

10015

10005

Hvordan virker sialinsyre hos Humant Rhinovirus 87, og kan sialinsyre stimulering påvirke veksten av viruset?

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Hanne Lillerovde Ørstenvik

Mai 2022

10015

10005

Hvordan virker sialinsyre hos Humant Rhinovirus 87, og kan sialinsyre stimulering påvirke veksten av viruset?

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Hanne Lillerovde Ørstenvik
Mai 2022

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



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

I denne oppgaven undersøkes det hvordan sialinsyre virker hos Humant Rhinovirus 87, og om sialinsyre stimulering påvirker veksten av viruset. Viruset forårsaker normalt en lett forkjølelse, men i enkelte tilfeller særlig hos barn, kan viruset forårsake alvorlig sykdomsforløp.

Prøvematerialet kom ferdig ekstrahert, og inneholdt virus som ble isolert med 0,0 mM, 0,4 mM, 1,2 mM eller 2,0 mM sialinsyre etter 0, 8, 24 og 48 timer. Vekstutviklingen ble sammenlignet mellom de ulike konsentrasjonene over en tidsperiode på 48 timer.

For å kunne studere endring i vekst dette ble det anvendt genekspressjonsanalysen RT-qPCR og instrumentet AriaMx Real-Time PCR-instrumentet ga ut rådata i form av Ct-verdier i et amplifiseringsplot. Ut i fra Ct-verdiene ble det laget en grafisk fremstilling av resultatene og ut Δ Ct-verdien mellom tidspunktene for samme konsentrasjon sialinsyre ble regnet ut. Dette skulle være til hjelp når den virale replikasjonsprosessen til viruset ble diskutert. For å bestemme deteksjonsgrensen til forsøket ble det kalibrert en 1:5 standardkurve for den positive prøven. Analysen var preget av høye standardavvik innad i parallellene, noe som tyder på manglende presisjon. Resultatene gir ikke noen klare svar på hvordan sialinsyre påvirker veksten og det er vanskelig å se noe sammenheng mellom hvordan veksten endrer seg med økende sialinsyre stimulering. Det ville vært hensiktsmessig å gjenta forsøket.

Abstract

This thesis study how sialic acid works in Human Rhinovirus 87, and whether sialic acid stimulation affects the growth of the virus. The virus normally causes a mild cold, but in some cases, especially in children, the virus can cause a serious course of the disease. The sample material was completely extracted and contained viruses which were isolated with 0.0 mM, 0.4 mM, 1.2 mM or 2.0 mM sialic acid after 0, 8, 24 and 48 hours. The growth development was compared between the different concentrations over a time period of 48 hours.

In order to study change in growth, the gene expression assay RT-qPCR was used and the instrument AriaMx Real-Time PCR instrument gave raw data in the form of Ct values in an amplification plot. Based on the Ct values, a graphical representation of the results was made and the Δ Ct value between the times for the same concentration of sialic acid was calculated. This should be helpful when discussing the viral replication process of the virus. To determine the detection limit of the experiment, a 1:5 standard curve was calibrated for the positive sample. The analysis was characterized by high standard deviations within the parallels, which indicates a lack of precision. The results do not give a clear answer on how sialic acid affects growth and it is difficult to see any connection between how growth changes with increasing sialic acid stimulation. It would be appropriate to repeat the experiment.

Forord

Bacheloroppgaven er skrevet av og tok sted ved NTNU Ålesund fra januar til mai 2022. Prosjektet er finansiert av Norges teknisk naturvitenskapelige universitet. Den praktiske delen av prosjektet ble utført fra 28. mars til 4. april. Gjennomførelsen hadde ikke vært mulig uten Hanne Lillerovde Ørstenvik, som bidro til faglig veiledning og støtte under hele prosjektet. Prosjektet utfordret oss til å jobbe selvstendig og reflektere over eget arbeid. Dette har bidratt til en enorm læring og mestringsfølelse. Sist men ikke minst en takk til alle foreleserne i løpet av disse tre årene, uten den kunnskapen og erfaringen de har gitt oss ville det ikke vært mulig å skrive denne oppgaven.

Prosjektet gikk ut på å se på hvordan sialinsyre virker hos Humant Rhinovirus 87, og hvordan ulik sialinsyre stimulering påvirker veksten over en tidsperiode på 48 timer. For å finne svar på dette ble det anvendt genekspresjonsmetoden RT-qPCR.

Figurliste

Figur 1: Illustrerer forskjellene mellom oppbygningen av RNA og DNA.....	4
Figur 2: Illustrerer forskjellen mellom ett-trinns og to-trinns RT-qPCR.....	9
Figur 3: Illustrerer hvilke reagenser som er nødvendig i to-trinns RT-qPCR.	10
Figur 4: Illustrerer de forskjellige trinnene i cDNA syntesen.....	14
Figur 5: Illustrerer hvordan en kan gjenkjenne de tre forskjellige fasene i et amplifiseringsplott..	15
Figur 6: Illustrerer et eksempel på hvordan Ct-verdien leses av, når terskelverdien er kjent.....	16
Figur 7: Kalibrert standardkurve for gjennomsnittlig Ct-verdi av duplikatene..	27
Figur 8: Figuren sammenligner vekstutviklingen til HRV 87 over en tidsperiode på 48 timer mellom konsentrasjonene 0,0 mM, 0,4 mM, 1,2 mM og 2,0 mM sialinsyre.....	30

Tabelliste

Tabell 1: Viser til navnet til de forskjellige prøvene, hvor lang tid før viruset ble isolert og hvilken konsentrasjon sialinsyre som tilsatt før isoleringen.	17
Tabell 2: Viser tilsatte reagenser for cDNA-syntesen, reagensenes volum (μ l) per reaksjon og det totale volumet.....	19
Tabell 3: Viser hvilke primere og prober som ble benyttet og nukleotidsekvensen fra 5'-3' retning. Modifisering og leverandører for primere og prober er også oppgitt.....	19
Tabell 4: Viser fremgangsmåten for fortynning av cDNA til positiv kontroll T0 (0,0 mM).	20
Tabell 5: Tilsatte reagenser ved preparering av prøve T0 (0,0 mM) for qPCR, for å danne standardkurven.....	22
Tabell 6: Tilsatte reagenser ved preparering av cDNA for qPCR.	22
Tabell 7: De ulike prøvene og deres cDNA konsentrasjonene etter endt cDNA syntese.....	25
Tabell 8: Viser en oversikt over antall fortynninger, fortynningsfaktorene, Ct-verdiene for parallellene og gjennomsnittlig Ct-verdi.	26
Tabell 9: Representerer Ct-verdiene til triplikatene for prøve T0, T1, T3 og T6 med 0,0 mM sialinsyre.	28
Tabell 10: Representerer Ct-verdiene til triplikatene for prøve T0, T1, T3 og T6 med 0,4 mM sialinsyre.	28
Tabell 11: Representerer Ct-verdiene til triplikatene for prøve T0, T1, T3 og T6 med 1,2 mM sialinsyre.	29
Tabell 12: Representerer Ct-verdiene til triplikatene for prøve T0, T1, T3 og T6 med 1,2 mM sialinsyre.	29
Tabell 13: Presenterer prøver og verdiene som ble mistenkt for å være uteliggere, hva resultatet av Dixon-test var og vurdering av testsvaret.	31
Tabell 14: Viser hvilke tider og konsentrasjoner som det regnes Δ Ct-verdi av.	32

