc18* og *il4/13a* fra gjellevev i atlantisk laks ved bruk av RT-qPCR – før, under og tre uker etter brønnbåttransport**

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Ann-Kristin Tveten  
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden





## Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet av fire motiverte bioteknologistudenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Ålesund. Oppgaven ble valgt da det virket utfordrende og lærerikt å være en del av et forskningsprosjekt, samt at temaet virket spennende. Det er lite forskning rundt fiskens helse i oppdrettsanlegg, og dermed hadde gruppen et ønske om å bidra til økt kunnskap. Alt laboratoriearbeid ble utført på NTNUs laboratorier og all samskriving ble gjort i Word i Microsoft Teams. Slik samskriving gjorde det mulig å samarbeide når det, på grunn av pandemien, ikke var mulig å møtes fysisk. Gjennom tre år på bachelor i bioteknologi har vi tilegnet oss mye kunnskap som vi har fått bruk for i denne oppgaven. I tillegg har det være en lærerik prosess, både teoretisk og praktisk.

Vi ønsker å rette en stor takk til NTNU i Ålesund som har bidratt med økonomiske midler som har gjort denne bacheloren mulig å gjennomføre, samt tidligere og upubliserte studier som har optimalisert primere og metoder. Vi ønsker også å rette en takk til noen av våre medstudenter som har vært støttende gjennom denne perioden. Sist, men ikke minst ønsker vi å rette en stor takk til vår veileder Ann-Kristin Tveten som har vært tålmodig og hjelpsom gjennom disse månedene.

## Sammendrag

Genekspresjon av muciner og interleukiner i kommersiell atlantisk laks kan gi en indikasjon på fiskens helse og velferd. I denne studien blir det sett på fiskens fysiologiske respons på transport fra settefiskanlegg på land til oppdrettsanlegg i sjø. Økt kunnskap om hvordan fiskens fysiologiske respons på en slik transport er, kan danne et viktig grunnlag for fremtidig transport av atlantisk laks i oppdrettsnæringen på en effektiv og minst mulig stressende måte. Denne studien baserer seg på vevsprøver tatt fra laksens gjeller før, under og tre uker etter transport. RT-qPCR ble brukt som analysemetode for tre gener og ett normaliseringsgen, henholdsvis *muc5*, *muc18* og *il4/13a*, og *actb*.

Relativ genekspresjon ble bestemt med  $\Delta\Delta C_t$ - og  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden etter bearbeidelse av rådata fra Aligent AriaMx 1.8 i Microsoft Excel. Dataene ble fremstilt grafisk og resultatene viste en oppregulering av de aktuelle genene under transport og tre uker etter transport. Signifikansen ble bestemt ved utførelse av t-test. Oppreguleringen viser at det har skjedd en fysiologisk respons i fisken som følge av transporten. Det anbefales videre forskning rundt de aktuelle genenes funksjon i fisk, for å få en bedre forståelse av hvordan den fysiologiske responsen påvirker fisken.

## Abstract

Gene expression of mucins and interleukins in commercial Atlantic salmon may provide an indication of the health and welfare of the fish. In this study, the physiological response the fish get from transportation from land-based hatcheries to fish farms at sea is discussed. Increased knowledge of the physiological response in fish to such transport, can make an important foundation for future transport of Atlantic salmon in the aquaculture industry. In the future, the main goal should be to make the transport efficient and less stressful. This study is based on tissue samples taken from the gills of salmon before, during and three weeks after transport. RT-qPCR was used as the assay method for three genes and one normalization gene, *muc5*, *muc18*, and *il4/13a*, and *actb*, respectively.

Relative gene expression was determined by the  $\Delta\Delta C_t$ - and  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -method after processing raw data from Aligent AriaMx 1.8 in Microsoft Excel. The data were presented graphically and showed a significant upregulation of the relevant genes during transport as well as three weeks after transport. The significance was determined by performing a t-test. The upregulation shows that there has been a physiological response in the fish as a result of the transport. Further research on the functions of the relevant genes in fish is recommended, in order to gain a better understanding of how the physiological response affects the fish.

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>I</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>1.0 INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
1.1 PROBLEMSTILLING .....	2
1.2 ORDLISTE .....	2
<b>2.0 TEORI</b> .....	<b>4</b>
2.1 LAKSENS LIVSSYKLUS.....	4
2.2 BRØNNBÅT OG TRANSPORT .....	4
2.3 MILJØFAKTORER - YTRE PÅVIRKNINGER SOM FØRER TIL FYSIOLOGISKE RESPONSER I FISKEN .....	5
2.4 MUKUS OG MUCIN.....	7
2.4.1 Sekrerte og membranbundne muciner .....	7
2.4.2 Mukus sine funksjoner i fisk generelt .....	9
2.5 GENEKSPRESJON OG STRESSRESPONS .....	9
2.6 MÅLGENER .....	10
2.6.1 <i>muc5</i> .....	10
2.6.2 <i>muc18</i> .....	11
2.6.3 <i>il4/13a</i> .....	11
2.6.4 <i>actb</i> .....	12
2.7 GENEKSPRESJONSANALYSE.....	13
2.8 KVALITETSKONTROLLER GENEKSPRESJON.....	14
2.8.1 <i>Qubit</i> .....	14
2.8.2 <i>ROX</i> .....	14
2.8.3 <i>NTC</i> .....	14
2.8.4 <i>Smeltepunktsanalyse</i> .....	14
2.9 STATISTIKK .....	15
<b>3.0 METODER</b> .....	<b>17</b>
3.1 MATERIALE/FORSØKSDESIGN.....	17
3.2 RNA-ISOLERING .....	17
3.3 cDNA SYNTSE OG KONSENTRASJONSBESTEMMELSE.....	18
3.4 RT-QPCR .....	18
3.5 DATAANALYSE .....	19
<b>4.0 RESULTAT</b> .....	<b>20</b>

<b>5.0 DISKUSJON .....</b>	<b>25</b>
5.1 ANALYSE AV GENEKSPRESJON .....	25
5.1.1 <i>muc18</i> og <i>muc5</i> .....	25
5.1.2 <i>il4/13a</i> .....	27
5.2 KRITISKE PUNKTER .....	28
5.3 VIDERE FORSKNING .....	29
<b>6.0 KONKLUSJON .....</b>	<b>30</b>
<b>LITTERATURLISTE .....</b>	<b>31</b>
<b>A.0 VEDLEGG .....</b>	<b>37</b>
A.1 PROSEDYRER.....	37
A.1.1 <i>cDNA</i> .....	37
A.1.2 <i>Qubit på cDNA</i> .....	37
A.1.3 <i>RT-qPCR - Fortynninger</i> .....	38
A.1.4 <i>RT-qPCR</i> .....	39
A.2 KONSENTRASJON AV CDNA.....	40
A.3 OPPSETT PÅ PLATE .....	41
A.4 RÅDATA FRA ARIAMX .....	48
A.5 BEREGNING AV RÅDATA.....	56
A.6 T-TEST .....	57

## 1.0 Innledning

Fiskeoppdrett er en svært viktig næring for Norge, og Norge er verdens største eksportør av oppdrettslaks. I 2020 ble det solgt nesten 1,4 millioner tonn norsk oppdrettslaks (1). År etter år viser fiskehelse rapporten at forholdene til oppdrettsfisk i Norge ikke er god nok. I 2021 døde over 110 millioner fisk i oppdrettsnæringen (2). Dette er tall som er altfor høye, både med tanke på fiskens velferd og med tanke på bærekraft. En indikator på fiskevelferd er fysiologiske responser i fisken som kommer av at fisken utsettes for ulike stressorer. De vanligste stressorene er forandring i vannkvalitet og infeksjon av patogener, og det skal i denne studien ses på i hvor stor grad transport påvirker atlantisk laks (*Salmo salar*) fysiologisk (3). Med transport menes det i denne studien transport i brønnbåt fra settefiskanlegg på land til oppdrettsanlegg i sjø. Prøvene ble tatt ved ulike tidspunkt, som her refereres til som før (B), under (S) og tre uker etter (S3) transport.

I møte med stressorer, er mukus en viktig del av førstelinjeforsvaret (2). Mukus kler de store gjelleoverflatene, som står for respirasjon og andre viktige funksjoner (4). Gjellene utsettes konstant for fiskens ytre miljø, og mukus er dermed viktig for å hindre patogener i å trenge inn i fisken (3). Ved utsettelse for stressorer vil immunsystemet svekkes, og fisken vil videre bli mer mottakelig for sykdom (5). Som et svar på denne svekkelsen, produserer begercellene i gjellene mer mukus (6). Grunnet gjellenes viktige funksjoner, sier tilstanden til gjellene mye om fiskens helse, og dette kan brukes videre for å si noe om fiskens velferd.

Mucin er en gruppe proteiner som er viktig i mukus (7). Muciner deles i sekreerte og membranbundne, og i denne oppgaven skal det ses på genet for ett sekreert mucin, *mucin5* (*muc5*), og genet for ett membranbundet mucin, *mucin18* (*muc18*) (8, 9). Videre i oppgaven omtales alle gen i fisk med små bokstaver og i kursiv, mens alle proteiner i fisk omtales med stor forbokstav og ikke i kursiv. Et unntak er IL4/13a som i denne oppgaven omtales med store bokstaver når det er snakk om proteinet. Hos mennesker omtales både protein og gen med kun store bokstaver, men gen skrives i kursiv i tillegg til store bokstaver. Muc5 regulerer mukusproduksjon og har en viktig rolle i gjeller hos fisk (10). Muc18 er et viktig kommunikasjon- og adhesjonsmolekyl, samt at det har proinflammatoriske egenskaper (11). I tillegg til disse mucinene ses det på *interleukin 4/13a* (*il4/13a*). IL4/13a er et cytokin som regulerer ulike immunologiske og antiinflammatoriske prosesser (12, 13). For å se på genespresjon av disse genene ble det benyttet komplementær deoksyribonukleinsyre

(cDNA)-syntese og kvantitativ (real time) polymerasekjedereaksjon (qPCR)-analyse. I denne studien ble *beta-actin (actb)* benyttet som normaliseringsgen, og ved hjelp av relativ genekspresjon kan man se om det har skjedd en oppregulering eller nedregulering av de aktuelle genene, eller om ekspresjonen har holdt seg stabil.

## 1.1 Problemstilling

I denne studien ser man på stressresponsene som forekommer ved transport av atlantisk laks fra settefiskanlegg med ferskvann til oppdrettsanlegg i sjø. Overgangen fra et kontrollert miljø på land til et miljø med mange ulike stressfaktorer i havet har vist seg å være vanskelig å forutsi. Det er derfor ønskelig å identifisere faktorer som kan påvirke stressnivået og justere på disse. Nyere studier har vist at genekspresjon er en god markør for å vurdere stressnivået, da ekspresjon av messenger ribonukleinsyre (mRNA) gir en indikasjon på tilstanden til cellene etter påført stress (14). I denne studien ses det på smolter før transport, og post-smolter under transport og tre uker etter at de har blitt transportert fra settefiskanleggene til oppdrettsanleggene i saltvann. Det blir i denne studien sett på antatte stressrelaterte gener tatt fra laksens gjellevev.

## 1.2 Ordliste

AGD – amøbegjellesykdom

cDNA – komplementær deoksyribonukleinsyre

Cq – kvantifiseringssyklus

Ct – syklus terskelverdi

DNA – deoksyribonukleinsyre

dNTP – deoksyribonukleotid trifosfat

dsDNA – dobbeltrådet deoksyribonukleinsyre

Duktus – kanal for sekresjon

ER – endoplasmatisk retikulum

*efl1a* – *elongeringsfaktor-1-alfa*

GC – guanin-cytosin

*il4/13a* – *interleukin 4/13a*

MAP-kinase – mitogen aktivert protein kinase

mRNA – messenger ribonukleinsyre

*muc5* – *mucin5*

*muc18* – *mucin18*

NF- $\kappa$ B – nukleær faktor kappa B

N-glykolysering – glykolysering av N-terminal ende

NTC – no template control

O-glykoproteinfamilie – oligoglykoproteinfamilie

PCR – polymerasekjedereaksjon

qPCR – kvantitativ (real time) polymerasekjedereaksjon

RNA – ribonukleinsyre

ROX – carboxyrhodamine

RT-PCR – revers transkriptase polymerasekjedereaksjon

RT-qPCR – revers transkriptase kvantitativ (real time) polymerasekjedereaksjon

*Salmo Salar* – atlantisk laks

ssDNA – enkelttrådet deoksyribonukleinsyre

Th2 – T-hjelpercelle 2

T<sub>m</sub> – smeltepunktstemperatur

TNF- $\alpha$  – tumornekrosefaktor-alfa

TR-områder – tandem repeat-områder



## 2.0 Teori

### 2.1 Laksens livssyklus

Atlantisk laks er en anadrom organisme, og har stadier i livssyklusen hvor den lever i ferskvann og andre stadier hvor den lever i saltvann (15). Laks svømmer opp i elven for å gyte, og legger egg i elvegrusen. Her vokser yngelen til den er klar for å komme opp fra grusen som fritt svømmende parr. Her befinner parren seg i ett til fem år, basert på elvetemperatur og næringstilgang, før den svømmer over til saltvann gjennom fjordene. Rett før overgangen fra ferskvann til saltvann gjennomgår laksen en rekke fysiologiske endringer som gjør at den tilpasses et liv i saltvann, kalt smoltifisering (16). Gjellene og leveren vil i smoltifiseringen gjennomgå ulike forandringer, og smoltene vil kunne filtrere både ferskvann og saltvann (17).

I settefiskanlegg produseres rogn og parr til smoltifisering og post-smolt som videre skal overføres til oppdrettsanlegg i sjø (18). Fiskeoppdrett deles opp i tre hovedfaser som baserer seg på fiskens livssyklus, hvor den første fasen innebærer at fiskene blir kjønnsmodne (19). I denne stamfiskproduksjonen skjer det en kunstig befruktning av hunnfiskens rogn (20). Når befruktet rogn etter hvert klekkes, starter yngelfasen som kalles settefiskproduksjon. Her skal fisken vokse og utvikle seg til å tåle et liv i saltvann (19). Fisken går de første 8-18 månedene gjennom flere ulike utviklingstrinn, hvor det siste trinnet er smoltifisering, slik som i den naturlige livssyklusen (19, 21). Gjennom smoltifiseringen holdes oppdrettslaksen i et miljø med 50% saltvann og 50% ferskvann. Dette skal gjenspeile den naturlige vandringen laksen gjennomgår fra elv til sjø (14). Når laksen er ankommet oppdrettsanlegget skal den føres opp til rundt tre til seks kilogram slik at den blir stor nok til å selges (19, 21) Dette tar normalt 12-18 måneder og avhenger av blant annet vanntemperatur og næringstilgang (21).

### 2.2 Brønnbåt og transport

Når fisken er klar for å overføres til sjø som post-smolt, pumpes den fra settefiskanleggene og over i brønnbåter, for å videre transporteres til oppdrettsanleggene i sjøen. I disse prosessene er det viktig å sikre at temperaturen holdes optimal for laksen, slik at endring i temperatur ikke blir en tilleggsfaktor for stress. Stress blir i denne studien definert som ytre påvirkninger som fører til fysiologiske responser i fisken. Post-smoltene vil i oppdrettsanleggene få den næringen og ha de vilkårene for vekst som er nødvendig, slik at de kan utvikle seg til moden laks (14). Når smoltene er i settefiskanleggene, lever de i et kontrollert miljø uten utsettelse

for betydelige mengder stressorer. Når de blir transportert er det observert at de får en fysiologisk respons, og når transporten er ferdig slippes de ut i sjø, hvor forholdene er ukontrollerte. Dette gjør at fisken utsettes for flere stressorer i oppdrettsanleggene enn i settefiskanleggene (22).

### 2.3 Miljøfaktorer - ytre påvirkninger som fører til fysiologiske responser i fisken

Konstant kontakt med vannmiljøet gjør at fisk er svært sårbar for endringer i miljøet. Vilt i naturen utsettes fisk for ulike miljøfaktorer gjennom hele livsløpet. Endringer i miljøet over lengre perioder kan føre til at fisken gjennomgår fenotypiske og fysiologiske forandringer.

Oppdrettsfisk er avhengige av kontrollerte forhold for at de skal kunne vokse og overleve på en gunstig måte (23). Stress kan føre til dårligere vekst og økt dødelighet, samt svekket evne til å reprodusere (24). Dersom oppdrettsfisk over tid utsettes for stress, vil dette føre til et svakere immunsystem og dermed også gjøre dem mer mottagelig for sykdom (5). Andre vanlige faktorer som kan føre til stress og økt dødelighet i oppdrettsnæringen, i tillegg til dårlige miljøforhold, er infeksjonssykdommer, skader og fraværende fysiologisk tilpasning. Mange fisk på liten plass i oppdrettsanlegg gjør at sykdom lettere spres mellom individer, fordi fisken her ofte er mer stresset enn fisk som lever vilt under naturlige forhold (2).

Sykdom kan forårsakes av blant annet marine parasitter og bakterier (25). Hud, gjeller og gastrointestine regioner er områder som er spesielt utsatt for sykdom, da de vender ut mot det ytre miljøet (3). Derfor har de begerceller som skiller ut mukus (26). Studier har vist at antall mukusekreserende celler gjenspeiler helsen og tilstanden til vevene de utgjør. Et forsøk av Sveen et al. (2017) viste at utsettelse for stressorer som redusert pH, høye konsentrasjoner av nitrat og lave konsentrasjoner av O<sub>2</sub>, utsettelse for aluminium, tilstedeværelse av patogener og eksotoksiner, samt forandringer i vannkvalitet, førte til at fiskene hadde flere mukusproduserende celler i gjellene (3).