Innholdsfortegnelse

Abstract	ii
Forord	iii
Figurliste	iv
Tabelliste	v
Forkortelser	1
1.0 Innledning	2
<i>1.1 Bakgrunn for valg av tema</i>	<i>2</i>
<i>1.2 Problemstilling</i>	<i>2</i>
2.0 Teori	3
<i>2.1 Virus</i>	<i>3</i>
<i>2.1.1 RNA</i>	<i>3</i>
<i>2.1.2 Humant Rhinovirus 87</i>	<i>4</i>
<i>2.1.3 Struktur</i>	<i>5</i>
<i>2.2 Sialinsyre</i>	<i>5</i>
<i>2.2.1 Sialinsyre som reseptor</i>	<i>6</i>
<i>2.3 Polymerasekjedereaksjon</i>	<i>7</i>
<i>2.3.1 Prinsippet til PCR</i>	<i>8</i>
<i>2.3.2 Forskjellige typer PCR</i>	<i>8</i>
<i>2.3.3 Reagenser til To-trinns RT-qPCR</i>	<i>10</i>
<i>2.3.4 Kontroller</i>	<i>12</i>
<i>2.3.5 Isolering av RNA</i>	<i>12</i>
<i>2.3.6 cDNA syntese</i>	<i>13</i>

2.3.7 Tolkning av qPCR.....	14
2.3.8 Standardkurve og deteksjonsgrense.....	16
3.0 Materialer og metoder.....	17
3.1 Prøvematerialet.....	17
3.2 To-trinns RT-qPCR.....	18
3.2.1 cDNA-syntese	18
3.2.2 qPCR primere og prober	19
3.2.3 Fortynningsrekke	19
3.2.4 Preparering av prøver til qPCR for standardkurve og analyse av prøver.	20
3.3 Analyse av relativ genekspressjon.....	22
4.0. Resultater	24
4.1 cDNA konsentrasjon.....	24
4.2 Standardkurve og deteksjonsgrense	25
4.3 Analyse av prøvene.....	27
4.3.1 Ct – verdiene.....	27
4.3.2 Dixon-Reed Test	30
4.2.3 Δ Ct-verdi	31
5.0. Diskusjon	33
5.1 cDNA syntese og Qubit.....	33
5.2 Standardkurve og deteksjonsgrense	34
5.3 Analyse av prøver.....	35
5.4 Tolkning av resultater.....	37
5.5 Feilkilder	40
5.6 Videre forskning	42

6.0. Konklusjon.....	44
7.0. Litteraturliste.....	45
A.0. Vedlegg.....	52
<i>A.1 Prosedyrer.....</i>	<i>52</i>
<i>A.1.1 Prosedyre for cDNA syntese</i>	<i>52</i>
<i>A.1.2 Prosedyre for å måle konsentrasjonen av cDNA med Qubit.....</i>	<i>55</i>
<i>A.1.3 Prosedyre for preparering av prøver til qPCR.....</i>	<i>58</i>
<i>A.2 Plateoppsett.....</i>	<i>59</i>
<i>A.2.1 Plateoppsett for preparering av prøver til qPCR for kalibrering av standardkurve- ...</i>	<i>59</i>
<i>A.2.2 Plateoppsett for preparering av prøver for analyse til qPCR.</i>	<i>60</i>
<i>A.3 Resultat av måling av cDNA konsentrasjon</i>	<i>62</i>

Forkortelser

°C: Grader celsius

Ct-verdi: Terskelnivå

De novo: På ny

DNA: Deoksyribonukleinsyre

dNTP: Deoksyribose nukleotidtrifosfat

dsDNA: Dobbeltrådet DNA

EV 68: Enterovirus 68

FAM: Fluorescein Amidite

HRV 87: Humant Rhinovirus 87

In vitro: På laboratoriet, prosessen foregår i et prøveglass

MGB probe: Minor groove binder probe

mM: Millimolar

Ng/ml: Nanogram per milliliter

nM: Nanomolar (10^{-9})

NTC: No Template Control

PCR: Polymerasekjedereaksjon

RNA: Ribonukleinsyre

ROX: Carboxyrhodamine

RT – qPCR: Revers Transkriptase – sanntids polymerasekjedereaksjon

ssDNA: Enkeltrådet DNA

qPCR: Sanntids polymerasekjedereaksjon

μM: Mikromolar

μL: Mikroliter

1.0 Innledning

1.1 Bakgrunn for valg av tema

I løpet av bachelorgraden har mange forskjellige fagfelt innenfor bioteknologi vært utforsket, som har gitt bred kunnskap. Flere forskjellige laboratorieteknikker og arbeidsmetoder har blitt prøvd ut i løpet av disse tre årene. RT-qPCR er en av de metodene som har blitt undervist og var et av de temaene som ga mersmak. Denne genekspressjonsanalysen er mye brukt for påvisning av virus ved sykdom og for å forstå hvordan virus oppfører seg ved en infeksjon. Etter pandemien har det blitt enda større fokus på virus og vaksiner her i landet, noe som har påvirket valget ytterligere. Det oppstår stadig nye virussykdommer, som en følge av hyppigere kontakt på tvers av landegrenser, noe som gjør qPCR til en svært relevant analysemetode i dagens samfunn. Det var derfor interessant å lære enda mer om virus og qPCR. I tillegg var det utrolig lærerikt å se hvor viktig det er med presisjon og god teknikk ved laboratoriearbeid. Alt i alt var dette god læring for forskningsprosjekter som senere kan dukke opp i arbeidslivet.

1.2 Problemstilling

«Hvordan virker sialinsyre hos Humant Rhinovirus 87 (HRV 87), og kan sialinsyre stimulering påvirke veksten av viruset?». Valget av problemstilling ble tatt med utgangspunkt til oppgaveteksten og forskningsartikler om replikasjonsprosessen til virus og sialinsyre som reseptor. Ut ifra problemstillingen var hensikten å kunne diskutere veksten av viruset og sammenligne den på tvers av ulike konsentrasjoner sialinsyre stimulering.

2.0 Teori

2.1 Virus

Virus er en obligat intracellulær parasitt, som består av korte sekvenser av nukleinsyrer. De kan infisere både cellene til prokaryote og eukaryote organismer, og er opphavet til mange sykdommer. Influensa og forkjølelse er de mest kjente sykdommene forårsaket av virus, og slike luftveissykdommer oppstår når virus påvirker respirasjonssystemet i kroppen. For at virus skal kunne infisere en celle, må den trenge inn i cellen til verten og reprodusere seg.

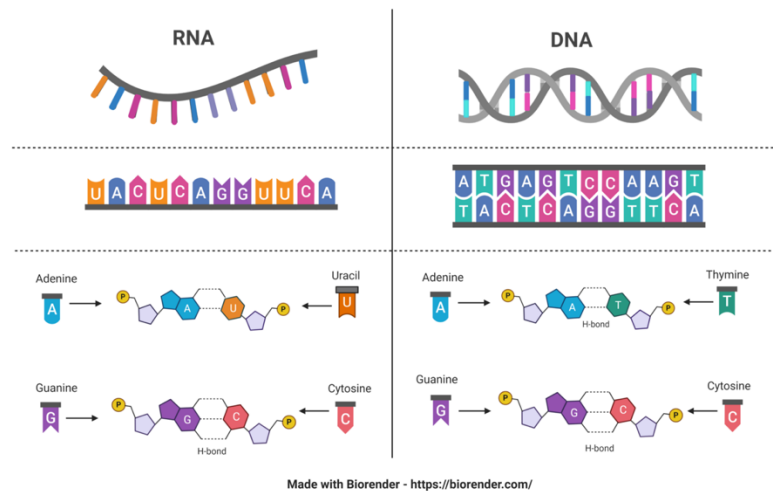
Celleinntrengelse skjer ved samhandlingen av virus og reseptor, og ved fravær av en reseptor på celleoverflaten vil ikke virus kunne trenge inn i en celle og forårsake infeksjon (1).