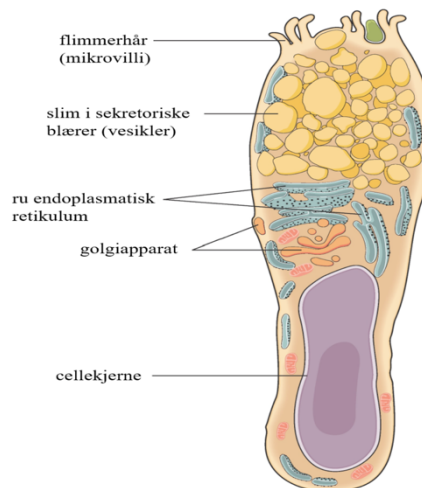
Gjeller er fiskens respirasjonssystem, og med sin store overflate har de mye kontakt med miljøet rundt. Gjellene er en skjør struktur, og har en stor betydning for fiskens fysiologiske helse. Gjellene har også en funksjon i immunforsvaret ved at de har ansamlinger av lymfoide vev ved basis av gjellefilamentene. Disse ansamlingene regnes som et eget immunorgan. I tillegg til det lymfoide vevet finnes det spredte immunceller og immunkomponenter i gjellenes begerceller. Et tynt cellelag danner en barriere som skiller gjellene fra omgivelsene. Dette utgjør en del av førstelinjeforsvaret i immunsystemet. På grunn av nær kontakt med

vannmiljøet er gjellene utsatt for skader, sykdomsfremkallende organismer, dårlig vannkvalitet og andre miljøpåvirkninger. Både små og store skader på gjellevev kan føre til redusert respirasjon og nedsatt stresshåndtering, men samtidig er det fortsatt mye ukjent om gjellehelsen til laks i oppdrett (2).

Gjellene hos laks er bygget opp av fire buer med gjelleapparat på hver sin side foran svelget. Dette gir fem gjellespalter som beskyttes av gjellelokk. Vann vil passere fra munn over i gjellene og til slutt ut under gjellelokket. Hver gjellebue har utvekster som kalles for gjellefilamenter som igjen består av lameller, og det er her respirasjonen foregår, se *Figur 2.1A*. Når blodet strømmer gjennom gjellelamellene i motsatt retning av vann skjer det en oksygenering av blodet som kalles for motstrømsutveksling, noe som fører til en svært effektiv gassutveksling. Gjellene har mange viktige funksjoner i tillegg til respirasjon. De har en stor rolle i utskillelse av nitrogenholdige avfallsstoffer, osmoregulering, omsetning av hormoner og syre-basebalansen (27). Mukus spiller en viktig rolle i reguleringen av disse prosessene, og derfor skiller gjellene ut mukus (4).



Gjellelokk  
Gjellebue med mange filamenter



flimmerhår (mikrovilli)

slim i sekretoriske blærer (vesikler)

ru endoplasmatisk retikulum

golgiapparat

cellekjerne

**A**

**B**

*Figur 2.1: (A) Gjeller hos fisk (28). Figuren viser gjellebuenes utvekster i form av gjellefilamenter og hvordan de beskyttes av gjellelokket. Respirasjonen foregår i filamentenes lameller. De åpne gjellene er i direkte kontakt med det ytre miljøet og dermed utsatt for skade og patogener (27). Ulike celler i gjellene skiller ut mukus for å danne en kjemisk og fysisk barriere mot potensielle farer i det ytre miljøet (6). Bildet er hentet fra NDLAs fagartikkel «Gassutveksling i vann» (28). (B) Begercelle (29). Illustrasjonen viser oppbygningen til en begercelle som skiller ut mukus. Nederst i figuren befinner cellekjernen med DNA seg. Transkriberte mRNA-sekvenser, blant annet for det sekrede mucinet muc5, blir så fraktet til ribosomene, hvor mRNA blir translatert, før det blir fraktet til golgiapparatet hvor det blir pakket i vesikler. Vesiklene legger seg under den apikale*

membranen på begercellen og venter på et ekstracellulært før den blir sekret ut i det ekstracellulære miljøet (26). Illustrasjonen er hentet fra «Begerceller» på Store norske leksikon (29).

## 2.4 Mukus og mucin

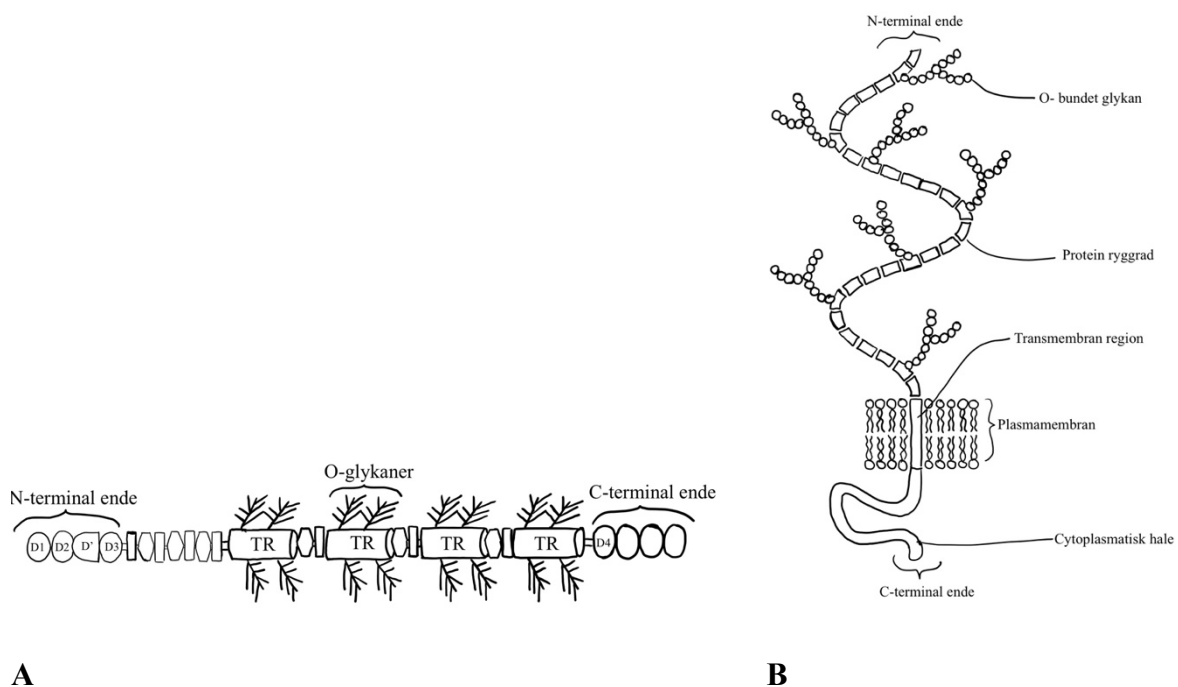
Mucus er et viskøst slim med ulike biokjemiske funksjoner som hovedsakelig skiller ut av begerceller, men også av andre sekretoriske og ikke-sekretoriske celler, i hud, gjeller og gastrointestine regioner, da disse områdene er spesielt utsatt for sykdom (3, 10). Mucus inneholder vann (95%), salter, ioner, lipider (fettsyrer, fosfolipider og kolesterol), proteiner som mucin og lysosym, immunoglobuliner, defensiner, vekstfaktorer og trefoil faktorer (30, 31). Mucus har som funksjon å sørge for å danne både en kjemisk og fysisk barriere mot patogener. Den fysiske barrieren vil altså være å fysisk hindre patogener i å trenge inn gjennom de epidermale celledagene på fisken, mens den kjemiske barrieren består av ulike katalytiske enzymer, peptider og andre makromolekyler, som for eksempel antimikrobielle proteiner. Produksjon og sammensetning av mucus kan påvirkes av stress. Sammensetningen er avgjørende for at de funksjonene som mucus har, tilpasses de forholdene som fisken utsettes for. Stressende forhold gjør fisken mer mottakelig for patogener, men tidligere studier har vist at stress fører til en økning i mukusseksjon slik at patogener blir fysisk hindret i å trenge inn i fisken (6). Sekrering av mucus fra begercellene skjer ved regulert eksocytose. Mucus blir pakket i vesikler inne i golgiapparatet, og venter på et ekstracellulært signal, for eksempel inflammatoriske cytokiner som interleukiner. Slike signaler signaliserer at mucus skal bli sekret ut i det ekstracellulære miljøet, se *Figur 2.1B* (26).

En viktig bestanddel i mucus er mucin, som er en gruppe glykoproteiner i oligo (O)-glykoproteinfamilien (7). Det er mucin som gjør at mucus får sine viskøse og gelaktige egenskaper. Disse egenskapene er viktige for å få dannet den fysiske barrieren som gjør det vanskeligere for mikroorganismer å trenge inn gjennom epiteloverflatene. Mønsteret på mucinenes glykosylering gir mucinene sine spesifikke biokjemiske og biofysiske egenskaper. Disse egenskapene er viktig når det kommer til blant annet celledhesjon under metastase, regulering av immunologiske responser, samt endring av egenskapene til proteiner som interagerer med karbohydrat på mucinproteinet (32).

### 2.4.1 Sekretede og membranbundne muciner

Mucin finnes både som sekretede molekyler og på membranbundet form. De sekretede mucinene kan bli subklassifisert som store geldannende og små løselige muciner (8). Sekretede

muciner danner store nettverk med hverandre gjennom disulfidbindinger mellom subenheter i molekylene, og er viktige når det kommer til beskyttelse mot mikroorganismer (8, 33). Dannelsen av nettverket starter med N-glykosylering etterfulgt av dimerisering i endoplasmatisk retikulum (ER). Videre vil multimeriseringen skje ved interkjede disulfidbindinger mellom disse disulfidbundne dimerne gjennom D-domener i mucin. Sekretede muciner består av tre til fire D-domener som er rike på disulfid og som alle er N-glykosylert, se *Figur 2.2A* (34). Membranbundne muciner er transmembrane og blir hovedsakelig uttrykt i epitelceller i kjertler og ductus. De membranbundne mucinene består av et enkelt membranspennende segment i tillegg til en cytoplasmatisk hale og et relativt stort ekstracellulært domene, se *Figur 2.2B*. Sentralt lokalisert på både sekretede og membranbunde muciner finnes tandem repeat (TR)-områder. Hos membranbundne muciner er det disse områdene som skiller dem fra andre membranbundne glykoproteiner, hvor slike TR-områder gjerne er mindre sentralt lokalisert (32). I motsetning til de sekretede mucinene som danner store nettverk, finnes de membranbundne mucinene som monomerer, altså er de ikke geldannende (35). De membranbundne mucinene er viktige når det kommer til intercellulære interaksjoner, celle-matrisinteraksjoner, celledisignalisering samt endring av kreftcellers biologiske egenskaper (7).



**A** **B**  
*Figur 2.2: (A) Structure of a secreted mucin. Schematic representation of a secreted mucin (36). Illustrasjonen viser oppbygningen til MUC5B, som et eksempel på oppbygningen til et sekretert mucin. I likhet med membranbundne muciner, har sekretede muciner også karbohydratkjeder langs proteinet. TR-områdene er*

symbolisert med «TR». Illustrasjonen har tatt utgangspunkt i «Mucins and their receptors in chronic lung disease» fra PubMed (36). **(B)** Structure of MUC1 Mucin (37). Illustrasjonen viser eksempel på oppbygning av et membranbundet mucin. På figuren er MUC1, som ikke blir omtalt i denne oppgaven, illustrert, men MUC18 antas å ha en lignende oppbygning (38). Den C-terminale enden befinner seg inne i cytoplasma, mens den N-terminale enden er ekstracellulær. Det er bundet karbohydratkjeder langs proteinets rygggrad, som gjør mucinet til et glykoprotein. TR-områdene er ikke illustrert, men er lokalisert langs proteinets rygggrad. Illustrasjonen har tatt utgangspunkt i «MUC1 Mucin: A Putative Regulatory (Checkpoint) Molecule of T cells» fra PubMed (37).

#### 2.4.2 Mukus sine funksjoner i fisk generelt

Mucus er tenkt å ha flere viktige funksjoner hos fisk når det kommer til osmoregulering, ioneregulering, syre-basebalansen samt respirasjon og ekskresjon av nitrogenholdige avfallsstoffer (4). I tillegg er mucus en viktig del av førstelinjeforsvaret i immunsystemet, da slimlaget fungerer som en barriere som hindrer patogener i å trenge inn i fisken (2, 23). Tidligere studier referert til av Shepard (1994) har vist at mucus bidrar til å hindre vann i å absorberes inn i fisken i ferskvann, og hindrer vann i å trenge ut i saltvann. Disse studiene ser på fisk som har fått mucus fjernet, og da det er usikkert om også andre komponenter er fjernet, vil det videre være usikkerhet rundt om mucus alene har denne funksjonen hos fisken (4). Under transport og andre ytre påvirkninger kan det oppstå skader som kan fjerne eller skade mukuslaget slik at det vil fungere mindre effektivt. Fjerning av og skade på mukuslaget kan videre føre til at saltvannsfisk blir dehydrert mens ferskvannsfisk tar opp for mye vann (39). Mucus fungerer som en svakt negativt ladd ionebytter, noe som kan føre til et enklere opptak av natrium i gjellene (4, 40). Dette kan forklares ved at glykoproteinene i mucus er sure ved nøytral pH. Noe som støtter at mucus har en viktig funksjon i ionereguleringen, er antall begerceller på fiskens overflate som minker når saliniteten øker. Mucus på gjellene er også antatt å påvirke respirasjonen, da overflod av mucus fører til at vann ikke strømmer like lett gjennom gjellene, i tillegg til at det hindrer diffusjon av O<sub>2</sub> til overflaten av gjellene. Så vidt vi vet er det ikke publisert nok studier som kan støtte at mucus faktisk har disse funksjonene hos fisk, da det i disse forsøkene kun brukes isolert mucus. Det er derfor vanskelig å se en sammenheng med hvordan det er *in vivo*. All informasjon om funksjonen til mucus kan legge grunnlag for videre forskning (4).

#### 2.5 Genekspresjon og stressrespons

Genekspresjon er at informasjonen i gener kommer til uttrykk slik at en celle får sine egenskaper og funksjoner (41). Genekspresjon avhenger av cellenes behov og cellen vil

produsere de molekylene den trenger ved å lese av deoksyribonukleinsyre (DNA). Når et gen skal uttrykkes må det gjennom følgende trinn; genaktivering, transkripsjon, prosessering av ribonukleinsyre (RNA) og proteinprosessering. Mengden gen som uttrykkes til enhver tid reguleres av ulike mekanismer, blant annet av transkripsjonsfaktorer og RNA-modifisering. Genregulering på transkripsjonsnivå kontrollerer hvor ofte og til hvilken tid ulike gener transkriberes, altså om det skal skje genekspressjon av dette genet eller ikke.

Transkripsjonsregulatorer er proteiner som gjenkjenner ulike regulatoriske DNA-sekvenser, og bindes til denne sekvensen slik at transkripsjonen enten blir fremmet eller hemmet (26).

De proteinene som hemmer transkripsjonen kalles for repressorproteiner, mens de som fremmer transkripsjonen kalles aktivator (42).

Stressresponsen hos fisk består av adferdsendringer og fysiologiske endringer på ulike nivåer involvert i en kompleks kaskade. I den primære responsen frigjøres kortikosteroider, som kortisol, og katekolaminer. Den sekundære responsen involverer endringer i metabolismen, og den tertiære responsen karakteriseres av endringer i adferd. Stressresponsen som settes i gang gjør fisken mer motstandsdyktig mot den aktuelle stressoren (43).

## 2.6 Målgener

### 2.6.1 *muc5*

En viktig gruppe av muciner i gjellelev er Muc5. Muc5 inngår i subklassen store geldannende muciner (30). Reguleringen av uttrykkningen av *muc5* skjer med mitogen aktiverte protein kinaser (MAP-kinaser), nukleær faktor kappa-B (NF- $\kappa$ B), og gjennom epidermal vekstfaktorreseptor signalveier. Molekyler som stimulerer til ekspresjon av *muc5ac* er blant annet inflammatoriske cytokiner som tumornekrosefaktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) og ulike interleukiner, bakterieprodukter og miljøforurensninger (3). Det har blitt funnet syv ulike sekreterende mucingener i atlantisk laks, hvor fem av dem klassifiseres som *muc5*, mens to av dem klassifiseres som *muc2*. Innenfor *muc5* finner man *muc5ac.1*, *muc5ac.2*, *muc5ac.3*, *muc5ac.4* og *muc5b* som hovedsakelig finnes i gjeller, skinn og pylorus blindsekkene. Det er gjort forsøk som har vist mucins funksjoner når det kommer til stresspåvirkning, blant annet kan det se ut som Muc5 er viktig når det kommer til regulering av mukusproduksjon (25). *muc5* viste seg i et forsøk å være de genene i gjellene som ble transkribert i størst grad (3). For å kunne bruke disse genene som biomarkører i fisk på lik måte som hos mennesker, trengs det mer forskning rundt dette (25). Tidligere forsøk utført av Sveen et al. (2017) har



kommet frem til at noen mucingener, blant annet *muc5b* og *muc5ac2/4*, kan benyttes som biomarkører som er spesifikke for vev for å se på fiskens stresshåndtering. Forsøket deres har også vist at *muc5ac*-ekspresjonen økte i gjeller etter en stressreaksjon (3). Forsøk har vist at Muc5 spiller en viktig rolle i de respiratoriske veiene til fisk, i likhet med pattedyr. Dette ble vist i et forsøk hvor ekspresjonen av *muc5* ble redusert etter at amøbegjellesykdom (AGD)-infiserte fisk fikk ferskvannsbehandling (25).

### 2.6.2 *muc18*

Muc18 er et membranbundet mucin også omtalt som melanom celleadhesjonsmolekyl fordi det har vist seg at dette mucinet er viktig for utviklingen av metastasering av blant annet kreft av typen melanoma. Muc18 er viktig i intercellulær kommunikasjon og –adhesjon, samt cellemigrasjon (9, 25). Endret uttrykk av genet kan derfor påvirke cellens bevegelse og invasivitet. Når det kommer til adhesjon er dette spesielt relevant i gjeller og skinn hos fisk, da dette er områder som er i direkte kontakt med strømninger i vannet (38). Proteinet tilhører immunoglobulin superfamilien, men det er omdiskutert om Muc18 skal være en del av mucinfamilien da det skiller seg fra andre muciner ved at den ikke har de karakteristiske TR-områdene (25, 44). MUC18 er viktig i de respiratoriske veiene hos mennesker, da det blant annet er sett en økt ekspresjon i makrofagene i alveolene hos astmapasienter. Forsøk har vist at MUC18 hos mennesker med bakterielle infeksjoner i lungene promoterer proinflammatoriske responser, og dermed er viktig i forsvaret mot infeksjoner (11). IL13 og andre T-hjelpercelle 2 (Th2)-cytokiner stimulerer til ekspresjon av MUC18 hos mennesker, men utover dette er regulering av MUC18 lite undersøkt. I likhet med hos mennesker vet man lite om *muc18* hos fisk. Tidligere studier gjort av Pérez-Sánchez et al. (2013) har likevel vist at Muc18 var det mest fremtredende mucinet i gjeller og skinn, selv om det uttrykkes i alle organer i fisken (38). Funksjonen til Muc18 i gjeller er fortsatt uvisst, og det trengs videre forskning rundt dette.

### 2.6.3 *il4/13a*

Interleukiner er en type cytokiner, og skilles blant annet ut av ulike celler som er en del av det adaptive immunforsvaret. Cytokiner er løselige proteiner som skilles ut som følge av at vevet utsettes for patogener og ulike antigener. Ulike cytokiner har ulike funksjoner, men hovedfunksjonen deres er at de fører til, og regulerer ulike immunologiske og inflammatoriske responser. Interleukiner skilles ut hovedsakelig av leukocytter, men også av



en rekke andre kroppsceller for å påvirke vekst, differensiering og aktivering under inflammatoriske responser og immunresponser (12). Ulike interleukiner har ulike spesifikke oppgaver i immunforsvaret, men alle utøver sin effekt ved å binde til spesifikke overflatereseptorer i membranen på celler (45). De fleste interleukiner har parakrin eller autokrin virkning, men noen kan også gå ut i blodstrømmen og virke endokrint (12, 46).

IL4 og IL13 blir begge produsert av Th2-celler som en reaksjon på allergener og patogener (47). IL4/13a ligner på både IL4 og IL13, og har blitt funnet i fisk (48). IL4/13a har vist seg å inducere proliferasjon av B-celler i fisk, i tillegg til differensiering av B-lymfocytter. Rapporter har vist at disse egenskapene er liknende for mennesker og fisk (49). Begge disse interleukinene inducerer *muc5* genekspressjon i luftveier. Forsøk har vist at IL4 inducerer *muc5* ekspressjon hos mus, mens IL13 inducerer ekspressjon av *MUC5* hos mennesker (50, 51). IL4 sine hovedoppgaver går på regulering av antistoffproduksjon, hematopoese og inflammasjon, i tillegg til utvikling av T-cellenes effektoregenskaper (52). Når IL4 bindes til reseptorer i membranen i T-cellene, vil det føre til produksjon av transkripsjonsfaktorer, som igjen fører til mer produksjon av IL4 (45). IL13 skiller fra IL4 ved at det har andre viktige funksjoner. Forsøk har vist at IL13 stimulerer til økt produksjon av begerceller og økt ekspressjon av *muc5AC* og eventuelt *muc5B* (25, 51). Et forsøk utført av Takizawa et al. (2011) viste at *il4/13a* ble mest uttrykt i thymus, gjeller og skinn hos salmonoider (53). Både IL4 og IL13 har antiinflammatoriske egenskaper (13).

Tabell 2.1: Oversikt over målgenene analysert i denne studien, og hovedfunksjonene til proteinene de koder for.

Gen	Protein	Hovedfunksjoner
<i>muc5</i>	Mucin5	Regulerer mukusproduksjon og mukusviskositet (9).
<i>muc18</i>	Mucin18	Hos mennesker: Celleadhesjon. Intercellulær kommunikasjon, cellemigrasjon, proinflammatorisk (10).
<i>il4/13a</i>	Interleukin 4/13a	Antiinflammatorisk. Regulerer ulike immunologiske og antiinflammatoriske prosesser (11, 12).

#### 2.6.4 *actb*

*Actb* er til stede i alle celler og spiller en viktig rolle i essensielle prosesser som prosessering av mRNA og transkripsjon, men også for å opprettholde cellemobilitet og celleform. Disse basale funksjonene til proteinet gjør at ekspressjonen av *actb* ikke blir påvirket av stresset som er påført. I tillegg er genet lite endret gjennom evolusjonen. Alle disse egenskapene gjør at

det egner seg som et normaliseringsgen (54). Normaliseringsgener er gener som blir lite påvirket av ytre miljøfaktorer, og som dermed uttrykkes jevnt i cellene. Det finnes flere ulike normaliseringsgener, men det som er felles mellom dem er at de ofte er essensielle for metabolisme og andre grunnleggende funksjoner i cellen. For å kunne validere at qPCR gir riktige resultater, benyttes slike normaliseringsgener ved å kontrollere at disse uttrykkes likt i alle prøvene. Normaliseringsgen brukes som intern standard for å kvantifisere absolutt og relativ genekspressjon gjennom statistiske beregninger. Selv om genekspressjonen i normaliseringsgener er konstant i cellen, kan ekspressjonen fortsatt variere ved noen typer forhold, og gi et feilaktig resultat. Det er derfor viktig å utføre analyser for å finne det normaliseringsgenet som er best egnet for det forsøket som skal utføres (55).

## 2.7 Genekspressjonsanalyse

For genekspressjonsanalyse ved bruk av to-trinns revers transkriptase kvantitativ (real time) polymerasekjedereaksjon (RT-qPCR), blir enzymet revers transkriptase benyttet for å omdanne mRNA til cDNA, før cDNA videre blir amplifisert. Revers transkriptase vil sammen med primere og deoksyribonukleotid trifosfater (dNTP-er) danne den komplementære cDNA-tråden, som gir et ustabil kompleks av RNA-templat og cDNA. RNA-tråden vil brytes ned, og det dannes dobbeltrådet deoksyribonukleinsyre (dsDNA) ved hjelp av polymerase og dNTP-er. Dette cDNA-et amplifiseres videre ved hjelp av qPCR (56).

Kvantifiseringen av målgen ved bruk av qPCR baserer seg på å måle emittert lys i form av fluorescens som følge av binding av fargestoff til dsDNA. SYBR Green er et mye brukt fargestoff i qPCR-analyser, som binder seg til alt dsDNA. SYBR Green bindes også til primer-dimere og uspesifikke DNA-sekvenser. Dette tas høyde for ved å utføre en smeltepunktsanalyse. Denne analysen utføres etter at amplifiseringen er ferdig. Ulike amplikonsekvenser vil ha ulike temperaturer hvor de smelter, og dermed vil det dannes flere topper under smeltepunktsanalysen dersom man har flere ulike amplikon i PCR-produktet. Dette vil være et tegn på at amplifiseringen ikke har vært spesifikk nok, eller at prøven har blitt kontaminert (57). Ved å benytte seg av SYBR Green i qPCR sørges det for et mer nøyaktig resultat, på kortere tid, fra mindre prøvemateriale (58).

## 2.8 Kvalitetskontroller genekspresjon

### 2.8.1 Qubit

Qubit er et lite fluorometer som brukes for å bestemme konsentrasjon av blant annet nukleinsyrer. Det brukes et fargestoff som bindes spesifikt til RNA, DNA eller protein, avhengig av hva som skal analyseres. Når bindingen skjer, vil fargestoffet fluorescere, og Qubit måler automatisk denne fluorescensen. Qubit er en sensitiv metode som egner seg når det skal måles svært lave konsentrasjoner. I tillegg er metoden automatisert, noe som gjør den effektiv (59).

### 2.8.2 ROX

Carboxyrhodamine (ROX) er et passivt fluorescerende fargestoff som kan brukes dersom qPCR-maskinen er kompatibel med fargestoffet. For at et qPCR-instrument skal være kompatibelt med ROX, må det ha en ROX-kanal (60). Da ROX er passivt kan man tilsette det til mastermiksen uten at dets fluorescerende signal påvirkes av PCR reaksjonene, og det vil dermed forbli stabilt under hele reaksjonen. Dette betyr at signalet som detekteres ikke blir proporsjonalt med mengden templat slik som ved bruk av SYBR Green. Hensikten er å normalisere signalet, noe som vil kunne redusere variansen mellom parallellene. ROX sørger for å korrigere volumforskjeller mellom brønner, som kommer av små unøyaktigheter ved pipettering og fluorescensfluktueringer (61). ROX vil på flere måter dermed sørge for å kvalitetssikre resultatet.

### 2.8.3 NTC

No template control (NTC) er satt opp på samme måte som prøvene, men de inneholder ikke cDNA-templat. Bruk av NTC i RT-PCR vil sikre at de signalene som detekteres i brønnene med prøve er spesifikk for amplikonene man ser etter (62). Brønnene med NTC brukes for å detektere uspesifikk amplifisering, primer-dimere og kontamineringer. Ved bruk av SYBR Green er analysen spesielt utsatt for primer-dimere, noe som enkelt kan oppdages i NTC (63).

### 2.8.4 Smeltepunktsanalyse

Smeltepunktsanalyse utføres for å se at kun de målgenene man er ute etter å analysere er til stede i reaksjonen. Analysen utføres etter at selve PCR-reaksjonen er gjennomført, og baserer seg på prinsippet om at dsDNA vil denatureres til enkeltrådet deoksyribonukleinsyre (ssDNA) under oppvarming, noe som vil føre til tap av fluorescensintensitet. Smeltepunktet

defineres som den temperaturen hvor 50% av dsDNA har denaturert til ssDNA. Ulike målgen vil ha ulike smeltepunkt, da smeltepunkt avhenger av guanin-cytosin (GC)-innhold, lengde og baserekkefølge. Den negativt deriverte fluorescens-temperaturkurven brukes for å se om produktet er rent. Dersom man bare får en topp, betyr det at man kun har en type amplikon, noe som videre betyr at produktet er rent. Dersom man får flere topper, kan det komme av kontaminering av prøven, primer-dimere eller uspesifikke amplikon (64, 65).

## 2.9 Statistikk

Det finnes ulike metoder for å beregne relativ genekspresjon. En av dem er  $\Delta\Delta Ct$ , som brukes for å bestemme fold changes. Fold changes er et mål på hvor mye mengden gen som uttrykkes, har endret seg (66). For å beregne  $\Delta\Delta Ct$ -verdien må syklus terskelverdiene (Ct-verdiene) fra normaliseringsgenet sammenlignes med målgenets Ct-verdier. Det er også nødvendig å lage paralleller for å sikre at resultatene man får er pålitelige (67).

For å beregne  $\Delta\Delta Ct$  brukes følgende ligninger:

$$\text{Ligning 1} \quad \Delta Ct = Ct(\text{målgen}) - Ct(\text{normaliseringsgen})$$

$$\text{Ligning 2} \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{behandlet}) - \Delta Ct(\text{ubehandlet})$$

$$\text{Ligning 3} \quad \text{Fold changes} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Når fold changes skal beregnes, er det første som må gjøres å finne gjennomsnittet av Ct-verdiene mellom parallellene for hvert gen, inkludert normaliseringsgen (43). Videre finner man  $\Delta Ct$  ved å trekke Ct-verdien for normaliseringsgen fra Ct-verdien for målgenet, slik at verdiene blir normalisert (*Ligning 1*). Det må så velges en kalibrator, som ofte er den ubehandlede prøvegruppen. Den relative genekspresjonen settes da opp imot denne prøvegruppen (68).

$\Delta\Delta Ct$ -verdien blir bestemt ved å regne forskjellen mellom  $\Delta Ct$ -verdien for den behandlede prøven og den ubehandlede prøven. I dette tilfellet vil den ubehandlede prøven være prøveuttak som ble tatt før fisken ble transportert. Gjennomsnittet av Ct-verdiene for de ubehandlede prøvene blir brukt som kalibrator, og det er denne verdien som blir satt inn i

*Ligning 2.* Videre bruker man *Ligning 3* til å beregne fold changes, slik at man kan se om genekspressjonen har holdt seg stabil, eller om genet har blitt oppregulert eller nedregulert.

## 3.0 Metoder

### 3.1 Materiale/forsøksdesign

Gjellevevsprøver ble hentet ut fra oppdrettslaks ved ulike tidspunkt av sjøsettingsprosessen; før (B), under (S), tre uker etter (S3) og seks uker etter (S6). I denne bacheloren ble prøvene, med unntak av S6, videre analysert for endring av genekspressjon med  $n=12$  fisk for hvert av tidspunktene. Fiskene ble hentet fra Hjelvik Settefisk AS i Vågstranda hvor de ble klargjort for transport gjennom regulert mat- og lystilgang, samt konstant temperatur ved  $6,5^{\circ}\text{C}$ . To uker før transport ble smoltene holdt i 50% sjøvann og 50% ferskvann, og ved dette tidspunktet ble prøvene før sjøsetting tatt. Før smoltene ble transportert til sjø måtte ATPase-aktiviteten måles for å sikre at de var klare for denne transporten, samt måtte smoltene sultes før de ble overført til sjø. Post-smoltene ble pumpet over i brønnbåter og transportert til oppdrettsanlegg i Vikebukta, hvor temperaturen ble målt til  $6,4^{\circ}\text{C}$ . Hele prosessen tok seks timer, hvorav 15-20 minutter av disse timene ble brukt til selve transporten. Under pumpingen over i oppdrettsanlegget, ble de post-smoltene det skulle tas prøver fra fanget med nett. Neste gang prøver ble tatt var tre uker etterpå, og på dette tidspunktet ble vanntemperaturen målt til å være  $9,4^{\circ}\text{C}$ . Det var viktig at post-smoltene skulle leve under normale forhold uten lus og sykdom, og de vanlige rutinene skulle følges (14).

For å sikre fiskens velferd under vevsinnnsamling ble retningslinjene i direktiv 2010/63/EU fulgt, i tillegg til norsk lov. Benzoak vet. (50 mg/l, ACD Pharmaceuticals AS) ble brukt for å avlive fisken før prøvene ble uthentet. Prøvene ble hentet fra den andre gjellebuen til fisken ved bruk av sterilisert saks og tang. For å stabilisere RNA ble prøvene overført til rør som inneholdt RNAlater (cat.no AM7021, Invitrogen) før de ble oppbevart ved  $-80^{\circ}\text{C}$  (14).

### 3.2 RNA-isolering

RNeasy mini kit (cat.no. 74101, Qiagen) ble brukt i henhold til brukermanualen for å ekstrahere totalt RNA. 600  $\mu\text{l}$  buffer RLT (cat.no. 74101, Qiagen) og TissueLyser II (Qiagen) ble brukt for å lysere vev og celler for å få tilgang til RNA. TissueLyser II ble stilt inn til 2x2 minutter på 25 Hz, og det ble brukt 5 mm store beads av rustfritt stål. Degradering av DNA ble utført ved bruk av RNase-Free DNase I Set (cat.no. E1091, OMEGA Bio-tek). Kvalitetskontroll av RNA ble utført ved bruk av Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen) og Qubit RNA IQ Assay Kit (cat.no. Q33221, Invitrogen) for å undersøke om RNA var intakt (14).

### 3.3 cDNA syntese og konsentrasjonsbestemmelse

cDNA syntese ble utført på isolert RNA ved bruk av qScript cDNA Synthesis Kit (cat.no. 95047-100, Quanta Bio). Produsentens protokoll ble fulgt (vedlegg A.1.1). Det ble brukt 10 µl RNA, og det endelige volumet ble 20 µl. De resterende 10 µl skulle bestå av nukleasefritt vann, qScript RT og qScript reaksjonsmik. cDNA syntesen ble utført på Thermo Cycler (Applied Biosystems). Konsentrasjonsbestemmelse av cDNA ble utført ved bruk av Qubit 4.0 Fluorometer og Qubit 1X dsDNA HS Assay kit (cat.no. 33231, Invitrogen). Produsentens protokoll ble fulgt (vedlegg A.1.2).

### 3.4 RT-qPCR

cDNA ble fortynnet slik at konsentrasjonen lå innenfor området 400 pg/µl - 700 pg/µl (vedlegg A.1.3). Videre ble det beregnet hvor mye cDNA som måtte benyttes for å få 400 pg til qPCR-reaksjonen. qPCR-reaksjonene ble forberedt ved bruk av PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix, ROX (cat.no 95955-500, Quanta Bio), og produsentens protokoll ble fulgt, med unntak av volumanbefalingene. Her ble protokollen til den upubliserte studien av Hoem et al. fulgt (vedlegg A.1.4). Totalt volum skulle være på 15 µl, bestående av nukleasefritt vann, SYBR Green SuperMix, cDNA og primere. Alle primere ble optimalisert av Marcos-López et al., og ble hentet fra deres studie. Disse er presentert i *Tabell 3.1*. Analysen ble utført på AriaMx ved bruk av en 96-brønnsplate. Plateoppsettet for eksperimentene inkluderte tre gen, et normaliseringsgen, og negativ kontroll (NTC), se vedlegg A.3 for detaljert beskrivelse av oppsett. Alle prøvene ble analysert i duplikater. Temperaturskjema for selve amplifisering ble hentet fra upublisert manuskript som denne bacheloren er en del av, og det ble brukt standard temperaturskjema fra AriaMx for smeltepunktanalysen (vedlegg A.1.4).