2.1.1 RNA

Alle virus har arvestoff i form av RNA eller DNA. I motsetning til DNA, som er bygget opp av nukleotider som danner to antiparallele tråder bundet sammen av hydrogenbindinger, er RNA en enkeltråd bygget opp av ribonukleotider. Ribonukleotidene består av sukkeret ribose, en nitrogenholdig base og en fosfatgruppe. Hvert nukleotid er bundet sammen til en enkeltråd av fosfodiesterbindinger. De fire nitrogenholdige basene i et RNA er adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og uracil (U). I DNA ville uracil vært byttet ut med tymin (T). RNA inneholder ribose istedenfor deoksyribose som finnes i DNA. Ribose, i motsetning til deoksyribose, har en hydroksylgruppe på karbon nr. 2, noe som gjør RNA mer reaktivt enn DNA. I likhet med DNA, finnes det en 3'-ende som består av en hydroksylgruppe og en 5'-ende som består av en fosfatgruppe. Det finnes flere typer RNA og de mest omtalte er mRNA, tRNA og rRNA. mRNA blir omtalt som «budbringer-RNA» og gir ut informasjon som ligger lagret i genene.

Informasjonen som er lagret i genene vil cellene bruke til å danne proteiner, noe som skjer ved translasjon (2).

Figur 1: Illustrerer forskjellene mellom oppbygningen av RNA og DNA. Øverst i figuren til venstre er enkelttrådet RNA og til høyre er dobbeltrådet DNA. Under er basene representert og hvordan disse binder seg til hverandre. Basene fungerer som byggeklosser i DNA/RNA-tråden som dannes. RNA inneholder uracil (u), i stedet for tymin (T) som er til stede i DNA. Hentet fra Store Medisinske Leksikon (3).



2.1.2 Humant Rhinovirus 87

Humant Rhinovirus (HRV) stammer fra slekten *Enterovirus* (EV), som tilhører familien *Picornavidae*. HRV er et RNA-virus som forårsaker luftveissykdommer hos mennesker, og smitter gjennom dråpesmitte. Viruset kommer inn i kroppen gjennom munn, nese og øyne. Epitelcellene som finnes på slimhinnen i nesen, vil være mest utsatt for infeksjoner forårsaket av dette viruset og er stedet hvor HRV 87 reproduseres. Til vanlig forårsaker viruset lett forkjølelse, men i enkelte tilfeller, særlig hos barn, kan dette viruset gi et alvorlig sykdomsforløp (4).

HRV 87 er den menneskelige utgaven av Enterovirus 68 (EV 68), noe som gjør det svært likt Enterovirus genetisk. Den genetiske likheten gjør at disse virusene har et felles sett med patogener, og kalles unike serotyper av HRV og EV (5, 6). Til forskjell fra de fleste Enterovirus er Humant Rhinovirus 87 og Enterovirus 68 syrefølsom, og ikke syreressistent. HRV 87 og EV 68 vil også trives i lavere temperaturer enn andre Enterovirus, som vanligvis har en optimal

temperatur rundt 37° C. Likhetene mellom disse to virusene, med tanke på syrestabilitet og luftveisinfeksjoner, har ført til at HRV 87 senere har blitt klassifisert som Enterovirus D68 (7, 8).

2.1.3 Struktur

Virus som tilhører *Picornavidae* familien er ikke-innkapslede virus, som betyr at de ikke har et lipidholdig lag rundt kapsidet. Et kapsid er et skall rundt arvestoffet som beskytter RNA fra nedbrytning under transport mellom cellene. HRV 87 har positivt enkelttrådet RNA ((+) ssRNA) som arvestoff, og dette arvestoffet kan fungere som mRNA direkte. I motsetning til (+) ssRNA, kan ikke (-) ssRNA fungere direkte som et mRNA. (+) ssRNA inneholder også bare gener som koder for smittsomhet, noe ikke (-) ssRNA gjør. For disse virusene må arvestoffet først omdannes til (+) ssRNA før translasjonen kan starte, derfor er ikke (-) ssRNA smittsom i seg selv (9).

HRV 87 er avhengig av celler for å kunne replikeres, og replikasjonen resulterer i mange nye kopier av mRNA. Samtidig som mRNA replikeres, dannes det fire virale strukturelle proteiner, VP1 til VP4, som kapsidet er bygget opp av. VP1 til VP3 befinner seg på overflaten av viruset, hvor VP1 er bindingsstedet der viruset og reseptoren samhandler. VP4 derimot befinner seg på innsiden av kapsidet og fungerer som et forankringspunkt som fester RNA i kjernen til kapsidet. De strukturelle proteinene bidrar også i celletropisme, som vil si at de velger spesifikke celletyper gjennom reseptorspesifisitet for å starte cellulære prosesser. I tillegg til strukturelle proteiner, består viruset av andre virale proteiner, som er ansvarlig for replikasjon og pakking av virioner. De syv ikke-strukturelle proteinene (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, og 3D) befinner seg inne i kapsidet og har signifikante egenskaper under replikasjonen av nye viruspartikler, for eksempel koder 2A proteinet for proteaseaktivitet som spalter polyprotein (10, 11).

2.2 Sialinsyre

Sialinsyre blir betegnet som en mannose, og finnes hovedsakelig i luftveier, tarmkanaler og i kjønnsorgan. Sukkeret består av ni karbonatomer og er plassert på enden av en glykankjede. Glykan er et polysakkarid og kan ha et karbohydrat, som for eksempel sialinsyre, bundet til seg for å danne et glykoprotein. Glykoproteiner er forankret til cellenes plasmamembran, og virus kan binde seg til glykoproteinkjeden for å trenge inn i celler. På den ene enden av sialinsyre

finnes det en aminosyre bundet til et pyruvat, mens på den andre siden er det en negativt ladet karboksylgruppe. Hos pattedyr er det to hovedgrupper sialinsyre: 2,3N - acetylneuraminsyre (Neu5Ac) og N - glykolylnneuraminsyre (Neu5Gc) (12, 13).

Sialinsyre bidrar i mange biologiske og patologiske prosesser i menneskekroppen. Plasseringen av sialinsyre, på enden av glykankjeden, gjør de godt egnet til å starte og regulere prosesser i kroppen. HRV 87 binder seg normalt til sialinsyre som er festet til glykankjeden gjennom en α 2-6-binding, som finnes i luftveisepitelet til mennesker. Viruset kan også binde seg til andre typer, slik som α 2-3 koblede sialinsyre, men dette er mindre vanlig (12, 14, 15). Sialinsyre har også mange andre roller i kroppen, som for eksempel strukturelle og funksjonelle roller. Blant annet har sialinsyre en negativ ladning, som gjør det mulig å danne hydrogenbindinger med vann. Denne evnen gjør at enterocytter og andre celletyper kan skape en ladningsfrastøtning, som forhindrer uønskede interaksjoner mellom celler i blodsirkulasjonen. Sialinsyre er også en viktig ligand for Siglec-familien, celleoverflateproteiner. Disse proteinene gjenkjenner og fester seg til glykan som inneholder sialinsyre, og bidrar i å regulere immunresponsen. Sialinsyre har med andre ord flere ulike og sentrale roller i menneskets helse og sykdomsutvikling (14, 16).

2.2.1 Sialinsyre som reseptor

En reseptor er et molekyl som mottar et signal fra en celle og kan påvirke en cellulærrespons. På reseptoren er det et bindingssted for molekyler og virus. Når viruset og reseptoren samhandler stimuleres reseptoren, følgende fører til at viruset kan trenge over plasmamembranen.

Celleinntrengelse for virus skjer vanligvis gjennom endocytose, hvor virus fra det ekstracellulære miljøet omslutes av cellemembranen og danner en innbuktning. Innbuktningen vil deretter avsnøres, for å danne et endosom som inneholder det endocyterte materialet. Enkelte ganger finnes det en proteinkappe rundt endosomet kalt clathrin, som bidrar i transporten av det endocyterte materialet over membranen. Inne i cytosol blir endosomet frigjort og brutt ned, for å slippe viruset ut. Viruset får da tilgang til replikasjonsmaskineriet (17, 18).

Sialinsyre fungerer som en virusreseptor, og er nødvendig for celleinntrengelse (19).

Kapsidproteinene på HRV 87 binder seg til bindingsstedet på α 2-6 bundet sialinsyre, som setter i gang en cellulærrespons. Særlig VP1 proteinet spiller en viktig rolle i bindingen. Bindingen av

sialinsyre og HRV 87 setter i gang prosessen endocytose, hvor viruset blir avsnørt til et endosom dekket av clathrin. Endosomet slippes ut i cytosol og inne i endosomet er det lav pH-verdi. Den lave pH-verdien og bindingen til reseptoren forårsaker konformasjonsendringer og nedbrytning av kapsidproteiner. VP1 vil vokse i størrelse og danne porer i endosomet, slik at det virale arvematerialet frigjøres ut til cytosol. Frem til nå har det ikke blitt dannet noen nye viruspartikler. RNA transporteres så videre inn til cellekjernen, hvor replikasjonen kan starte. Replikasjonen fører til dannelse av flere nye kopier av mRNA, samtidig kan replikasjonsprosessen føre til at infiserte celler dør gjennom programmert apoptose. Dette er en forsvarsrespons celler har ved infeksjon for å hindre at virus sprer avkomene sine, men flere virus har mekanismer for å unngå dette. Tiden frem til replikasjonen starter kalles en formørkelsesfase og da blir det ikke dannet noen nye viruspartikler (20).

Etter replikasjonen starter translasjonen, hvor nukleotidsekvensen på RNA blir oversatt til et polyprotein. Polyproteinene kuttes til separerte virusproteiner av proteaser, deretter pakkes virusproteinene sammen med RNA til umodne viruspartikler. Gjennom endringer på proteinsammensetningen til kapsidet hos de umodne viruspartiklene, modnes de til viruspartikler som kan infisere nye celler. De modne viruspartiklene, kalt virioner, består av et kapsid og nukleinsyrer i kjernen som koder for smittsomhet. Virioner er modne og ferdig pakke viruspartikler, som kan infisere celler. Cellene som inneholder virioner brytes deretter ned gjennom lysering, og slippes ut i det ekstracellulære miljøet for å infisere nye celler. Det vil på ny dannes virioner. Starten av infeksjonen frem til opphøringen av frigjørelsen av de nydannede viruspartiklene, kalles den latente perioden (9, 21, 22).

2.3 Polymerasekjedereaksjon

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en temperaturavhengig laboratorieteknikk og anvendes for å kopiere opp en bestemt mengde DNA-sekvenser. Reaksjonene finner sted i brønner eller PCR-strips, hvor innholdet er mastermix, primere, templat og nukleasefritt vann. Analysen foregår inne i et PCR-instrument. Vanlige bruksområder for PCR er diagnostikkanalyse for å påvise mutasjoner i et gen eller DNA-fingerprinting (23).

2.3.1 Prinsippet til PCR

PCR består av tre reaksjonstrinn: denaturering, initiering og elongering. Det starter med at mastermiksen og primere varmes opp med templatet til 94-98 °C. Dette fører til at trådene denatureres og går fra hverandre. Når trådene er separert, senkes temperaturen til 40-65 °C, for at primerne skal binde seg til hver sin ssDNA. I siste trinn økes temperaturen til 72 °C og kopiering av DNA starter. Den varmestabile polymerasen binder seg til primerne på 3'-enden og vil katalysere bindingen av dNTPer til den voksende tråden. Polymerasen setter med andre ord i gang oppkopieringen. Trinnene gjentas 30-45 ganger og oppkopieringen foregår eksponentielt. Mengden DNA fordobles for hver syklus frem til platåfasen er nådd (24, 25). I platåfasen termisk inaktiveres DNA-polymerasen og primere og/eller nukleotider brytes ned (26). Sluttproduktet vil være et bestemt antall kopier av DNA i et amplifiseringsplott, som viser akkumuleringen av produkt for hver syklus (24). PCR-instrument kalles en termisk sykler og består av en reaksjonsblokk, som har i oppgave å regulere temperaturene underveis gjennom de ulike trinnene. Prøvene plasseres på reaksjonsblokken, hvor temperaturendringer og antall sykluser programmeres i programvaren til PCR-instrumentet. Templatet kan merkes med en probe som gjør det mulig å registrere den i softwaren til instrumentet i sanntid. Inne i instrumentet er det et optisk deteksjonssystem som detekterer fluorescensen fra proben som er festet til templatet (27, 28).

2.3.2 Forskjellige typer PCR .

Det fins mange typer PCR, blant annet tradisjonell PCR, Real time PCR (qPCR) og Revers Transkripsjons-qPCR (RT-qPCR). qPCR og RT-qPCR er genekspressjonsanalyser, hvor det som oftest undersøkes endringer i genuttrykk. Ved tradisjonell PCR ser en kun på platåfasen for å finne ut hvor mange PCR-produkt som har blitt replikert og ingen probe kreves (29).

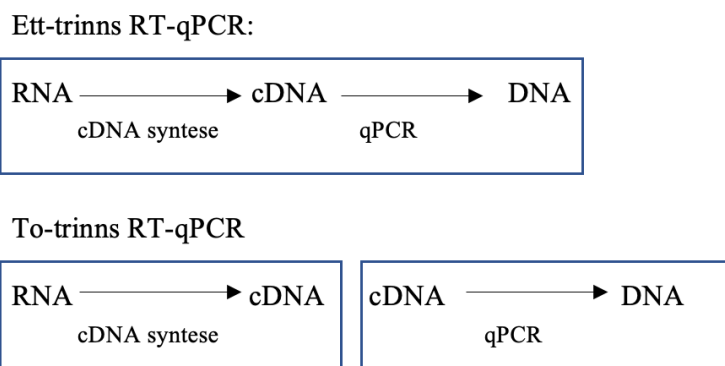
qPCR er en kvantitativ metode, hvor en analyserer når og hvor veksten er i endring.

Analysemetoden bygger på de samme prinsippene som tradisjonell PCR, men til forskjell brukes det et fluorescerende fargestoff for å kunne samle inn data i sanntid. Etter hver syklus blir qPCR amplikonet detektert ved hjelp av fluorescens fra en spesifikk probe eller et ikke fluorescerende fargestoff, som binder seg til et tilfeldig sted på DNA-sekvensen. Ved qPCR er utgangspunktet isolert DNA, som ikke har gått gjennom ytterligere bearbeiding (30).

RT-qPCR er en annen type genekspresjonsanalyse, og anvendes for å kvantifisere templat når utgangspunktet er RNA. Først blir RNA isolert fra viruset og gjort tilgjengelig for cDNA syntese gjennom ekstraksjon. Dette er nødvendig, grunnet at qPCR-instrumentet kun kan analysere DNA. Etter endt cDNA syntese kan cDNA analyseres videre i qPCR, som resulterer i en graf med relevant data (31). Ved RT-qPCR er mRNA den mest aktuelle formen av RNA (32).