*Tabell 3.1 Primere for RT-qPCR. F = forward, R = reverse. Primerne er hentet fra og bestilt inn med bakgrunn i studien gjort av Marcos-López et al. (25).*

Gen	Sekvens (5'-3')
<i>muc5</i>	(F):CCGTGCTGGGAGACATTATGAAGT; (R):TGCTGGAGAGGGAAAGGGTAAC
<i>muc18</i>	(F):AAGAGCAGCGAGGTGGTG; (R):TCCGTTGACTTGGCAGATGA
<i>il4/13a</i>	(F):GCATCGTTGTGAAGAGCCAAGA; (R):GAAGTCTCCTCAGCTCCACCT
<i>actb</i>	(F):CCATCCAGGCAGTGTGT; (R):CGGAGTCCATGACGATACC

I denne studien benyttes *actb* som normaliseringsgen. Dette er et gen som i tidligere forsøk har vist seg å være det mest stabile å bruke for atlantisk laks (25). I det pågående forskningsprosjektet som denne oppgaven er en del av, ble det utført tester som også viste at *actb* var mer stabilt enn elongeringsfaktor-1-alfa (*efl1α*), som også ble vurdert (14).

### 3.5 Dataanalyse

Aligent AriaMx 1.8 er qPCR-instrumentets software. Rådata, som Ct-verdier, eksporteres til Microsoft Excel. Standardavvik ble regnet for duplikatene. Relativ genekspresjon ble beregnet ved å bruke  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden, som beskrevet i teorien. Ved utregningen ble normaliseringsgenet *actb* brukt som en kontroll for normalisering. Prøvegruppe B ble brukt som kalibrator for prøvegruppene S og S3. For å beregne statistisk signifikans ble tosidig t-test benyttet. For t-testen ble signifikansnivået satt til 5% (vedlegg A.6).

Det ble brukt  $\log_2$  for å regne ut relativ genekspresjon. Denne logaritmiske skalaen benyttes da det blir et kortere intervall mellom hver logaritmisk økning i forhold til en annen høyere logaritmisk skala. Dette gjør den relative genekspresjonen mer brukervennlig å fremstille i boksdiagram.



## 4.0 Resultat

Resultatene er basert på RT-qPCR-analyse av genene *muc18*, *muc5*, *il4/13a* og *actb* tatt fra tre ulike tidsintervaller (B, S og S3). Det ble tatt 12 prøver fra hvert tidsintervall fordelt med seks prøver på totalt seks qPCR-plater. Hver prøve ble analysert i duplikat som presentert i vedlegg A.3. Resultatene er utarbeidet fra rådata som er presentert i vedlegg A.4.  $\Delta\Delta Ct$  ble beregnet ut ifra *Ligning 1*, *Ligning 2* og *Ligning 3*, hvor *actb* ble benyttet som normaliseringsgen.

*Tabell 4.1* viser gjennomsnittlig Ct, smeltepunktstemperatur (Tm) og  $\Delta Ct$  for hvert av genene for prøvegruppe B, samt standardavvik for Ct og Tm. *actb* viser den laveste gjennomsnittlige Ct-verdien, på 18,96, og viser også det høyeste standardavviket mellom prøvenes Ct-verdier, med et standardavvik på 3,01. Gjennomsnittlig  $\Delta Ct$  ble beregnet for alle genene med unntak av *actb*, da Ct-verdiene for *actb* ble trukket fra målgenes Ct-verdier for å beregne  $\Delta Ct$ . Gjennomsnittlig  $\Delta Ct$  for henholdsvis *muc18*, *muc5* og *il4/13a* ble beregnet til 8,21, 12,42 og 8,26. Disse verdiene ble videre brukt for å beregne  $\Delta\Delta Ct$  for prøvegruppene S og S3.

*Tabell 4.1: Tabellen viser gjennomsnittlige Ct-, Tm- og  $\Delta Ct$ -verdier for de ulike genene med tilhørende standardavvik for prøvegruppe B. Beregningene ble gjort i Microsoft Excel, og snittverdiene for  $\Delta Ct$  ble brukt videre for å beregne  $\Delta\Delta Ct$  for prøvegruppene S og S3.*

Gen	Gjennomsnitt Ct	SD Ct	Gjennomsnitt Tm	SD Tm	$\Delta Ct$ snitt
<i>muc18</i>	27,16	2,78	80,40	0,56	8,21
<i>muc5</i>	31,38	2,18	76,60	3,59	12,42
<i>il4/13a</i>	27,22	1,74	77,55	3,11	8,26
<i>actb</i>	18,96	3,01	79,15	0,62	

*Tabell 4.2* og *Tabell 4.3* viser gjennomsnittlig Ct, Tm,  $\Delta Ct$  og  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  for hvert av genene fra prøvegruppene S og S3, samt standardavvik av Ct og Tm. Også i *Tabell 4.2* er gjennomsnittlig Ct for *actb* lavere enn for de andre genene. *muc5* har gjennomsnittlig lavere smeltepunktstemperatur i prøvegruppe B enn i prøvegruppe S. De andre genene har en gjennomsnittlig stabil smeltepunktstemperatur både i prøvegruppe B og i prøvegruppe S.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ble beregnet ved å bruke gjennomsnittet av målgenes  $\Delta Ct$ -verdier for prøvegruppe B.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdien til *muc18* i prøvegruppe S er gjennomsnittlig høyere enn for de andre genene tatt fra samme prøvetidspunkt.

Tabell 4.2: Tabellen viser gjennomsnittlige Ct-, Tm-, og  $\Delta$ Ct-verdier for de ulike genene med tilhørende standardavvik for prøvegruppe S. Tabellen viser også gjennomsnittlig  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  for de ulike genene for prøvegruppe S.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdiene ble så brukt videre for å lage en visuell framstilling av relativ genekspressjon. Beregningene ble gjort i Microsoft Excel.

Gen	Gjennomsnitt Ct	SD Ct	Gjennomsnitt Tm	SD Tm	$\Delta$ Ct snitt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ snitt
<i>muc18</i>	25,46	0,73	80,56	0,39	7,92	1,34
<i>muc5</i>	30,70	1,24	78,02	1,81	13,16	0,72
<i>il4/13a</i>	26,57	0,98	77,71	0,32	9,02	0,67
<i>actb</i>	17,54	1,17	79,27	0,35		

I Tabell 4.3 ser man igjen at gjennomsnittlig Ct for *actb* er lavere enn for de andre genene. Gjennomsnittlig Tm for *muc5* i prøvegruppe S3 er omtrent likt som for prøvegruppe S, men høyere enn gjennomsnittlig Tm for *muc5* i prøvegruppe B. Gjennomsnittlig  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdi til *muc5* er høyere enn tilsvarende verdier for de andre målgenene på samme prøvetidspunkt.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  for *muc5* har gått ned i forhold til prøvegruppe S. Både i prøvegruppe S og S3 har *il4/13a* de laveste gjennomsnittlige  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdiene.

Tabell 4.3: Tabellen viser gjennomsnittlige Ct-, Tm-, og  $\Delta$ Ct-verdier for de ulike genene med tilhørende standardavvik for prøvegruppe S3. Tabellen viser også gjennomsnittlig  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  for de ulike genene for prøvegruppe S3.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdiene ble så brukt videre for å lage en visuell framstilling av relativ genekspressjon. Beregningene ble gjort i Microsoft Excel.

Gen	Gjennomsnitt Ct	SD Ct	Gjennomsnitt Tm	SD Tm	$\Delta$ Ct snitt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ snitt
<i>muc18</i>	26,64	0,72	80,77	0,25	8,36	0,96
<i>muc5</i>	30,68	1,07	78,08	1,61	12,40	1,29
<i>il4/13a</i>	28,02	0,83	77,88	0,36	9,73	0,42
<i>actb</i>	18,28	0,93	78,81	2,53		

Tabell 4.4 og Tabell 4.5 viser prøvenummer og de fire målgenene fra hver prøve fra henholdsvis S og S3, samt  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdiene for de tre målgenene. Gjennomsnittet mellom hver parallell ble beregnet, som vist i tabellene. De gjennomsnittlige  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdiene for hvert målgen for hvert prøvetidspunkt i Tabell 4.2 og Tabell 4.3 ble beregnet ut ifra verdiene i Tabell 4.4 og Tabell 4.5 for henholdsvis prøvegruppe S og S3.

Tabell 4.4: Tabellen viser  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  for parallellene for prøve 1-12 for prøvegruppe S. Beregningene ble gjort i Microsoft Excel og verdiene for gjennomsnittlig  $\Delta Ct$  for de ulike genene fra prøvegruppe B ble brukt til beregning av  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

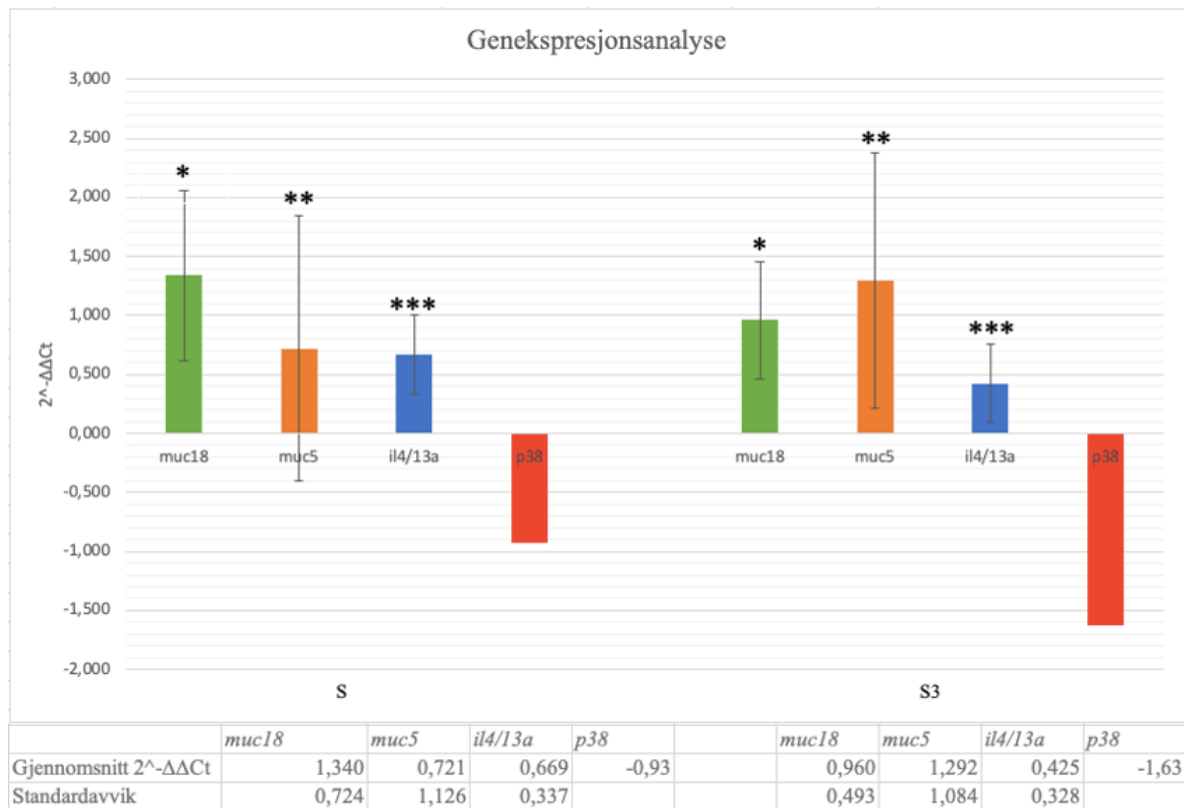
Prøve nr.	Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Prøve nr.	Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	<i>muc18</i>	1,36	7	<i>muc18</i>	1,03
1	<i>muc5</i>	0,29	7	<i>muc5</i>	0,19
1	<i>il4/13a</i>	1,28	7	<i>il4/13a</i>	0,53
1	<i>actb</i>		7	<i>actb</i>	
2	<i>muc18</i>	1,10	8	<i>muc18</i>	1,02
2	<i>muc5</i>	0,85	8	<i>muc5</i>	0,21
2	<i>il4/13a</i>	0,70	8	<i>il4/13a</i>	0,62
2	<i>actb</i>		8	<i>actb</i>	
3	<i>muc18</i>	1,76	9	<i>muc18</i>	3,61
3	<i>muc5</i>	4,39	9	<i>muc5</i>	0,71
3	<i>il4/13a</i>	0,57	9	<i>il4/13a</i>	1,27
3	<i>actb</i>		9	<i>actb</i>	
4	<i>muc18</i>	0,99	10	<i>muc18</i>	1,05
4	<i>muc5</i>	0,43	10	<i>muc5</i>	0,54
4	<i>il4/13a</i>	0,31	10	<i>il4/13a</i>	0,41
4	<i>actb</i>		10	<i>actb</i>	
5	<i>muc18</i>	1,33	11	<i>muc18</i>	1,14
5	<i>muc5</i>	0,17	11	<i>muc5</i>	0,24
5	<i>il4/13a</i>	1,06	11	<i>il4/13a</i>	0,22
5	<i>actb</i>		11	<i>actb</i>	
6	<i>muc18</i>	0,89	12	<i>muc18</i>	0,81
6	<i>muc5</i>	0,31	12	<i>muc5</i>	0,30
6	<i>il4/13a</i>	0,57	12	<i>il4/13a</i>	0,48
6	<i>actb</i>		12	<i>actb</i>	

Tabell 4.5: Tabellen viser  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  for parallellene for prøve 1-12 for prøvegruppe S3. Beregningene ble gjort i Microsoft Excel og verdiene for gjennomsnittlig  $\Delta Ct$  for de ulike genene fra prøvegruppe B ble brukt til beregning av  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Prøve nr.	Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Prøve nr.	Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	<i>muc18</i>	0,55	7	<i>muc18</i>	0,87
1	<i>muc5</i>	0,96	7	<i>muc5</i>	0,36
1	<i>il4/13a</i>	0,34	7	<i>il4/13a</i>	0,27
1	<i>actb</i>		7	<i>actb</i>	
2	<i>muc18</i>	0,80	8	<i>muc18</i>	0,75
2	<i>muc5</i>	1,28	8	<i>muc5</i>	0,48
2	<i>il4/13a</i>	0,52	8	<i>il4/13a</i>	0,40
2	<i>actb</i>		8	<i>actb</i>	
3	<i>muc18</i>	2,28	9	<i>muc18</i>	1,06
3	<i>muc5</i>	3,35	9	<i>muc5</i>	2,35

3	<i>il4/13a</i>	0,45	9	<i>il4/13a</i>	0,43
3	<i>actb</i>		9	<i>actb</i>	
4	<i>muc18</i>	1,04	10	<i>muc18</i>	0,82
4	<i>muc5</i>	1,22	10	<i>muc5</i>	0,40
4	<i>il4/13a</i>	0,22	10	<i>il4/13a</i>	0,22
4	<i>actb</i>		10	<i>actb</i>	
5	<i>muc18</i>	1,16	11	<i>muc18</i>	0,48
5	<i>muc5</i>	3,36	11	<i>muc5</i>	0,55
5	<i>il4/13a</i>	1,44	11	<i>il4/13</i>	0,44
5	<i>actb</i>		11	<i>actb</i>	
6	<i>muc18</i>	1,40	12	<i>muc18</i>	0,31
6	<i>muc5</i>	1,09	12	<i>muc5</i>	0,10
6	<i>il4/13a</i>	0,30	12	<i>il4/13a</i>	0,07
6	<i>actb</i>		12	<i>actb</i>	

Resultatene av relativ genekspresjon er presentert i et bokdiagram (Figur 4.1). Det benyttes logaritmisk skala, som er presentert på y-aksen.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdiene fra prøvegruppe S og prøvegruppe S3, ble normalisert i forhold til prøvegruppe B. Positive verdier symboliserer dermed en oppregulering av genekspresjonen, mens negative verdier symboliserer en nedregulering av genekspresjonen. *muc18* har gjennomsnittlig  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdi på 1,34 i prøvegruppe S og 0,96 i prøvegruppe S3. *muc5* viser en gjennomsnittlig  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdi på 0,72 i prøvegruppe S og 2,39 i prøvegruppe S3. *il4/13a* har en gjennomsnittlig  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdi på 0,67 i prøvegruppe S og 0,43 i prøvegruppe S3. De vertikale linjene viser standardavvik for de ulike genene fra prøvene i prøvegruppe S og S3. *muc18* i prøvegruppe S har et standardavvik på 0,72, og i prøvegruppe S3 har det et standardavvik på 0,49. *muc5* i prøvegruppe S har et standardavvik på 1,13, og i prøvegruppe S3 har det et standardavvik på 1,08. *il4/13a* i prøvegruppe S har et standardavvik på 0,34, og i prøvegruppe S3 har det et standardavvik på 0,33.



Figur 4.1: Boksdiagrammet viser hvordan de ulike målgenene ble regulert i forhold til under normale forhold (B), her symbolisert ved  $y=0$ . Tegnet \* symboliserer en signifikant forandring i genekspresjonen av *muc18* mellom prøvene i prøvegruppe S og S3. Tegnet \*\* symboliserer en signifikant forandring i genekspresjonen av *muc5* mellom prøvene i prøvegruppe S og S3. Tegnet \*\*\* symboliserer en signifikant forandring i genekspresjonen av *il4/13a* mellom prøvene i prøvegruppe S og S3. Se vedlegg A.6 for t-test utført på 5% signifikansnivå for de ulike målgenene. De vertikale linjene som går gjennom stolpene, symboliserer standardavviket i prøvepopulasjonen. *p38* har verken \* eller vertikal linje som symboliserer standardavvik da dette genet ikke er en del av denne studien, men er lagt inn for å vise hvordan en nedregulering ser ut. Nederst i figuren er det en oversikt over de gjennomsnittlige  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -verdiene for de ulike målgenene, samt standardavvik for  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -verdiene. Til venstre i figurens tabell er verdiene for prøvegruppe S, mens til høyre er verdiene for prøvegruppe S3.