Analysemetoden RT-qPCR utføres enten i ett eller to trinn (se figur 2). Under ett-trinns RT-qPCR vil revers transkripsjon og qPCR reaksjonene skje samtidig. I to-trinns RT-qPCR skjer revers transkripsjon og kvantifisering i to separerte systemer. cDNA-syntesen skjer i det første trinnet, hvor RNA omgjøres til cDNA. I det andre trinnet blir cDNA preparert til qPCR, for så bli analysert i qPCR -instrumentet. Ved å anvende ett-trinns RT-qPCR vil det være mindre eksperimentell variasjon siden begge reaksjonene finner sted i samme brønn, dermed vil forsøket være svært reproducerbart. To-trinns RT-qPCR gjør det mulig å lagre cDNA for senere bruk, gir mer fleksible primeralternativer og mulighet for å optimalisere de to reaksjonene hver for seg. Optimaliseringen fører til bedre spesifisitet og effektive reaksjoner (32, 33).

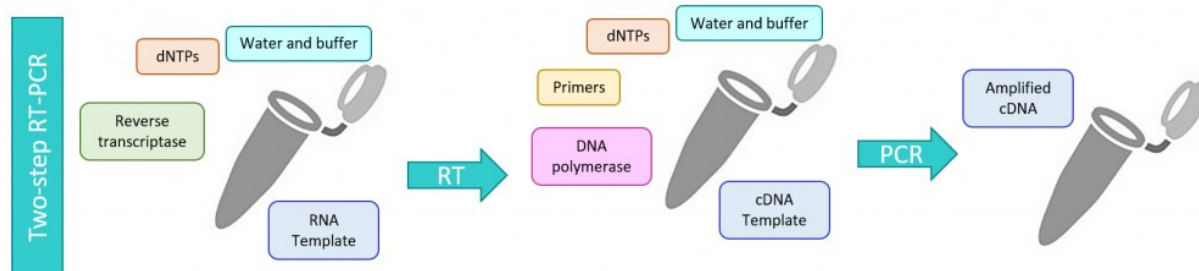
Figur 2: Illustrerer forskjellen mellom ett-trinns og to-trinns RT-qPCR. I ett-trinns RT-qPCR skjer revers transkripsjon og PCR i samme system, mens for to-trinns RT-qPCR skjer reaksjonene i to trinn (laget i word).



2.3.3 Reagenser til To-trinns RT-qPCR

En mastermikser er en ferdigblanding av PCR reagenser bestående av dNTPer, polymerase, salter (Magnesium, Mg^{2+}) og buffer. dNTP er en forkortelse for deoksyribose nukleotidtrifosfat og er kunstige nukleotider. De vanligste dNTPene er: dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og blir brukt som byggeklosser for å forlenge den voksende DNA tråden under for eksempel transkripsjonen av DNA ved qPCR. dNTP-ene binder seg til templatet ved hjelp av hydrogenbindinger (34, 35).

Figur 3: Illustrerer hvilke reagenser som er nødvendig i to-trinns RT-qPCR. I tillegg er det nødvendig med en probe under trinn to i RT-qPCR, for å kunne kvantifisere templat i sanntid. I trinn en skjer cDNA syntesen og i trinn to skjer preparering av prøver til qPCR. Resultatet er amplifisert cDNA. Hentet fra Cliniscienes (36).



Polymerase er en katalysator og startpunktet for syntesen av templat. Den åpner og beveger seg bortover på templatet, samtidig som den legger til dNTPer på den voksende komplementære tråden. Vanlig DNA polymerase blir denaturert av de høye temperaturene under PCR, som gjør at det er nødvendig med et varmestabilt enzym som tåler høyere temperaturer. Taq-polymerase er et slik varmestabilt enzym og er det mest brukte enzymet under PCR-amplifisering. Den optimale temperaturen for Taq-polymerase er $72^{\circ}C$, men for at polymerasen skal utøve sin aktivitet ved høyere temperaturer må magnesium eller andre salter være til stede i mastermiksen. Under temperaturreguleringen angriper polymerasen primerne på endene av tråden og kan kun syntetisere en ny tråd i 5' til 3' retning. Denne polymerasen anvendes under trinn to i to-trinns RT-qPCR (37, 38).

Revers transkriptase er en RNA avhengig DNA-polymerase og anvendes i cDNA syntese, som er det første trinnet ved to-trinns RT-qPCR. Polymerasen har i oppgave å omdanne RNA til DNA.

Det som er spesielt med revers transkriptase er at den bruker mRNA som mal for å syntetisere cDNA, derfor blir den kalt revers transkriptase. Revers transkriptase starter å syntetisere på 3'-enden av nukleotidsekvensen, der primerne er bundet, og jobber seg bortover til 5'enden (39). I tillegg har denne polymerasen et RNase H-område med endoribonukleaseaktivitet, som betyr at den bryter ned RNA når RNA og DNA fragmenter er bundet sammen (40, 41).

Mastermiksen inneholder også en buffer, som er en vandig løsning. Bufferen har i oppgave å hindre store endringer i pH. Den stabiliserer pH ved å ha en nøytraliserende evne når syrer/baser blir tilsatt. Uten tilsetning av buffer kunne eventuelle reaksjoner ha blitt svekket eller uønskede reaksjoner funnet sted grunnet ustabil pH. Ustabil pH kan føre til upålitelig resultat i forsøket (42).

Primere er korte DNA sekvenser, som regel på rundt 20 basepar, og vil være komplementær til DNA-templattråden. Primere fungerer som et startsted for polymerasen, som katalyserer bindingen av nukleotider (43). For at PCR analysen skal være vellykket, er det viktig at templatet har spesifikke primere og prober å feste seg til. Hvilke primere som anvendes varierer. Det kan tas i bruk tilfeldige heksamere, oligo (dT) primere eller gen spesifikke primere (40, 44). Det er viktig å optimalisere konsentrasjonen av primere, siden ulike primere utøver sin aktivitet ved ulike konsentrasjoner. For lav eller for høy konsentrasjon kan føre til feil ved primerbindingen eller forsinket amplifisering (45).

Prober er små fragmenter på rundt 100 til 1000 basepar av RNA eller DNA, og brukes for å registrere PCR-produktene underveis i analysen. Nukleotidsekvensen til probene er komplementære til målsekvensen og binder seg til for å avsløre tilstedeværelsen av mål-DNA eller -RNA. Vanligvis er probene markert med radioaktive isotoper eller med fluorescerende fargestoffer (46). Ved analyseringen av et spesifikt virus, finnes det spesifikke fluorescerende fargestoffer. I dette tilfellet anvendes det en MGB-probe for analyseringen av HRV 87, som er en type hydrolyseprobe. På proben sin 5' ende er det en spesifikk fluorofor, FAM (F), som gir ut et fluorescerende signal. I motsatt ende, på 3' enden, finnes det en quencher. Når både quencher og FAM er bundet til proben sendes det ikke ut noe fluorescerende signal. Under PCR amplifikasjonen blir proben degradert, slik at det skapes en avstand mellom quencher og FAM.

Separasjonen av quencheren og det spesifikke fluoroforet gir ut et fluorescerende signal, som er proporsjonal med mengden amplifisert PCR produkt (47).