## 5.0 Diskusjon

Denne studien ble utført med prøver tatt fra gjellelev fra atlantisk laks ved ulike tidsintervaller. Hensikten med studien var å bestemme relativ genekspresjon for å undersøke om transport fra settefiskanlegg på land til oppdrettsanlegg i sjø ved hjelp av brønnbåt, gir en fysiologisk respons hos fisken. I studien ble det sett på tre gener som kan tenkes å være stressrelaterte og det ble benyttet ett normaliseringsgen. Alle målgenene ved begge prøvetidspunktene var oppregulert i forhold til prøvegruppe B. Det ble utført t-test for å undersøke om det var en statistisk signifikant endring i genekspresjon for hvert av målgenene mellom prøvene fra prøvegruppe S og prøvegruppe S3 (vedlegg A.6). Med et signifikansnivå på 5% ble det i denne studien observert en signifikant forandring av alle målgenene i disse prøvegruppene.

### 5.1 Analyse av genekspresjon

#### 5.1.1 *muc18* og *muc5*

Figur 4.1 viser en oppregulering av *muc5* i prøvegruppe S. I prøvegruppe S3 kan det observeres en ytterligere oppregulering. Dette er forventet da man har sett oppregulering i tidligere studier utført av Sveen et al. (2017) og Marcos-López et al. (2018). Studien utført av Sveen et al. omhandlet endring i relativ genekspresjon som følge av ytre stressorer (3). Marcos-López et al. (2018) så på hvilke fysiologiske endringer AGD-infeksjon ga (25). Som nevnt stimulerer *muc5* til sekresjon av mukus, som har som funksjon å lage en fysisk og kjemisk barriere for å beskytte fisken mot patogener og andre ytre forurensninger. Oppreguleringen av *muc5* kan derfor være et tegn på en fysiologisk respons i fisken, og vil fungere som en forsvarsmekanisme da immunsystemet ved fysiologisk respons som følge av stress vil svekkes, og dermed gjøre fisken mer mottagelig for patogener. Den ytterligere oppreguleringen kan komme av at fisken etter transport til sjø må tilpasses nye forhold med mange ulike miljøfaktorer som kan påvirke de fysiologiske prosessene i fisken. De tidligere studiene har også vist at Muc5 er et viktig protein i gjeller, og resultatene i denne studien tyder også på at Muc5 er viktig i det respiratoriske systemet hos atlantisk laks. Dette fordi at *muc5* ble oppregulert både i prøvegruppe S og i prøvegruppe S3, noe som tyder på at Muc5 spiller en viktig rolle når det kommer til den fysiologiske responsen i fisk som utsettes for ytre påvirkning. Forsøket som ble utført av Marcos-López et al. (2018) viste en relativ genekspresjon av *muc5* på 28,61, som er vesentlig større enn resultatene fra denne studien som var på 1,29 (25). Dette kan indikere at AGD gir en større fysiologisk respons enn

transport, noe som kan forklares ut ifra at AGD er konstant og gir en langvarig påvirkning på fisken.

Muc5 stimulerer til sekresjon av mukus, og dermed vil en oppregulering av *muc5* tyde på at det kan ha blitt sektrert mer mukus. Dette blir støttet av tidligere forsøk utført av Sveen et al. (2017) som har vist at håndtering av fisk ved bruk av netting øker transkripsjon av mucin i gjellene (3). I tillegg er Muc5 viktig når det kommer til viskositeten til mukus, da mukus vil bli mer viskøst ved høyere innhold av sektrerte muciner som Muc5. Som nevnt kan mukus ha mange viktige funksjoner når det kommer til blant annet osmoregulering, ioneregulering og respirasjon. Endret mengde og viskositet på mukus kan dermed endre reguleringen av disse prosessene, slik at fisken tilpasses forholdene.

I Figur 4.1 kan det også observeres en oppregulering av *muc18* i prøvegruppe S. I prøvegruppe S3 kan det fortsatt observeres en oppregulering, men den er mindre enn for prøvene i prøvegruppe S. Oppreguleringen av *muc18* i prøvegruppe S er større enn for *muc5* i samme prøvegruppe. Det er observert økt ekspresjon av *MUC18* hos astmapasienter og det kan tenkes at det kan være en lignende sammenheng hos fisk. Astmapasienter har ofte økt utskillelse av mukus og det kan dermed tenkes at Muc18 kan være en faktor som påvirker sekresjon av mukus i likhet med Muc5. I en studie av Marcos-López et al. (2018) ble det observert en nedregulering av *muc18* etter 21 dager, i motsetning til denne studien hvor det ble observert en nedgang i oppreguleringen etter tre uker (S3) (25). Funksjonen til Muc18 er ikke kartlagt enda, men basert på tidligere forskning, kan en mulig forklaring på at *muc18* er mest oppregulert under transport være at Muc18 kan sette i gang proinflammatoriske responser for å beskytte fisken mot akutte forandringer. Årsaken til at oppreguleringen av *muc18* ble mindre etter tre uker, kan være at MUC18 spiller en viktig rolle når det kommer til metastasering av noen type kreftceller hos mennesker. Det er mulig at Muc18 har en lignende funksjon i atlantisk laks, og at laksen dermed har en innebygd forsvarsmekanisme. Denne forsvarsmekanismen kan tenkes å kunne motvirke sterk oppregulering av *muc18* fordi immunsystemet kan gjenkjenne Muc18 som en kreftmarkør, og dermed kan fiskens immunsystem tro at fisken har kreft. Muc1, som er et kjent onkogen, er beslektet med Muc18, og er også en viktig regulator når det kommer til apoptose (38, 69). Det kan derfor være mulig at Muc18 kan ha lignende funksjoner, og at dermed de cellene med overekspresjon av *muc18* kan ha gått i apoptose. Dette kan være en forklaring på at oppreguleringen var mindre i prøvegruppe S3 enn i prøvegruppe S.

Mange membranbundne proteiner er viktig når det kommer til intra- og intercellulær signalisering, og det samme kan gjelde for Muc18. Det kan tenkes at en oppregulering av *muc18* kan føre til økt syntese av Muc18, som fordeler seg rundt membranen på cellen. Dette kan føre til at flere celler adherer, slik at signalene når ut til flere celler. Det er uvisst hvilke signalveier Muc18 er en del av, men det kan tenkes at Muc18 i likhet med Muc5 har en rolle når det kommer til sekresjon av mukus.

### 5.1.2 *il4/13a*

For *il4/13a* kan det observeres en oppregulering i prøvegruppe S. I prøvegruppe S3 kan det også observeres en oppregulering, men den er mindre. Både for prøvegruppe S og S3 er *il4/13a* minst oppregulert av de målgenene som ble undersøkt i denne studien. Denne studien viser likhet med en studie gjort av Simon et al. (2010) hvor det ble sett at IL13 førte til en oppregulering av *MUC18*-ekspresjon i bronkiale epitelceller hos mennesker (44). *muc18* og *il4/13a* viste i denne studien en sammenheng i oppregulering, som kan sees i *Figur 4.1*. Det kan se ut som om forholdet mellom disse to genene er omtrent like stort både for prøvegruppe S og S3, noe som kan tyde på at IL4/13a er med på å regulere ekspresjon av *muc18* i atlantisk laks. Tidligere forsøk utført av Bottiglione et al. (2020) viste at behandling med blant annet IL4/13a førte til en nedregulering av proinflammatoriske cytokiner (70). Det kan tenkes at IL4/13a også kan føre til nedregulering av andre proinflammatoriske molekyler, som for eksempel Muc18. Oppreguleringen av *il4/13a* i prøvegruppe S kan dermed ha bidratt til at *muc18* ble mindre oppregulert i prøvegruppe S3.

*muc18* hadde ved begge prøvetidspunktene en større oppregulering i relativ genekspresjon enn *il4/13a*. Fordi Muc18 har proinflammatoriske egenskaper, mens IL4/13a har antiinflammatoriske egenskaper, kan det indikere at det foregår et større antall proinflammatoriske enn antiinflammatoriske responser i fisken i forhold til normalt. Proinflammatoriske responser resulterer ofte i feber og betennelse (71). Det at ekspresjonen av *il4/13a* går mer mot normalen i prøvegruppe S3, tyder på at immunforsvaret ikke er overstimulert, og kan være et tegn på at fisken ikke har fysiologiske langtidsvirkninger etter transporten.



Flere studier har vist at IL4 og IL13 stimulerer til økt ekspresjon av *muc5* i pattedyr (50, 51). I tillegg har en studie utført av Marcos-López et al. (2018) antydnet at det kan være en lignende sammenheng når det kommer til fisk som er infisert med AGD (25). I *Figur 4.1* kan det observeres en differensiell regulering av *muc5* og *il4/13a*, hvor det i prøvegruppe S3 kan ses en ytterligere oppregulering av *muc5*, mens oppreguleringen av *il4/13a* blir mindre i samme prøvegruppe. I denne studien kan det ikke observeres en lignende sammenheng i regulering av disse genenes ekspresjon, slik som i studien utført av Marcos-López et al. (2018) (25). Dette kan forklares ut ifra at AGD har en konstant og langvarig påvirkning på fisken, mens transport har en mer akutt påvirkning, før fisken videre må tilpasses et nytt miljø i sjøen. Grunnet ulike typer stressorer i disse to studiene, kan de ikke direkte sammenlignes da det kan være andre faktorer som påvirker de fysiologiske responsene.

## 5.2 Kritiske punkter

*Figur 4.1* viser et høyere standardavvik for *muc5* enn for de resterende målgenene, både i prøvegruppe S og prøvegruppe S3. En mulig forklaring på dette kan ha vært at det alltid vil være variasjoner mellom individer i en populasjon, altså kan den fysiologiske responsen mellom ulike individer være varierende. Transport og tilpasning til nytt miljø i sjø er stressorer som kan føre til slike variasjoner i fysiologisk respons mellom individer.

Noen av parallellene fikk ingen Ct-verdi, og mulige årsaker til dette kan ha vært at cDNA-templatet ikke har kommet ned i qPCR reaksjonsmiksen som følge av eventuelle pipetteringsfeil. Dette gjelder for prøvene hvor bare en av parallellene mangler Ct-verdi. For prøver hvor begge parallellene mangler Ct-verdi kan dette avviket skyldes andre forhold. For prøve 4 fra prøvegruppe B, hadde ingen av parallellene for verken *muc5* eller *il4/13a* Ct-verdi (vedlegg A.4). Dette kan tyde på at det er noe galt med prøven, noe som kan skyldes feil rundt prøvetaking eller lagring, eller feil rundt cDNA-syntesen (61). Manglende Ct-verdier påvirker ikke resultatene i stor grad, da det fortsatt er nok verdier til å utføre beregninger.

Som et kvalitetssikringstrinn ble det benyttet NTC for å undersøke om produktet var kontaminert, samt for å se på om det oppsto uspesifikk binding i reaksjonen. Det ble observert tre positive NTC (vedlegg A.4), men da alle hadde en differanse på minst fem fra prøven med høyest Ct-verdi, ble prøvene ansett som gyldige (72).

### 5.3 Videre forskning

Denne studien viste at det var en oppregulering av de aktuelle målgenene. Dette betyr ikke nødvendigvis at proteininnholdet av de aktuelle proteinene har økt, da det etter transkripsjonen finner sted en rekke regulatoriske prosesser. Tidligere forsøk har vist at det ikke alltid er en proporsjonalitet mellom transkribert mRNA og proteinekspresjon (73). For å finne ut om det faktisk har blitt dannet mer av de aktuelle proteinene, kan det utføres proteomiske studier. Ved å se på både genekspressjon og proteomikk, får man en større innsikt i hvordan den fysiologiske responsen i fisken faktisk er.

Som det har kommet frem gjennom oppgaven, er det lite forskning rundt mucingenene *muc5* og *muc18* i fisk, og deres funksjoner. Det er også lite forskning rundt funksjonene til IL4/13a i fisk. For å bedre forstå hvordan den fysiologiske responsen påvirker fisken, bør det forskes på funksjonene til disse genene, samt bør det forskes mer på hvilke roller mukus spiller hos fisk. Det bør også forskes mer på hvordan de ulike målgenene i denne studien potensielt kan regulere hverandre. Ytterligere forskning og kunnskap kan gi viktig informasjon om fiskehelse i oppdrettsnæringen, og kan legge grunn for videre studier rundt fysiologiske responser i fisk.

Denne bacheloren er en liten studie som ikke nødvendigvis viser det store bildet. Den må derfor ses i sammenheng med den upubliserte studien denne bacheloren er en del av, i tillegg til andre studier som omhandler fiskens fysiologiske respons på stress. Det bør også forskes mer på disse genene i andre typer vev enn bare gjellevev, for å i større grad kartlegge den fysiologiske responsen i hele fisken.

## 6.0 Konklusjon

Denne studien så på *muc5*, *muc18* og *il4/13a* fra gjellelev. Studien viste en signifikant forskjell i ekspresjonen av målgenene mellom prøvegruppe S og S3. Alle målgenene viste en oppregulering ved de to prøvetidspunktene i forhold til normale forhold (B). Denne oppreguleringen viser at fisken har fått en fysiologisk respons ved transport, men det er usikkert hvordan denne fysiologiske responsen påvirker fiskens helse, da man ikke har kartlagt funksjonen til de aktuelle målgenene. Det anbefales derfor videre forskning rundt genenes funksjon i fisk.

## Litteraturliste

1. Miljødirektoratet Fa. Fiskeoppdrett – en næring i vekst miljødirektoratet.no2021 [updated 03.05.21. Available from: <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/hav-og-kyst/fiskeoppdrett/>].
2. Sommerset I WCS, Bang Jensen B, Wiik-Nielsen J, Bornø G, Oliveira VHS, E. HAoB. Fiskehelse rapporten 2021. Veterinærinstituttet; 2022 08.03.
3. Sveen LR, Grammes FT, Ytteborg E, Takle H, Jørgensen SM. Genome-wide analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) mucin genes and their role as biomarkers. PLoS One. 2017;12(12):e0189103-e.
4. Shepard KL. Functions for fish mucus. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 1994:401-29.
5. SINTEF. Stressed-out salmon get sick sintef.no: SINTEF; 2016 [Available from: <https://www.sintef.no/en/latest-news/2016/stressed-out-salmon-get-sick/>].
6. Reverter M, Tapissier-Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. Fishes. 2018;3(4).
7. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. Biochimie. 2010;92(1):1-11.
8. Bansil R, Turner BS. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. Advanced Drug Delivery Reviews. 2018;124:3-15.
9. Johnson JP, Rummel, M.M., Rothbacher, U., Sers, C. MUC18: A Cell Adhesion Molecule with a Potential Role in Tumor Growth and Tumor Cell Dissemination 1996.
10. Noble C, Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. &, Turnbull JFE. Welfare Indicators for Farmed Atlantic salmon: Tools for assessing fish welfare. Nofimaas. 2018.
11. Wu Q, Case SR, Minor MN, Jiang D, Martin RJ, Bowler RP, et al. A Novel Function of MUC18: Amplification of Lung Inflammation during Bacterial Infection. The American Journal of Pathology. 2013;182(3):819-27.
12. Justiz Vaillant AA QA. Interleukin. StatPearls. 2021.
13. Huang X-L, Wang Y-J, Yan J-W, Wan Y-N, Chen B, Li B-Z, et al. Role of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 in systemic sclerosis. Inflammation Research. 2015;64(3):151-9.

14. Hoem KS, Cao, Y., Ding, J. Tveten, AK. From Land to Sea: the Impact og Sea Transfer on Stress-related Gene Expression in Gill Tissue from Commercial Atlantic Salmon (*Salmo Salae*). 2021.
15. Oslo Ui. Katadrom uio.no: UiO; 2011 [updated 07.12.20. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/katadrom.html>.
16. Wennevik V, Hansen, T. Tema: Laks: Havforskningsinstituttet; 2019 [updated 26.07.21. Available from: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks>.
17. Mizuno S, Urabe H, Aoyama T, Omori H, Iijima A, Kasugai K, et al. Changes in activity and transcript level of liver and gill metabolic enzymes during smoltification in wild and hatchery-reared masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Aquaculture*. 2012;362-363:109-2
18. Fiskedirektoratet. Settefisk fiskedir.no [Available from: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tildeling-og-tillatelser/Kommersielle-tillatelser/Laks-oeerret-og-regnbueoeerret/Settefisk>.
19. Misund B. Fiskeoppdrett snl.no2009 [updated 18.02.21. Available from: <https://snl.no/fiskeoppdrett>.
20. Misund B. Settefisk snl.no2009 [updated 26.08.20. Available from: <https://snl.no/settefisk>.
21. Hansen T. Tema: Laks i oppdrett hi.no: Havforskningsinstituttet; 2019 [updated 07.04.21. Available from: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks/laks-i-oppdrett>.
22. Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA, Carlsen KT, Evjen T. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture*. 2005;243(1):373-82.
23. Cabillon NAR, Lazado CC. Mucosal Barrier Functions of Fish under Changing Environmental Conditions. *Fishes*. 2019;4(1).
24. Sopinka NM, Donaldson, M.R., O'Connor, C.M., Susky, C.D., Cooke, S.J. *Fish Physiology*: Elsevier; 2016.
25. Marcos-López M, Calduch-Giner JA, Mirimin L, MacCarthy E, Rodger HD, O'Connor I, et al. Gene expression analysis of Atlantic salmon gills reveals mucin 5 and interleukin 4/13 as key molecules during amoebic gill disease. *Sci Rep*. 2018;8(1):13689-.
26. Alberts B, Hopkin, K., Johnson, A.D., Raff, M. *Essential Cell Biology*. 5. ed: W.W. Norton & Company; 2019.
27. Kryvi H, Poppe, T. *Fisceanatomi*. 2. ed: Vigmostad & Bjørke; 2016.
28. Scanpix N. Gjeller hos fisk. ndla.no: Science Photo Library.
29. Openstax. Begercelle. Store norske leksikon.

30. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2006;11(2):164-70.
31. Tasleem F, Amjad, R., Sherazi, S.D.Z., Saddique, A., Saba, A., Zainab, S.N, Masood, S.: Physiology and Biochemical Properties of Fish Mucus Particular Emphasizes as a Body Defense System. *Haya: The Saudi Journal of Life Sciences*. 2020:274-80.
32. Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(20):2893-904.
33. Padra János T, Sundh H, Jin C, Karlsson Niclas G, Sundell K, Lindén Sara K, et al. *Aeromonas salmonicida* Binds Differentially to Mucins Isolated from Skin and Intestinal Regions of Atlantic Salmon in an N-Acetylneuraminic Acid-Dependent Manner. *Infection and Immunity*. 2014;82(12):5235-45.
34. Perez-Vilar J, Hill, R.L. The Structure and Assembly of Mucins\*210. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(45):31751-4.
35. Corfield AP. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2015;1850(1):236-52.
36. Ukjent. Structure of a secreted mucin. Schematic representation of a secreted mucin. *Clinical and Translational Immunology*2020.
37. Ukjent. Structure of MUC1 mucin. [frontiers.org](https://www.frontiersin.org).
38. Pérez-Sánchez J, Estensoro I, Redondo MJ, Caldach-Giner JA, Kaushik S, Sitjà-Bobadilla A. Mucins as diagnostic and prognostic biomarkers in a fish-parasite model: transcriptional and functional analysis. *PloS one*. 2013;8(6):e65457-e.
39. Rottmann RW, Francis-Floyd, R., Durborow, R. The Role of Stress in Fish Disease. *SPRAC Publication*. 1992;474.
40. Shephard KL. Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993;11(3):403-17.
41. Martinsen L. Genuttrykk snl.no2020 [updated 19.05.20. Available from: <https://snl.no/genuttrykk>.
42. Oslo Ui. Transkripsjonsfaktor uio.no: UiO; 2011 [updated 26.02.22. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/t/transkripsjonsfa.html>.
43. Easy RH, Ross, N.W. Changes in Atlantic salmon *Salmo salar* mucus components following short- and long-term handling stress. *Journal of Fish Biology*. 2010;77(7):1616-31.
44. Sumon GC, Martin, R.J., Smith, S., Thaikoottathil, J., Bowler, R.P., Barenkamp, S.J., Chu, H.W. Up-Regulation of MUC18 in Airway Epithelial Cells by IL-13

Implications in Bacterial Adherence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2010;44(5).

45. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*: Fagbokforlaget; 2006.
46. Papanicolaou DA. Interleukin-6: The Endocrine Cytokine. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(3):1331-3.
47. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
48. Stocchi V, Wang T, Randelli E, Mazzini M, Gerdol M, Pallavicini A, et al. Evolution of Th2 responses: characterization of IL-4/13 in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and studies of expression and biological activity. *Scientific Reports*. 2017;7(1):2240.
49. Matsuura Y, Takasaki M, Miyazawa R, Nakanishi T. Stimulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* on cell-mediated immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2017;74:1-9.
50. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol*. 1999;162(10):6233-7.
51. Yu H, Li Q, Kolosov VP, Perelman JM, Zhou X. Interleukin-13 Induces Mucin 5AC Production Involving STAT6/SPDEF in Human Airway Epithelial Cells. *Cell Communication & Adhesion*. 2010;17(4-6):83-92.
52. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol*. 1997;17(1):1-32.
53. Takizawa F, Koppang EO, Ohtani M, Nakanishi T, Hashimoto K, Fischer U, et al. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology*. 2011;48(12):1360-8.
54. Wang B, Wang H, Gao C, Liu Y, Jin C, Sun M, et al. Functional Analysis of the Promoter Region of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)  $\beta$ -actin Gene: A Useful Tool for Gene Research in Marine Fish. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1401.
55. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 1999;75(2):291-5.
56. Scientific T. *Basic Principles of RT-qPCR*: Thermo Scientific; [Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

[biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html](https://www.thermofisher.com/learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html).

57. Scientific TF. Introduction to Gene Expression: Getting Started Guide

thermofisher.com: Thermo Fisher Scientific; [Available from:

<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/introduction-gene-expression.html>.

58. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotechnology. 2003;3(1):18.

59. Scientific TF. Qubit Fluorometric Quantification thermofisher.com [Available from:

<https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>.

60. Lumiprobe. ROX reference dye for qPCR lumiprobe.com [Available from:

[https://www.lumiprobe.com/p/rox-reference-dye?gclid=Cj0KCOiAraSPBhDuARIsAM3Js4pn237YtfWokJU7DE\\_E2UMJPHfKuoL5rPxGHouLYoS489xOATbNWuUaAok1EALw\\_wcB](https://www.lumiprobe.com/p/rox-reference-dye?gclid=Cj0KCOiAraSPBhDuARIsAM3Js4pn237YtfWokJU7DE_E2UMJPHfKuoL5rPxGHouLYoS489xOATbNWuUaAok1EALw_wcB).

61. Scientific TF. Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix (2x)

thermofisher.com [Available from: [https://www.thermofisher.com/document-](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0012924_Maxima_SYBR_GreenROX_qPCR_MasterMix_k0221_UG.pdf)

[connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0012924\\_Maxima\\_SYBR\\_GreenROX\\_qPCR\\_MasterMix\\_k0221\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0012924_Maxima_SYBR_GreenROX_qPCR_MasterMix_k0221_UG.pdf).

62. Rise.articulate. Real-Time PCR Handbook 2.0 rise.articulate.com [Available from:

[https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/lessons/noKhHphSTiBTWHgbzZsRpp\\_5h6jBfais](https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/lessons/noKhHphSTiBTWHgbzZsRpp_5h6jBfais).

63. Scientific TF. Amplification of the No Template Control (NTC) thermofisher.com

[Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/amplification-no-template-control.html>.

64. Farrar JS, Wittwer CT. Chapter 6 - High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. In: Patrinos GP, editor. Molecular Diagnostics (Third Edition): Academic Press; 2017. p. 79-102.



65. Technologies L. Real-time PCR handbook [Available from: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.
66. Proteomics C. Bioinformatic Fold Change Analysis Service creativeproteomics.com [Available from: <https://www.creative-proteomics.com/services/bioinformatic-fold-change-analysis-service.htm>.
67. Nader R, Horvath, A.R., Wittwer, C.T. Clinical chemistry and molecular diagnostics. 8 ed: Saunders; 2019.
68. Bradburd S. How To Perform The Delta-Delta Ct Method toptipbio.com [Available from: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/>.
69. Supruniuk K, Radziejewska I. MUC1 is an oncoprotein with a significant role in apoptosis (Review). *Int J Oncol.* 2021;59(3).
70. Bottiglione F, Dee CT, Lea R, Zeef LAH, Badrock AP, Wane M, et al. Zebrafish IL-4-like Cytokines and IL-10 Suppress Inflammation but Only IL-10 Is Essential for Gill Homeostasis. *J Immunol.* 2020;205(4):994-1008.
71. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8.
72. Laurell H, Iacovoni JS, Abot A, Svec D, Maoret J-J, Arnal J-F, et al. Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(7):e51-e.
73. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 2016;165(3):535-50.

## A.0 Vedlegg

### A.1 Prosedyrer

#### A.1.1 cDNA

Tillaging av cDNA ved hjelp av Quanta bio qScript® cDNA Synthesis kit (revers transkriptase). Det skal settes opp 20 µl reaksjoner i PCR-rør.

1. Tin alle reagenser. Vortex og spinn ned reagenser før bruk. Ha alle reagenser på is.
2. Bland reagens og prøve i qPCR-strips (merk alle rør) etter følgende tabell;

*Tabell A.1: Tabellen viser oversikt over hvilke komponenter og mengde som skal blandes for å gjennomføre cDNA-syntese.*

Komponenter	Mengde (µl)
RNA-templat	10
Nukleasefritt vann	5
qScript Reaction Mix (5x)	4
qScript RT	1
Totalt volum	20

3. Etter at reagens og prøve er blandet, skal rørene vortexes og spennes ned
4. Plasser PCR-strips i termosyklus og inkuber så etter følgende tabell;

*Tabell A.2: Tabellen viser oversikt over inkubasjonstemperatur og -tid i termosyklusen.*

Tid (minutter)	Temperatur (°C)
5	22
30	42
5	85
Hold	4

5. Etter inkuberingen legges cDNA i fryser på -20 °C

#### A.1.2 Qubit på cDNA

Tillaging av standard og prøve

1. Sett opp nødvendig antall 0,5 ml rør for standarder og prøver. Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit krever to standarder. Marker rørene på lokket.
2. Tilsett 190 µl av den ferdiglagde Qubit working solution til hvert av de to rørene som skal benyttes som standard. Tilsett 10 µl av hver Qubit standard til rørene.

3. Vortex rørene i 2-3 sekunder. Pass på å ikke lage bobler.
4. Tilsett Qubit working solution til hvert rør slik at sluttvolumet blir 200  $\mu\text{l}$  (195  $\mu\text{l}$  working solution ved 5  $\mu\text{l}$  prøve).
5. Tilsett 5  $\mu\text{l}$  prøve til de ulike rørene og vortex i 2-3 sekunder
6. Inkuber rørene ved romtemperatur i 2 minutter.

#### Kalibrering av Qubit 4 Fluorometeret

1. Trykk på “DNA” på hjemskjermen
2. Trykk på “1x dsDNA: High sensitivity (HS)”
3. Trykk på “Read standards & run samples”
4. Sett inn standard 1 og trykk “Read standard”
5. Sett inn standard 2 og trykk “Read standard”
6. Kalibrasjonen er ferdig etter at standard 2 er lest av
7. Dersom kalibrasjonen er vellykket viser skjermen read standard og fluorescence vs concentration graph

#### Avlesning av prøver

1. Trykk “Run samples”
2. Juster prøvens volum og måleenhet ved å henholdsvis trykke på + eller – på Sample volume screen og velge måleenhet fra nedtrekksmenyen.
3. Sett inn hver av prøvene og trykk “read tube”
4. Les av konsentrasjonen på displayet

#### A.1.3 RT-qPCR - Fortynninger

##### Primere

1. Merk rørene og tilsett 90  $\mu\text{l}$  nukleasefritt vann til hvert av rørene.
2. Tilsett 10  $\mu\text{l}$  av hver primer til sine respektive rør.
3. Vortex og spinn ned.

##### cDNA

1. Merk rørene på PCR-strips og tilsett nukleasefritt vann og cDNA etter beregninger (vedlegg A.2).

2. Vortex og spinn ned.

#### A.1.4 RT-qPCR

1. Ha alle komponentene på is, vortex og spinn ned før bruk.
2. Tilsett følgende komponenter (start med største volum) etter følgende skjema i 96-brønns qPCR-plate;

Tabell A.3: Tabellen viser oversikt over hvilke komponenter og mengde som skal blandes for å gjennomføre qPCR.

Komponent	Volum for reaksjoner ( $\mu$ l)
PerfeCTa SYBR Green SuperMix, Rox	7,5
Forward primer	1
Reverse primer	1
Nukleasefritt vann	variabel
cDNA templat	variabel
Totalt volum	15

Se vedlegg A.3 for plateoppsett og vedlegg A.2 for mengde nukleasefritt vann og cDNA-templat.

3. Ha over plastfilm for å hindre fordamping, og spinn ned.
4. Sett platen inn i qPCR-maskinen

#### AriaMx

1. Skru på qPCR-maskinen og logg inn.
2. Logg inn på PC.
3. Åpne Aria MX-software
4. Velg program kalt Quantitative PCR (DNA Binding Dye Including Standard Melt)
5. Bestem plateoppsettet
  - a. Marker de brønnene som skal brukes
  - b. Under meny kalt “properties”, legg til ROX som fargestoff og SYBR Green som referansefargestoff.
  - c. Navngi hver brønn med navn på gen, prøvenummer og parallell. Alle brønner som skal inneholde prøve defineres som “unknown”, mens de som skal være negativ kontroll defineres som “NTC”.

- Trykk på “thermal profile” og sett inn temperaturer, sykluslengde og syklusnummer etter følgende skjema;

Tabell A.4: Tabellen viser oversikt over temperatur- og tidsskjema, samt hvor mange sykluser som skal gjennomføres i qPCR-reaksjonen.

	Antall sykluser	Tid (minutter)	Temperatur (°C)
Hot Start	1	03.00	95
Amplifisering	38	00.15	95
		00.20	58
		00.30	72
Smeltepunktanalyse	1	00.30	95
		00.30	65
		00.30	95

- Trykk på “Run” på PC-en inne i siden for “thermal profile”.
- Plasser prøveplaten i maskinen og trykk på “RUN” på qPCR-maskinen.

## A.2 Konsentrasjon av cDNA

Tabell A.5: Tabellen viser en oversikt over cDNA-konsentrasjonene som Qubit-fluorometeret ga. Disse verdiene ble delt på en fortynningsfaktor som ga ny konsentrasjon mellom 400 og 700 pg/μl. Da den endelige mengden cDNA i qPCR-miksen skulle bli 400 pg, ble 400 videre delt på den nye konsentrasjonen, for å finne mengde som skulle brukes i qPCR-miksen.

Prøve	Qubit konsentrasjon av cDNA (pg/μl)	cDNA fortynning (cDNA templat + nukleasefritt vann)	Konsentrasjon etter fortynning (pg/μl)
Før 1-12			
1	11000	2 μl + 34 μl	611,1
2	2426	2 μl + 6 μl	606,5
3	1736	2 μl + 4 μl	578,6
4	13200	2 μl + 43 μl	733,3
5	8160	2 μl + 18 μl	816
6	5400	2 μl + 14 μl	675
7	2280	2 μl + 6 μl	570
8	11920	2 μl + 34 μl	662,2
9	7000	2 μl + 18 μl	700
10	10000	2 μl + 39 μl	555,5
11	5960	2 μl + 18 μl	596
12	11880	2 μl + 34 μl	660
Under 1-12			
1	16560	2 μl + 46 μl	690
2	14680	2 μl + 40 μl	699
3	9000	2 μl + 24 μl	692
4	16720	2 μl + 46 μl	697

5	17680	2 $\mu$ l + 48 $\mu$ l	707
6	12520	2 $\mu$ l + 34 $\mu$ l	696
7	8690	2 $\mu$ l + 24 $\mu$ l	668
8	17640	2 $\mu$ l + 48 $\mu$ l	705,6
9	7080	2 $\mu$ l + 18 $\mu$ l	708
10	7840	2 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	713
11	7600	2 $\mu$ l + 20 $\mu$ l	691
12	12840	2 $\mu$ l + 34 $\mu$ l	713
Tre uker etter 1-12			
1	1696	2 $\mu$ l + 6 $\mu$ l	424
2	4680	2 $\mu$ l + 12 $\mu$ l	669
3	2764	2 $\mu$ l + 6 $\mu$ l	691
4	2968	2 $\mu$ l + 8 $\mu$ l	593,6
5	1108	4 $\mu$ l + 4 $\mu$ l	554
6	3528	2 $\mu$ l + 8 $\mu$ l	706
7	3268	2 $\mu$ l + 8 $\mu$ l	654
8	3312	2 $\mu$ l + 8 $\mu$ l	662
9	1724	2 $\mu$ l + 4 $\mu$ l	575
10	3736	2 $\mu$ l + 10 $\mu$ l	623
11	4120	2 $\mu$ l + 12 $\mu$ l	589
12	1800	2 $\mu$ l + 4 $\mu$ l	600

### A.3 Oppsett på plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>	Muc18 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	Muc5 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	IL 4/13a 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	Bact 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	Muc18 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann	Muc5 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann	IL 4/13a 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann	Bact 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann			Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	
<b>C</b>	Muc18 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	Muc5 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	IL 4/13a 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	Bact 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,65 µl templat 4,85 µl vann	Muc18 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann	Muc5 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann	IL 4/13a 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann	Bact 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,55 µl templat 4,95 µl vann			Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	
<b>D</b>	Muc18 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Muc5 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	IL 4/13a 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Bact 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Muc18 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann	Muc5 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann	IL 4/13a 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann	Bact 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann				
<b>E</b>	Muc18 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Muc 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	IL 4/13a 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Bact 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Muc18 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann	Muc5 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann	IL 4/13a 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann	Bact 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,50 µl templat 5,0 µl vann				
<b>F</b>	Muc18 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc5 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	IL 4/13a 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Bact 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc18 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann				
<b>G</b>	Muc18 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc5 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	IL 4/13a 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Bact 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc18 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann				
<b>H</b>												

Figur A.1: Figuren viser en oversikt over plateoppsettet for prøve 1-6 tatt før transport.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Muc18 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	Muc5 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	IL 4/13a 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	Bact 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	Muc18 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Muc5 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	IL 4/13a 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Bact 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5, 5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
C	Muc18 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	Muc5 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	IL 4/13a 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	Bact 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,70 µl templat 4,80 µl vann	Muc18 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Muc5 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	IL 4/13a 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Bact 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
D	Muc18 8a 7,5 SYBR green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Muc5 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	IL 4/13a 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Bact 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
E	Muc18 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Muc5 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	IL 4/13a 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Bact 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
F	Muc18 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc18 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
G	Muc18 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc18 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
H												

Figur A.2: Figuren viser en oversikt over plateoppsettet for prøve 7-12 tatt for transport.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>	Muc18 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc18 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5, 5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>C</b>	Muc18 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc18 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>D</b>	Muc18 2a 7,5 SYBR green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc18 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>E</b>	Muc18 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc18 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>F</b>	Muc18 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc18 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>G</b>	Muc18 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,92 µl vann	Bact 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,92 µl vann	Muc18 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>H</b>												