2.3.4 Kontroller

Det anvendes kontroller for å kvalitetssikre analyseresultatene ved PCR, og for å overvåke om reaksjonene har foregått slik de skal. Negative kontroller er kontroller uten templat (NTC), og inneholder kun mastermik, primere og prober. Optimale negative kontroller skal ikke gi utslag i resultatet. Dette skal sikre at reagensene som er tilsatt ikke er blitt kontaminert eller at uønsket DNA-templat er til stede i prøvene (48).

De positive kontrollene skal gi ut et forventet resultat i amplifiseringen, som skal sørge for at fremgangsmåten, utstyret og reagensene fungerer som de skal. I motsetning til NTC, inneholder de positive kontrollene templat sammen med de andre reagensene. Det finnes både eksterne og interne kontroller. Eksterne kontroller inneholder ofte rene virusprøver, og brukes som standard. Interne kontroller skal blant annet indikere om rensingen av nukleinsyre er tilstrekkelig, om det er et amplifikasjonshemmende stoff til stede eller overvåke cDNA syntesen. Slike kontroller har med andre ord i oppgave å sikre at falske positive resultater utelukkes. Kontrollene blir brukt som en kvalitetskontroll, standard forhåndsbestemt kontrollprøve eller begge for å danne grunnlaget til amplifiseringsplotet (48-50).

Carboxyrhodamine (ROX) er et passivt fluorescerende fargestoff, som tilsettes i hver PCR-brønn. Det fluorescerende signalet til ROX påvirkes ikke av PCR reaksjonene, og er til stede for å normalisere forskjeller i fluorescensnivå. Forskjeller i fluorescensnivå er vanlig ved RT-qPCR, på grunn av at prøvene kan bli eksponert for bakgrunnsstøy. Små volum av reagenser kan svekke resultatet, derfor er det viktig å jobbe effektivt for å unngå luftbobler eller andre faktorer som kan påvirke fluorescensen til ROX. Med andre ord normaliserer ROX amplifikasjonsplottet (51, 52).

2.3.5 Isolering av RNA

Viral prøve isoleres før RNA kan ekstraheres. RNA-ekstraksjon er en laboratorieteknikk, hvor nukleinsyrene blir ekstrahert fra den virale prøven og som skal sikre at en høy nok konsentrasjon

av arvematerialet fra prøven blir med videre i forsøket. Isolering er nødvendig, grunnet at genuttrykket påvirkes av konsentrasjonen og kvaliteten på RNA (53).

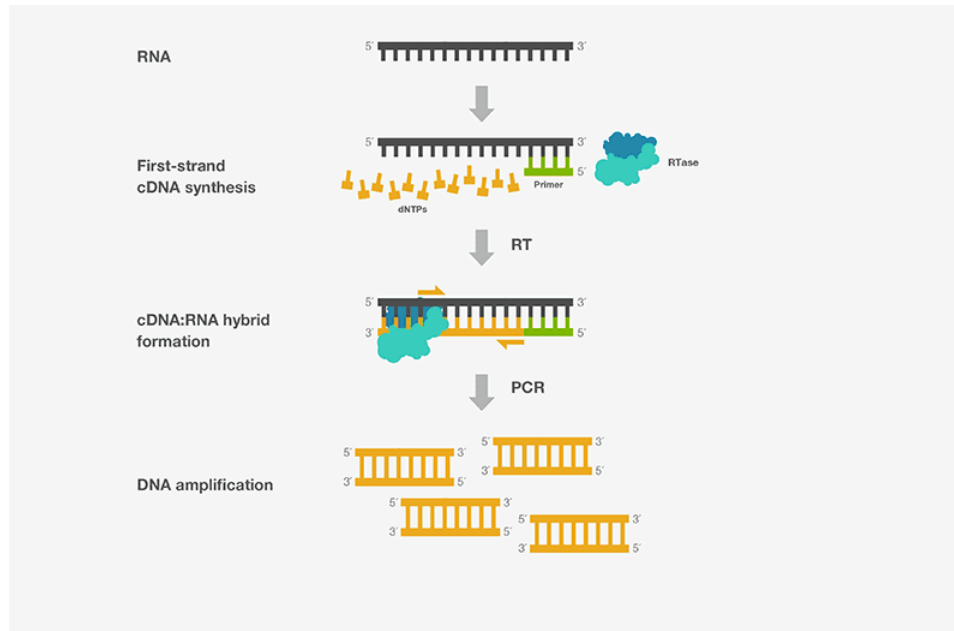
RNA ekstraheres ved at cellemembranen til viruset brytes ned og cellekomponentene blir tilgjengelig. Videre vaskes RNA, for å felle ut uønsket materiale som kan interferer med reagensene under cDNA syntese eller qPCR. Etter endt ekstraksjon sitter en igjen med konsentrert RNA. Isoleringsdelen av laboratoriearbeidet er ofte kritisk, grunnet at forurensinger og et for lite volum av RNA isolert svekker sluttresultatet (53, 54).

2.3.6 cDNA syntese

For at virus skal kunne analyseres i qPCR, må ekstrahert mRNA konverteres til den mer stabile formen; DNA, ved en prosess kalt revers transkripsjon eller cDNA syntese (35). cDNA står for komplementært DNA, og er komplementært til mRNA som originalt ble hentet ut. I motsetning til geonomisk DNA som inneholder eksoner og introner, inneholder cDNA kun eksoner, den kodende delen av nukleotidsekvensen. cDNA vil være mer stabilt og effektivt å jobbe med enn RNA, grunnet at DNA ikke blir brutt ned av RNase i luften (55, 56).

cDNA syntesen starter med at isolert mRNA, blir brukt som mal for å danne en komplementærtråd. På enden av RNA fester det seg korte primere som er komplementær til 3'enden. Videre starter og katalyserer revers transkriptase transkripsjonen av den komplementære DNA tråden og bindingen av dNTPer. Bindingene mellom den nysyntetiserte tråden og RNA templatet brytes ned av RNase H. DNA polymerase kan dermed katalysere syntesen av en ny DNA tråd, i trinn to i RT-qPCR, som er komplementær til DNA templatet. Resultatet vil bli dobbeltrådet DNA (57, 58).

Figur 4: Illustrerer de forskjellige trinnene i cDNA syntesen. En starter med enkelttrådet mRNA, hvor det festes dNTP og primere. Videre jobber revers transkriptase seg bortover den enkle tråden, for å danne en komplementær DNA-tråd. Til slutt fjernes DNA-tråden fra mRNA, og ny DNA tråd syntetiseres. Resultatet blir dobbeltrådet DNA. Hentet fra Microbiologynotes (59).

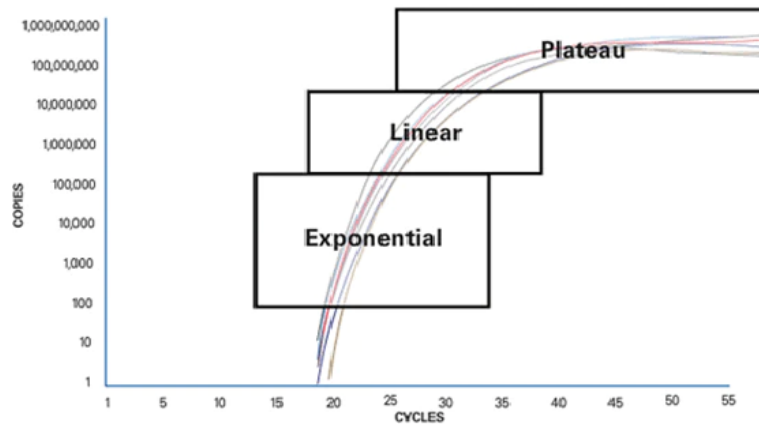


2.3.7 Tolkning av qPCR

qPCR gir ut et amplifiseringsplott, som kan deles inn i tre faser: eksponentiell-, lineær- og platåfasen. Disse tre fasene blir synlig ved bruk av et fluorescerende reseptormolekyl. Mengden fluorescens er proporsjonal med mengden qPCR-produkt for hver syklus (30).

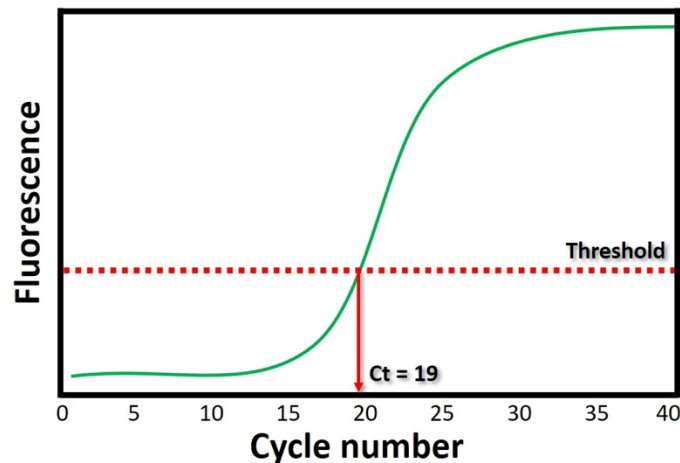
1. Den eksponentielle fasen er den første fasen, hvor alle reagensene er tilsatt. Fasen karakteriseres med at veksten fordobles for hver syklus, noe som skyldes at reagensene er lett tilgjengelig. Før den eksponentielle fasen, gir de første syklusene ut et bakgrunnssignal.
2. Den andre fasen er den lineære fasen, hvor veksten først varierer noe mer enn tidligere, før den begynner å avta. Grunnen til at veksten avtar er at mindre reagenser er tilgjengelig, og oppkopieringen avtar.
3. Under den siste fasen, platåfasen, jevnes veksten ut. Det dannes ikke lenger nye PCR-produkt, på grunn av at det ikke lenger er reagenser tilgjengelig (30).

Figur 5: Illustrerer hvordan en kan gjenkjenne de tre forskjellige fasene i et amplifiseringsplott. Hentet fra Thermofisher (60).



Terskelverdien er det punktet i analysen der antall kopier av prøven er høy nok til å gå over bakgrunnsstøyet og signaliseres i plottet. De første PCR-reaksjonene gir ut et for lavt fluorescerende signal, og blir definert som bakgrunnsstøy. Terskelverdien skal derfor ligge rundt midten av den eksponentielle fasen (61). Ct-verdien står for syklusterskelverdi, som sier noe om antall sykluser før amplifiseringen av templatet er sterk nok til å gå over terskelverdien og over i den eksponentielle fasen. De reaksjonene som går over terskelverdien, vurderes som positive. Det er altså Ct-verdien som er kritisk i en slik analyse. En høy Ct-verdi indikerer lave konsentrasjoner av arvematerialet i prøven, dermed lav andel virus. Ved lavere Ct-verdier er det høyere konsentrasjoner av templatet, som betyr større andel virus (62).

Figur 6: Illustrerer et eksempel på hvordan Ct-verdien leses av, når terskelverdien er kjent. Ct-verdien ligger i krysningpunktet mellom terskelverdien og grafen, i dette eksempelet er Ct-verdien lik 19. Ct-verdien viser hvor mange sykluser det tar før prøven krysser threshold (terskelverdien), derfor er ikke terskelverdien konstant. Ct-verdien vil ha en sammenheng med den fluorescerende delen av grafen, desto flere sykluser, jo høyere fluoriserendesignal registreres av prøven i amplifiseringsplottet. Hentet fra Toptipbio (63).



2.3.8 Standardkurve og deteksjonsgrense

En standardkurve er et verktøy innen qPCR for å se på effektiviteten, og gir en indikasjon på reproduserbarheten til en qPCR-analyse. I MIQE-retningslinjer blir kalibreringen av standardkurven definert som et krav. For å danne standardkurven blir det satt opp en fortynningsrekke, for så å plote Ct-verdiene på y-aksen mot konsentrasjonen oppgitt i logaritmer på x-aksen. Ct-verdien kan ikke overstige 40. Ut i fra standardkurven finner en den laveste konsentrasjonen, hvor 95% av de positive prøvene påvises. Denne grensen blir kalt for Limit of Detection (LoD). Det er ikke mulig å få en LoD på mindre enn 3 kopier per qPCR. Resultater som er lavere enn den mest sensitive deteksjonsgrensen skal ikke brukes i videre (64).

Ut ifra standardkurven kan en fastslå korrelasjons koeffisienten, R^2 , som gir en indikasjon på lineariteten til standardkurven og hvordan punktene er plassert i forhold til hverandre. Ideelt sett skal R^2 -verdien være så nærme 1 som mulig, og er da fullstendig korrelert. Den laveste verdien som er akseptert i qPCR er 0,99 (64, 65).

3.0 Materialer og metoder

3.1 Prøvematerialet

Ferdig isolert mRNA av Humant Rhinovirus 87 (ATCC) ble hentet fra frosne suspensjoner og ble dyrket med ulike konsentrasjoner sialinsyre (Neu5Ac). Ekstraksjonen var utført på forhånd, og det ble utlevert ferdig ekstrahert mRNA. Prosedyren RNasy Plus mini kit fra Qiagen (ID: 74134/36, Qiagen) ble brukt for ekstrahering av RNA. Isoleringen ble utført på fire forskjellige tidspunkter. Under selve isoleringen ble cellene lysert for å bryte ned cellemembranen, som gjorde cellekomponentene tilgjengelig. Videre ble RNA rensset og lagret på -80 °C. I *tabell 1* er det en oversikt over de utleverte prøvene.

Tabell 1: Viser til navnet til de forskjellige prøvene, hvor lang tid før viruset ble isolert og hvilken konsentrasjon sialinsyre som tilsatt før isoleringen.

Prøve	Tid (timer)	Konsentrasjon sialinsyre (mM)
T0 (0,0 mM)	0	0,0
T0 (0,4 mM)	0	0,4
T0 (1,2 mM)	0	1,2
T0 (2,0 mM)	0	2,0
T1 (0,0 mM)	8	0,0
T1 (0,4 mM)	8	0,4
T1 (1,2 mM)	8	1,2
T1 (2,0 mM)	8	2,0
T3 (0,0 mM)	24	0,0
T3 (0,4 mM)	24	0,4
T3 (1,2 mM)	24	1,2
T3 (2,0 mM)	24	2,0
T6 (0,0 mM)	48	0,0
T6 (0,4 mM)	48	0,4
T6 (1,2 mM)	48	1,2
T6 (2,0 mM)	48	2,0

3.2 To-trinns RT-qPCR

3.2.1 cDNA-syntese

qScript® cDNA Synthesis Kit (ID: 95047, QuantaBio) (*vedlegg A.1.1*) ble benyttet for cDNA syntese av ferdig ekstrahert mRNA. Det ble funnet frem 16 0,2 mL PCR-rør, og reagensene ble tint og satt på is. Det var viktig å vortexe og spinne reagensene før bruk. Mastermiksen ble laget ut ifra *tabell 2* i PCR-rør, og bestod av qScript Reaction Mix, qScript Revers Transkriptase og nukleasefritt vann. Etterfulgt av mastermiksen, ble mRNA tilsatt i hvert rør til et totalvolum på 20 µL. Rørene ble deretter vortexet og sentrifugert, slik at prøvematerialet samlet seg på bunnen. Det ble satt opp 16 reaksjoner og en parallell per prøve. Prøveoppsettet er illustrert i *tabell 1*, *vedlegg A.1.1*. Til slutt ble prøvematerialet satt inn i varmeblokken til 2720 Termosykler (Applied Biosystems), hvor cDNA syntesen ble utført. Programmet som ble brukt til varmeblokken er oppgitt i *vedlegg A.1.1*. Tillaget cDNA ble overført til eppendorfrør, merket med prøve og lagret ved -80 °C.