Figur A.3: Figur viser en oversikt over plateoppsett for prøve 1-6 tatt under transport.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>	Muc18 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5, 5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>C</b>	Muc18 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>D</b>	Muc18 8a 7,5 SYBR green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc5 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc18 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>E</b>	Muc18 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	IL 4/13a 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Bact 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,57 µl templat 4,93 µl vann	Muc18 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,5 µl templat 5,0 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>F</b>	Muc18 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc18 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>G</b>	Muc18 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc18 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>H</b>												

Figur A.4: Figurtekst: Figuren viser en oversikt over plateoppsettet for prøve 7-12 tatt under transport.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>	Muc18 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	Muc5 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	IL 4/13a 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	Bact 1a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	Muc18 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Muc5 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	IL 4/13a 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Bact 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>C</b>	Muc18 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	Muc5 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	IL 4/13a 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	Bact 1b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,94 µl templat 4,56 µl vann	Muc18 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Muc5 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	IL 4/13a 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Bact 4b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>D</b>	Muc18 2a 7,5 µl SYBR green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 2a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Muc5 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	IL 4/13a 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Bact 5a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>E</b>	Muc18 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Muc5 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	IL 4/13a 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann	Bact 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,72 µl templat 4,78 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>F</b>	Muc18 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 3a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc18 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 6a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>G</b>	Muc18 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc5 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	IL 4/13a 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Bact 3b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,58 µl templat 4,92 µl vann	Muc18 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Muc5 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	IL 4/13a 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann	Bact 6b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,56 µl templat 4,94 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>H</b>												

Figur A.5: Figuren viser en oversikt over plateoppsettet for prøve 1-6 tatt 3 uker etter transport.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>	Muc18 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	Muc5 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	IL 4/13a 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	Bact 7a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	Muc18 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	Muc5 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	IL 4/13a 4a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	Bact 10a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5, 5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>C</b>	Muc18 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	Muc5 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	IL 4/13a 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	Bact 7b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,61 µl templat 4,89 µl vann	Muc18 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	Muc5 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	IL 4/13a 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	Bact 10b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,64 µl templat 4,86 µl vann	Neg. Bact 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann	Neg. Muc18 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>D</b>	Muc18 8a 7,5 SYBR green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc5 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 8a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Muc5 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	IL 4/13a 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Bact 11a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>E</b>	Muc18 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc 2b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	IL 4/13a 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Bact 8b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,60 µl templat 4,90 µl vann	Muc18 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Muc5 5b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	IL 4/13a 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann	Bact 11b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,67 µl templat 4,83 µl vann		Neg. Muc5 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>F</b>	Muc18 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc5 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	IL 4/13a 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Bact 9a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc18 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Muc5 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	IL 4/13a 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Bact 12a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>G</b>	Muc18 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc5 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	IL 4/13a 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Bact 9b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,69 µl templat 4,81 µl vann	Muc18 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Muc5 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	IL 4/13a 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann	Bact 12b 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 0,66 µl templat 4,84 µl vann		Neg. IL 4/13a 7,5 µl SYBR Green 1 µl FP 1 µl RP 5,5 µl vann		
<b>H</b>												

Figur A.6: Figur viser en oversikt over plateoppsettet for prøve 7-12 tatt 3 uker etter transport.

## A.4 Rådata fra AriaMx

Tabell A.6: Tabellen viser Ct- og Tm-verdier for qPCR-platen bestående av prøvene 1-6 før transport, samt standardavvik mellom parallellene. Dataene i tabellen er direkte hentet fra softwaren (AriaMx), og er derfor fremlagt på engelsk. Navnet på brønnen (Well Name) sier hvilket prøvenummer og hvilken parallell det er i hvilken brønn (Well) på qPCR-platen, samt navnet på genet som analyseres for. Standardavvik for parallellene ble regnet ut i Excel.

Well	Well Name	Cq ( $\Delta Rn$ )	SD Cq	Tm Product 1 (-Rn'(T))	SD Tm
B2	<i>muc18 1a</i>	28,42	0,42	80,00	0,25
C2	<i>muc18 1b</i>	27,59	0,42	80,50	0,25
B3	<i>muc5 1a</i>	33,51	0,18	78,00	0,25
C3	<i>muc5 1b</i>	33,14	0,18	78,50	0,25
B4	<i>il4/13a 1a</i>	27,57	0,10	77,50	0,00
C4	<i>il4/13a 1b</i>	27,38	0,10	77,50	0,00
B5	<i>actb 1a</i>	18,17	0,86	81,00	1,00
C5	<i>actb 1b</i>	19,89	0,86	79,00	1,00
D2	<i>muc18 2a</i>	29,20	0,13	81,00	0,00
E2	<i>muc18 2b</i>	28,94	0,13	81,00	0,00
D3	<i>muc5 2a</i>	34,63	0,23	78,50	0,00
E3	<i>muc5 2b</i>	35,09	0,23	78,50	0,00
D4	<i>il4/13a 2a</i>	30,53	0,05	77,50	0,00
E4	<i>il4/13a 2b</i>	30,42	0,05	77,50	0,00
D5	<i>actb 2a</i>	20,64	0,81	79,50	1,00
E5	<i>actb 2b</i>	22,26	0,81	77,50	1,00
F2	<i>muc18 3a</i>	26,44	0,73	81,50	0,50
G2	<i>muc18 3b</i>	27,90	0,73	80,50	0,50
F3	<i>muc5 3a</i>	27,75	0,40	78,50	0,50
G3	<i>muc5 3b</i>	28,54	0,40	77,50	0,50
F4	<i>il4/13a 3a</i>	29,08	0,15	77,50	0,25
G4	<i>il4/13a 3b</i>	29,38	0,15	77,00	0,25
F5	<i>actb 3a</i>	18,92	0,06	79,50	0,00
G5	<i>actb 3b</i>	18,81	0,06	79,50	0,00
B6	<i>muc18 4a</i>	35,13	0,61	80,50	0,00
C6	<i>muc18 4b</i>	33,92	0,61	80,50	0,00
B7	<i>muc5 4a</i>	No Cq		68,00	5,50
C7	<i>muc5 4b</i>	No Cq		79,00	5,50
B8	<i>il4/13a 4a</i>	No Cq		65,00	1,75
C8	<i>il4/13a 4b</i>	No Cq		68,50	1,75
B9	<i>actb 4a</i>	27,26	0,08	78,50	0,25
C9	<i>actb 4b</i>	27,10	0,08	79,00	0,25
D6	<i>muc18 5a</i>	28,70	0,08	80,00	0,00
E6	<i>muc18 5b</i>	28,53	0,08	80,00	0,00
D7	<i>muc5 5a</i>	33,09	0,53	77,50	0,25
E7	<i>muc5 5b</i>	34,15	0,53	78,00	0,25

D8	<i>il4/13a 5a</i>	28,87	0,11	77,50	0,25
E8	<i>il4/13a 5b</i>	28,66	0,11	78,00	0,25
D9	<i>actb 5a</i>	21,01	0,02	79,00	0,25
E9	<i>actb 5b</i>	21,05	0,02	79,50	0,25
F6	<i>muc18 6a</i>	27,02	0,14	81,00	0,25
G6	<i>muc18 6b</i>	27,29	0,14	80,50	0,25
F7	<i>muc5 6a</i>	32,46	0,52	78,50	0,50
G7	<i>muc5 6b</i>	33,50	0,52	77,50	0,50
F8	<i>il4/13a 6a</i>	28,08	0,05	77,50	0,25
G8	<i>il4/13a 6b</i>	27,97	0,05	78,00	0,25
F9	<i>actb 6a</i>	18,94	0,00	79,50	0,25
G9	<i>actb 6b</i>	18,94	0,00	79,00	0,25

Tabell A.7: Tabellen viser Ct- og Tm-verdier for qPCR-platen bestående av prøvene 7-12 før transport, samt standardavvik mellom parallellene. Ct- og Tm-verdiene ble direkte hentet fra softwaren, mens standardavvikene ble beregnet i Excel.

Well	Well Name	Cq ( $\Delta Rn$ )	SD Cq	Tm Product 1 (-Rn'(T))	SD Tm
B2	<i>muc18 7a</i>	27,01	0,48	79,00	0,50
C2	<i>muc18 7b</i>	26,05	0,48	80,00	0,50
B3	<i>muc5 7a</i>	30,76	0,57	77,00	0,25
C3	<i>muc5 7b</i>	29,62	0,57	77,50	0,25
B4	<i>il4/13a 7a</i>	26,39	0,07	77,50	0,25
C4	<i>il4/13a 7b</i>	26,54	0,07	77,00	0,25
B5	<i>actb 7a</i>	17,30	0,36	78,50	0,00
C5	<i>actb 7b</i>	18,01	0,36	78,50	0,00
D2	<i>muc18 8a</i>	24,92	1,46	80,00	0,25
E2	<i>muc18 8b</i>	27,83	1,46	79,50	0,25
D3	<i>muc5 8a</i>	30,32	0,55	77,50	0,25
E3	<i>muc5 8b</i>	31,42	0,55	78,00	0,25
D4	<i>il4/13a 8a</i>	26,20	0,08	77,00	0,00
E4	<i>il4/13a 8b</i>	26,04	0,08	77,00	0,00
D5	<i>actb 8a</i>	16,85	0,02	79,00	0,00
E5	<i>actb 8b</i>	16,90	0,02	79,00	0,00
F2	<i>muc18 9a</i>	24,69	0,08	80,50	0,00
G2	<i>muc18 9b</i>	24,53	0,08	80,50	0,00
F3	<i>muc5 9a</i>	No Cq		69,00	4,75
G3	<i>muc5 9b</i>	30,19	0,00	78,50	4,75
F4	<i>il4/13a 9a</i>	24,33	0,38	80,50	1,25
G4	<i>il4/13a 9b</i>	25,09	0,38	78,00	1,25
F5	<i>actb 9a</i>	16,54	0,00	79,50	0,00
G5	<i>actb 9b</i>	16,54	0,00	79,50	0,00
B6	<i>muc18 10a</i>	26,37	1,00	79,50	0,75
C6	<i>muc18 10b</i>	24,37	1,00	81,00	0,75
B7	<i>muc5 10a</i>	31,58	0,32	77,00	0,25

C7	<i>muc5 10b</i>	30,95	0,32	77,50	0,25
B8	<i>il4/13a 10a</i>	27,15	0,37	76,50	0,25
C8	<i>il4/13a 10b</i>	26,41	0,37	77,00	0,25
B9	<i>actb 10a</i>	17,71	0,69	78,50	0,50
C9	<i>actb 10b</i>	16,34	0,69	79,50	0,50
D6	<i>muc18 11a</i>	24,49	0,14	80,50	0,00
E6	<i>muc18 11b</i>	24,76	0,14	80,50	0,00
D7	<i>muc5 11a</i>	29,75	0,21	77,50	0,25
E7	<i>muc5 11b</i>	29,33	0,21	78,00	0,25
D8	<i>il4/13a 11a</i>	26,72	0,02	77,50	0,00
E8	<i>il4/13a 11b</i>	26,67	0,02	77,50	0,00
D9	<i>actb 11a</i>	16,61	0,04	79,00	0,00
E9	<i>actb 11b</i>	16,53	0,04	79,00	0,00
F6	<i>muc18 12a</i>	23,79	0,12	81,00	0,25
G6	<i>muc18 12b</i>	24,02	0,12	80,50	0,25
F7	<i>muc5 12a</i>	27,80	0,00	78,00	6,50
G7	<i>muc5 12b</i>	No Cq		65,00	6,50
F8	<i>il4/13a 12a</i>	24,86	0,23	77,50	0,00
G8	<i>il4/13a 12b</i>	24,40	0,23	77,50	0,00
F9	<i>actb 12a</i>	16,23	0,13	79,50	0,00
G9	<i>actb 12b</i>	16,42	0,13	79,50	0,00
Negative Controls					
B11	neg <i>muc18</i>	No Cq		95,00	3,50
C11	neg <i>muc18</i>	32,71		88,00	3,50
D11	neg <i>muc5</i>	No Cq		65,00	1,50
E11	neg <i>muc5</i>	No Cq		68,00	1,50
F11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		68,00	0,25
G11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		67,50	0,25
B10	neg <i>actb</i>	No Cq		65,00	1,00
C10	neg <i>actb</i>	No Cq		67,00	1,00

Tabell A.8: Tabellen viser Ct- og Tm-verdier for qPCR-platen bestående av prøvene 1-6 under transport, samt standardavvik mellom parallellene. Ct- og Tm-verdiene ble direkte hentet fra softwaren, mens standardavvikene ble beregnet i Excel.

Well	Well Name	Cq ( $\Delta Rn$ )	SD Cq	Tm Product 1 ( $-Rn'(T)$ )	SD Tm
B2	<i>muc18 1a</i>	24,30	0,48	80,50	0,50
C2	<i>muc18 1b</i>	25,27	0,48	79,50	0,50
B3	<i>muc5 1a</i>	29,98	1,27	78,50	0,50
C3	<i>muc5 1b</i>	32,52	1,27	77,50	0,50
B4	<i>il4/13a 1a</i>	25,00	0,07	78,00	0,00
C4	<i>il4/13a 1b</i>	24,85	0,07	78,00	0,00
B5	<i>actb 1a</i>	17,50	0,48	78,50	0,45
C5	<i>actb 1b</i>	16,54	0,48	79,40	0,45
D2	<i>muc18 2a</i>	24,90	0,10	80,00	0,25

E2	<i>muc18 2b</i>	25,09	0,10	80,50	0,25
D3	<i>muc5 2a</i>	29,38	0,20	78,50	0,00
E3	<i>muc5 2b</i>	29,77	0,20	78,50	0,00
D4	<i>il4/13a 2a</i>	26,62	0,92	77,50	0,25
E4	<i>il4/13a 2b</i>	24,78	0,92	78,00	0,25
D5	<i>actb 2a</i>	16,85	0,07	79,50	0,25
E5	<i>actb 2b</i>	16,99	0,07	79,00	0,25
F2	<i>muc18 3a</i>	25,84	0,06	80,50	0,00
G2	<i>muc18 3b</i>	25,71	0,06	80,50	0,00
F3	<i>muc5 3a</i>	28,56	0,11	78,50	0,25
G3	<i>muc5 3b</i>	28,77	0,11	78,00	0,25
F4	<i>il4/13a 3a</i>	27,38	0,07	78,00	0,00
G4	<i>il4/13a 3b</i>	27,52	0,07	78,00	0,00
F5	<i>actb 3a</i>	17,94	0,44	79,50	0,25
G5	<i>actb 3b</i>	18,82	0,44	79,00	0,25
B6	<i>muc18 4a</i>	25,86	0,45	80,50	0,00
C6	<i>muc18 4b</i>	24,97	0,45	80,50	0,00
B7	<i>muc5 4a</i>	30,75	0,06	78,50	0,25
C7	<i>muc5 4b</i>	30,88	0,06	78,00	0,25
B8	<i>il4/13a 4a</i>	27,42	0,30	77,00	0,25
C8	<i>il4/13a 4b</i>	26,82	0,30	77,50	0,25
B9	<i>actb 4a</i>	17,41	0,23	79,00	0,00
C9	<i>actb 4b</i>	16,96	0,23	79,00	0,00
D6	<i>muc18 5a</i>	25,32	0,19	80,50	0,00
E6	<i>muc18 5b</i>	25,69	0,19	80,50	0,00
D7	<i>muc5 5a</i>	32,43	0,23	78,50	0,00
E7	<i>muc5 5b</i>	32,89	0,23	78,50	0,00
D8	<i>il4/13a 5a</i>	25,90	0,02	77,50	0,00
E8	<i>il4/13a 5b</i>	25,86	0,02	77,50	0,00
D9	<i>actb 5a</i>	18,02	0,32	78,50	0,25
E9	<i>actb 5b</i>	17,39	0,32	79,00	0,25
F6	<i>muc18 6a</i>	26,30	0,23	80,00	0,00
G6	<i>muc 18 6b</i>	26,76	0,23	80,00	0,00
F7	<i>muc5 6a</i>	31,91	0,34	78,50	0,00
G7	<i>muc5 6b</i>	32,59	0,34	78,50	0,00
F8	<i>il4/13a 6a</i>	27,65	0,43	77,00	0,25
G8	<i>il4/13b 6b</i>	26,79	0,43	77,50	0,25
F9	<i>actb 6a</i>	18,17	0,02	79,00	0,00
G9	<i>actb 6b</i>	18,14	0,02	79,00	0,00
Negative Controls					
B11	neg <i>muc18</i>	No Cq		67,00	1,75
C11	neg <i>muc18</i>	No Cq		70,50	1,75
D11	neg <i>muc5</i>	No Cq		74,50	4,75
E11	neg <i>muc5</i>	No Cq		65,00	4,75



F11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		67,00	1,00
G11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		65,00	1,00
B10	neg <i>actb</i>	No Cq		65,00	0,00
C10	neg <i>actb</i>	No Cq		65,00	0,00

Tabell A.9: Tabellen viser Ct- og Tm-verdier for qPCR-platen bestående av prøvene 7-12 under transport, samt standardavvik mellom parallellene. Ct- og Tm-verdiene ble direkte hentet fra softwaren, mens standardavvikene ble beregnet i Excel.

Well	Well Name	Cq ( $\Delta Rn$ )	SD Cq	Tm Product 1 (-Rn'(T))	SD Tm
B2	<i>muc18 7a</i>	24,69	0,17	81,00	0,25
C2	<i>muc18 7b</i>	24,36	0,17	80,50	0,25
B3	<i>muc5 7a</i>	31,47	0,32	78,50	0,00
C3	<i>muc5 7b</i>	30,83	0,32	78,50	0,00
B4	<i>il4/13a 7a</i>	25,78	0,24	78,00	0,00
C4	<i>il4/13a 7b</i>	25,30	0,24	78,00	0,00
B5	<i>actb 7a</i>	16,75	0,39	79,50	0,25
C5	<i>actb 7b</i>	15,97	0,39	80,00	0,25
D2	<i>muc18 8a</i>	25,70	0,39	80,50	0,25
E2	<i>muc18 8b</i>	24,93	0,39	81,00	0,25
D3	<i>muc5 8a</i>	31,75	0,03	79,00	0,25
E3	<i>muc5 8b</i>	31,80	0,03	78,50	0,25
D4	<i>il4/13a 8a</i>	26,12	0,04	77,50	0,25
E4	<i>il4/13a 8b</i>	26,04	0,04	78,00	0,25
D5	<i>actb 8a</i>	17,26	0,13	79,50	0,00
E5	<i>actb 8b</i>	17,01	0,13	79,50	0,00
F2	<i>muc18 9a</i>	26,33	0,06	81,00	0,25
G2	<i>muc18 9b</i>	26,20	0,06	80,50	0,25
F3	<i>muc5 9a</i>	32,85	0,04	78,50	0,25
G3	<i>muc5 9b</i>	32,78	0,04	79,00	0,25
F4	<i>il4/13a 9a</i>	27,99	0,17	78,00	0,00
G3	<i>il4/13a 9b</i>	27,64	0,17	78,00	0,00
F5	<i>actb 9a</i>	21,93	2,02	79,50	0,00
G5	<i>actb 9b</i>	17,88	2,02	79,50	0,00
B6	<i>muc18 10a</i>	26,36	0,16	81,00	0,25
C6	<i>muc18 10b</i>	26,68	0,16	80,50	0,25
B7	<i>muc5 10a</i>	31,69	0,00	78,50	4,50
C7	<i>muc5 10b</i>	No Cq		69,50	4,50
B8	<i>il4/13a 10a</i>	27,98	0,07	77,50	0,00
C8	<i>il4/13a 10b</i>	27,84	0,07	77,50	0,00
B9	<i>actb 10a</i>	18,33	0,05	79,50	0,00
C9	<i>actb 10b</i>	18,43	0,05	79,50	0,00
D6	<i>muc18 11a</i>	24,24	0,17	81,00	0,00
E6	<i>muc18 11b</i>	24,57	0,17	81,00	0,00
D7	<i>muc5 11a</i>	30,70	0,16	78,00	0,00

E7	<i>muc5 11b</i>	31,02	0,16	78,00	0,00
D8	<i>il4/13a 11a</i>	26,93	0,10	77,50	0,00
E8	<i>il4/13a 11b</i>	26,74	0,10	77,50	0,00
D9	<i>actb 11a</i>	16,09	0,30	79,50	0,25
E9	<i>actb 11b</i>	16,69	0,30	79,00	0,25
F6	<i>muc18 12a</i>	25,51	0,00	81,00	0,00
G6	<i>muc18 12b</i>	25,51	0,00	81,00	0,00
F7	<i>muc5 12a</i>	30,82	0,32	78,50	0,25
G7	<i>muc5 12b</i>	31,45	0,32	78,00	0,25
F8	<i>il4/13a 12a</i>	26,15	0,17	78,00	0,00
G8	<i>il4/13a 12b</i>	26,49	0,17	78,00	0,00
F9	<i>actb 12a</i>	17,11	0,12	79,50	0,00
G9	<i>actb 12b</i>	16,87	0,12	79,50	0,00
Negative Controls					
B11	neg <i>muc18</i>	No Cq		69,50	0,50
C11	neg <i>muc18</i>	38,57		70,50	0,50
D11	neg <i>muc5</i>	No Cq		69,00	1,00
E11	neg <i>muc5</i>	No Cq		71,00	1,00
F11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		67,00	1,00
G11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		65,00	1,00
B10	neg <i>actb</i>	No Cq		65,00	2,75
C10	neg <i>actb</i>	No Cq		70,50	2,75

Tabell A.10: Tabellen viser Ct- og Tm-verdier for qPCR-platen bestående av prøvene 1-6 etter transport, samt standardavvik mellom parallellene. Ct- og Tm-verdiene ble direkte hentet fra softwaren, mens standardavvikene ble beregnet i Excel.

Well	Well Name	Cq ( $\Delta R_n$ )	SD Cq	Tm Product 1 (-Rn'(T))	SD Tm
B2	<i>muc18 1a</i>	26,90	0,49	81,00	0,25
C2	<i>muc18 1b</i>	27,87	0,49	80,50	0,25
B3	<i>muc5 1a</i>	31,15	0,34	78,00	0,25
C3	<i>muc5 1b</i>	30,46	0,34	78,50	0,25
B4	<i>il4/13a 1a</i>	27,96	0,20	77,00	0,50
C4	<i>il4/13a 1b</i>	28,35	0,20	78,00	0,50
B5	<i>actb 1a</i>	18,48	0,15	78,50	0,50
C5	<i>actb 1b</i>	18,17	0,15	79,50	0,50
D2	<i>muc18 2a</i>	28,24	0,52	80,50	0,00
E2	<i>muc18 2b</i>	27,19	0,52	80,50	0,00
D3	<i>muc5 2a</i>	31,25	0,00	78,00	3,75
E3	<i>muc5 2b</i>	No Cq		70,50	3,75
D4	<i>il4/13a 2a</i>	28,42	0,02	78,00	0,00
E4	<i>il4/13a 2b</i>	28,38	0,02	78,00	0,00
D5	<i>actb 2a</i>	19,24	0,05	79,50	0,00
E5	<i>actb 2b</i>	19,14	0,05	79,50	0,00
F2	<i>muc18 3a</i>	26,92	0,08	80,50	0,25

G2	<i>muc18 3b</i>	27,08	0,08	81,00	0,25
F3	<i>muc5 3a</i>	30,77	0,12	79,00	0,25
G3	<i>muc5 3b</i>	30,54	0,12	78,50	0,25
F4	<i>il4/13a 3a</i>	29,09	0,31	78,00	0,00
G4	<i>il4/13a 3b</i>	29,71	0,31	78,00	0,00
F5	<i>actb 3a</i>	20,68	0,70	76,00	2,50
G5	<i>actb 3b</i>	19,28	0,70	81,00	2,50
B6	<i>muc18 4a</i>	26,51	0,08	81,00	0,00
C6	<i>muc18 4b</i>	26,35	0,08	81,00	0,00
B7	<i>muc5 4a</i>	29,75	0,66	78,50	0,00
C7	<i>muc5 4b</i>	31,08	0,66	78,50	0,00
B8	<i>il4/13a 4a</i>	28,61	0,09	78,00	0,00
C8	<i>il4/13a 4b</i>	28,79	0,09	78,00	0,00
B9	<i>actb 4a</i>	17,96	0,32	79,50	0,25
C9	<i>actb 4b</i>	18,60	0,32	79,00	0,25
D6	<i>muc18 5a</i>	26,97	0,01	81,00	0,00
E6	<i>muc18 5b</i>	26,94	0,01	81,00	0,00
D7	<i>muc5 5a</i>	29,41	0,22	78,50	0,00
E7	<i>muc5 5b</i>	29,85	0,22	78,50	0,00
D8	<i>il4/13a 5a</i>	26,73	0,04	78,00	0,00
E8	<i>il4/13a 5b</i>	26,66	0,04	78,00	0,00
D9	<i>actb 5a</i>	18,96	0,00	79,00	0,25
E9	<i>actb 5b</i>	18,96	0,00	79,50	0,25
F6	<i>muc18 6a</i>	26,39	0,17	81,00	0,00
G6	<i>muc18 6b</i>	26,73	0,17	81,00	0,00
F7	<i>muc5 6a</i>	30,75	0,38	79,00	0,25
G7	<i>muc5 6b</i>	31,51	0,38	78,50	0,25
F8	<i>il4/13a 6a</i>	28,51	0,32	77,50	0,25
G8	<i>il4/13a 6b</i>	29,14	0,32	78,00	0,25
F9	<i>actb 6a</i>	18,81	0,03	79,50	0,25
G9	<i>actb 6b</i>	18,86	0,03	79,00	0,25
Negative Controls					
B11	neg <i>muc18</i>	No Cq		69,00	0,25
C10	neg <i>muc18</i>	No Cq		68,50	0,25
D11	neg <i>muc5</i>	No Cq		79,00	1,50
E11	neg <i>muc5</i>	No Cq		76,00	1,50
F11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		67,50	1,25
G11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		65,00	1,25
B10	neg <i>actb</i>	No Cq		67,50	0,25
C11	neg <i>actb</i>	No Cq		67,00	0,25

Tabell A.11: Tabellen viser Ct- og Tm-verdier for qPCR-platen bestående av prøvene 7-12 etter transport, samt standardavvik mellom parallellene. Ct- og Tm-verdiene ble direkte hentet fra softwaren, mens standardavvikene ble beregnet i Excel.

Well	Well Name	Cq ( $\Delta Rn$ )	SD Cq	Tm Product 1 (-Rn'(T))	SD Tm
B2	<i>muc18</i> 7a	26,05	0,12	80,50	0,25
C2	<i>muc18</i> 7b	25,81	0,12	81,00	0,25
B3	<i>muc5</i> 7a	30,76	0,67	78,50	0,25
C3	<i>muc5</i> 7b	32,09	0,67	78,00	0,25
B4	<i>il4/13a</i> 7a	28,61	0,92	77,00	0,00
C4	<i>il4/13a</i> 7b	26,76	0,92	77,00	0,00
B5	<i>actb</i> 7a	17,91	0,40	79,00	0,25
C5	<i>actb</i> 7b	17,12	0,40	79,50	0,25
D2	<i>muc18</i> 8a	26,82	0,26	80,50	0,00
E2	<i>muc18</i> 8b	26,31	0,26	80,50	0,00
D3	<i>muc5</i> 8a	30,61	0,74	78,50	0,00
E3	<i>muc5</i> 8b	29,12	0,74	78,50	0,00
D4	<i>il4/13a</i> 8a	27,32	0,23	78,50	0,25
E4	<i>il4/13a</i> 8b	27,77	0,23	78,00	0,25
D5	<i>actb</i> 8a	17,04	0,91	79,50	0,00
E5	<i>actb</i> 8b	18,85	0,91	79,50	0,00
D10	<i>muc18</i> 9a	26,13	0,46	80,50	0,25
G2	<i>muc18</i> 9b	25,21	0,46	81,00	0,25
F3	<i>muc5</i> 9a	28,84	0,12	78,00	0,00
G3	<i>muc5</i> 9b	28,61	0,12	78,00	0,00
F4	<i>il4/13a</i> 9a	27,46	0,44	78,00	0,00
G4	<i>il4/13a</i> 9b	26,58	0,44	78,00	0,00
F5	<i>actb</i> 9a	17,24	0,30	79,50	0,25
G5	<i>actb</i> 9b	17,84	0,30	79,00	0,25
B6	<i>muc18</i> 10a	26,14	0,00	80,50	0,25
C6	<i>muc18</i> 10b	26,14	0,00	81,00	0,25
B7	<i>muc5</i> 10a	30,77	0,60	78,50	0,00
C7	<i>muc5</i> 10b	31,96	0,60	78,50	0,00
B8	<i>il4/13a</i> 10a	28,31	0,25	78,00	0,00
C8	<i>il4/13a</i> 10b	27,80	0,25	78,00	0,00
B9	<i>actb</i> 10a	17,95	0,31	79,00	0,25
C9	<i>actb</i> 10b	17,33	0,31	79,50	0,25
D6	<i>muc18</i> 11a	28,27	1,07	80,50	0,00
E6	<i>muc18</i> 11b	26,14	1,07	80,50	0,00
D7	<i>muc5</i> 11a	30,00	1,22	78,00	0,25
E7	<i>muc5</i> 11b	32,43	1,22	78,50	0,25
D8	<i>il4/13a</i> 11a	27,52	0,16	78,00	0,00
E8	<i>il4/13a</i> 11b	27,19	0,16	78,00	0,00
D9	<i>actb</i> 11a	17,93	0,00	79,50	0,25
E9	<i>actb</i> 11b	17,92	0,00	79,00	0,25
F6	<i>muc18</i> 12a	26,05	0,12	81,00	0,00
G6	<i>muc18</i> 12b	26,28	0,12	81,00	0,00
F7	<i>muc5</i> 12a	32,66	0,68	79,00	0,50

G7	<i>muc5</i> 12b	31,30	0,68	78,00	0,50
F8	<i>il4/13a</i> 12a	28,19	0,16	78,00	0,00
G8	<i>il4/13a</i> 12b	28,51	0,16	78,00	0,00
F9	<i>actb</i> 12a	16,28	0,00	81,50	7,00
G9	<i>actb</i> 12b	No Cq		67,50	
Negative Controls					
B11	neg <i>muc18</i>	37,92		69,50	2,25
C11	neg <i>muc18</i>	No Cq		65,00	2,25
D11	neg <i>muc5</i>	No Cq		80,00	0,25
E11	neg <i>muc5</i>	No Cq		80,50	0,25
F11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		70,00	2,50
G11	neg <i>il4/13a</i>	No Cq		65,00	2,50
B10	neg <i>Actb</i>	No Cq		65,00	0,00
C10	neg <i>Actb</i>	No Cq		65,00	0,00

## A.5 Beregning av rådata

Tabell A.12: Tabellen viser gjennomsnittlig Ct-verdi for parallellene på qPCR-brettet med prøvene 1-12 for transport, samt  $\Delta$ Ct-verdi for prøvene. Beregningene ble gjort i Excel.

Prøve nr.	Gen	Gjennomsnitt Cq	$\Delta$ Ct	Prøve nr.	Gen	Gjennomsnitt Cq	$\Delta$ Ct
1	<i>muc18</i>	28,01	8,98	7	<i>muc18</i>	26,53	8,88
1	<i>muc5</i>	33,33	14,30	7	<i>muc5</i>	30,19	12,54
1	<i>il4/13a</i>	27,48	8,45	7	<i>il4/13a</i>	26,47	8,81
1	<i>actb</i>	19,03		7	<i>actb</i>	17,66	
2	<i>muc18</i>	29,07	7,62	8	<i>muc18</i>	26,38	9,50
2	<i>muc5</i>	34,86	13,41	8	<i>muc5</i>	30,87	14,00
2	<i>il4/13a</i>	30,48	9,03	8	<i>il4/13a</i>	26,12	9,25
2	<i>actb</i>	21,45		8	<i>actb</i>	16,88	
3	<i>muc18</i>	27,17	8,31	9	<i>muc18</i>	24,61	8,07
3	<i>muc5</i>	28,15	9,28	9	<i>muc5</i>		
3	<i>il4/13a</i>	29,23	10,37	9	<i>il4/13a</i>	24,71	8,17
3	<i>actb</i>	18,87		9	<i>actb</i>	16,54	
4	<i>muc18</i>	34,53	7,35	10	<i>muc18</i>	25,37	8,35
4	<i>muc5</i>			10	<i>muc5</i>	31,27	14,24
4	<i>il4/13a</i>			10	<i>il4/13a</i>	26,78	9,76
4	<i>actb</i>	27,18		10	<i>actb</i>	17,03	
5	<i>muc18</i>	28,62	7,59	11	<i>Muc18</i>	24,63	8,06
5	<i>muc5</i>	33,62	12,59	11	<i>Muc5</i>	29,54	12,97
5	<i>il4/13a</i>	28,77	7,74	11	<i>il4/13</i>	26,70	10,13
5	<i>actb</i>	21,03		11	<i>actb</i>	16,57	
6	<i>muc18</i>	27,16	8,22	12	<i>Muc18</i>	23,91	7,58
6	<i>muc5</i>	32,98	14,04	12	<i>Muc5</i>		

6	<i>il4/13a</i>	28,03	9,09	12	<i>il4/13a</i>	24,63	8,31
6	<i>actb</i>	18,94		12	<i>actb</i>	16,33	

## A.6 t-test

Tabell A.13: Tabellen viser utregning av parvis t-test for å kontrollere om oppreguleringen av *muc18* var signifikant mellom prøvene tatt under og tre uker etter transport.

T-Test: Gjennomsnitt for to parvise utvalg		
	<i>muc18 Under</i>	<i>muc18 Etter</i>
Gjennomsnitt	-0,294166667	0,2325
Varians	0,328826515	0,558238636
Observasjoner	12	12
Pearson-korrelasjon	0,380579685	
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	11	
t-Stat	-2,435924327	
P(T<=t) ensidig	0,016530363	
T-kritisk, ensidig	1,795884819	
P(T<=t) tosidig	0,033060727	
T-kritisk, tosidig	2,20098516	
<b>Signifikant</b>		

Tabell A.14: Tabellen viser utregning av parvis t-test for å kontrollere om oppreguleringen av *muc5* var signifikant mellom prøvene tatt under og tre uker etter transport.

T-Test: Gjennomsnitt for to parvise utvalg		
	<i>muc5 Under</i>	<i>muc5 Etter</i>
Gjennomsnitt	1,256666667	0,213333333
Varians	1,679006061	2,174842424
Observasjoner	12	12
Pearson-korrelasjon	0,449901677	
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	11	
t-Stat	2,473860368	
P(T<=t) ensidig	0,015454438	
T-kritisk, ensidig	1,795884819	
P(T<=t) tosidig	0,030908876	
T-kritisk, tosidig	2,20098516	
<b>Signifikant</b>		

Tabell A.15: Tabellen viser utregning av parvis t-test for å kontrollere om oppreguleringen av il4/13a var signifikant mellom prøvene tatt under og tre uker etter transport.

T-Test: Gjennomsnitt for to parvise utvalg		
	<i>il4/13a Under</i>	<i>il4/13a Etter</i>
Gjennomsnitt	0,763333333	1,554166667
Varians	0,59189697	1,013626515
Observasjoner	12	12
Pearson-korrelasjon	0,390448056	
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	11	
t-Stat	-2,738619491	
P(T<=t) ensidig	0,009639484	
T-kritisk, ensidig	1,795884819	
P(T<=t) tosidig	0,019278969	
T-kritisk, tosidig	2,20098516	
<b>Signifikant</b>		