Kvalitetssikring av cDNA-syntesen ble gjort ved å kvantifisere cDNA konsentrasjonen på Qubit 4.0 Fluorometer. Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) assay kit (ID: Q33230, Invitrogen) (*vedlegg A.1.2*) ble brukt for utarbeidelse av prosedyren. Det ble anvendt ferdig laget working solution og to standarder for å kalibrere Qubit 4.0 fluorometeret. For å kunne detektere konsentrasjonene i fluorometeret ble det tilsatt 195 µl working solution og 5 µl prøve i qubitør. Det var viktig å inkubere prøvene og standardene sammen med working solution i 2 min før de ble satt inn i fluorometeret. I *tabell 9*, *vedlegg A.3* er det oppgitt konsentrasjonene fra Qubit Fluorometeret.

Tabell 2: Viser tilsatte reagenser for cDNA-syntesen, reagensenes volum (μl) per reaksjon og det totale volumet.

Reagenser	Volum (μl) per reaksjon
QScript Reaction Mix	4 μl
QScript Revers Transcriptase	1 μl
Nukleasefritt vann	14 μl
RNA templat (prøvemateriale)	1 μl
Totalt volum	20 μl

3.2.2 qPCR primere og prober

Ved qPCR er det anvendt optimaliserte primere og prober gjennom NCBI sine krav (66). For analysering av spesifikke virus er det designet egne forward- og revers primere. I tillegg anvendes det en MGB hydrolyse probe, som er hyppig brukt i RT-qPCR. Ved å bruke en slik type probe har en lavere støy, som gir bedre kvantifisering (67, 68).

Tabell 3: Viser hvilke primere og prober som ble benyttet og nukleotidsekvensen fra 5'-3' retning. Modifisering og leverandører for primere og prober er også oppgitt.

Primer Probe	Sekvens 5' – 3'	Modifikasjon	Leverandør
Forward primer	TAC GCA CCA CTT TAC GCA GT	-	Invitrogen
Reverse primer	TCC TGG GGA GCC GTG TAT TA	-	Invitrogen
MGB probe	TCC AAA TCT CGC ATT GAA CCG GT	NFQ, MGB	Applied Biosystem UK

3.2.3 Fortynningsrekke

Standardkurven ble kalibrert ved å sette opp en 1:5 fortynningsrekke med syv fortynninger, hvor prøve T0 (0,0 mM) ble anvendt som templat. I tabell 4 er fremgangsmåten forklart trinn for trinn. Først ble prøve T0 (0,0 mM) overført til et eppendorfrør markert; uten fortynning. Videre

ble 2 µl av prøven i eppendorfrøret markert med uten fortynning overført til eppendorfrøret markert med fortynning 1. 2 µl av fortynning 1 ble så overført til eppendorfrøret markert med fortynning 2, og dette ble gjentatt frem til fortynning 7. Alle eppendorfrørene med fortynningene inneholdt også 8 µl nukleasefritt vann før templatet ble tilsatt. Det var viktig å vortexe og sentrifugere mellom hver fortynning. Etter dette var prøvene klare for å bli preparert til qPCR for å kalibrere standardkurven. Ut ifra standardkurven ble LoD og linearitet bestemt.

Tabell 4: Viser fremgangsmåten for fortynning av cDNA til positiv kontroll T0 (0,0 mM).

Anvendes nukleasefritt vann for å fortynne prøven. Fortynning (F).

Uten fortynning	Fortynning 1	Fortynning 2	Fortynning 3	Fortynning 4
Tilsett 10 µL DNA prøve uten fortynning T0 (0,0 mM)	Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL DNA prøve fra uten fortynning Vortex	Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL fra F1 Vortex	Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL fra F2 Vortex	Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL fra F3 Vortex
Fortynning 5	Fortynning 6	Fortynning 7		
Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL fra F4 Vortex	Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL fra F5 Vortex	Tilsett 8 µL Nukleasefritt vann + 2 µL fra F6 Vortex		

3.2.4 Preparering av prøver til qPCR for standardkurve og analyse av prøver.

Preparering av prøver til qPCR ble utført i henhold til PerfeCTA®FastMix® II, Low ROX™ (ID: 95120-250, QuantaBio) på 96-brønns plater tilpasset AriaMx, qPCR instrumentet. Utklippet i vedlegg A.1.3 beskriver arbeidsflyten. Det ble satt opp duplikater for kalibrering av standardkurven, mens for preparering av prøver til qPCR-analysen ble det satt opp triplikater på PCR-plater med 96 brønner. Hver qPCR kjøring til analysen av HRV 87 inneholdt fire prøver

med likt tidspunkt, men med ulik konsentrasjon sialinsyre og NTC. Plateoppsettet for både standardkurven og de ulike prøvene er illustrert i *tabell 4-8, vedlegg A.2*.

For preparering av prøver ble reagensene og templatet først tint, for så å bli satt på is. Det var viktig å vortexe og sentrifugere reagensene før bruk. Reagensene for preparering av prøver til standardkurve og analyse av prøver er oppgitt i *tabell 5 og 6*. Mastermikks, primer, prober og nukleasefritt vann ble tilsatt i et eppendorfrør. Reagensene med høyest volum ble tilsatt først. Volumet av reagensene for preparering av prøver til qPCR for kalibrering av standardkurve skulle tilsvare 16 reaksjoner, mens for preparering av prøver til qPCR for analyse skulle volumet tilsvare 15 reaksjoner. Eppendorfrørene med mastermiksen, primere og proben ble deretter vortexet og sentrifugert for å blande reagensene godt. Ut ifra fortynningsformelen, $c_1 \cdot v_1 = c_2 \cdot v_2$, ble volumet av primer og prober tilsatt regnet ut.

Videre ble en PCR-plate med 96 brønner funnet frem, og blandingen i eppendorfrøret ble overført til brønnene på PCR-platen. Deretter ble DNA-templatet tilsatt i hver av brønnene til et totalvolum på 15 μ l. For preparering av prøver til standardkurve ble det tilsatt 2 μ l, mens til preparering av prøver til analysen ble det tilsatt 1 μ l templat til hver brønn. Til slutt ble PCR-platene dekket med plastfilm og sentrifugert i platespinneren, før de ble plassert i reaksjonsblokken til qPCR-instrumentet. PCR-analysene ble utført på AriaMx Real-Time PCR-instrumentet og den tilhørende programvaren (Agilent). Plateoppsettet ble registrert i instrumentets programvare, og qPCR kjøringene ble programmert etter Fast 2-Step Cycling (*vedlegg A.1.3*) Det ble totalt gjennomført en kjøring for kalibrering av standardkurve og fire kjøring for analysen av prøvene.

Tabell 5: Tilsatte reagenser ved preparering av prøve T0 (0,0 mM) for qPCR, for å danne standardkurven. Volumet er oppgitt i μl . Startkonsentrasjonen til primerne og proben er oppgitt i μM og sluttkonsentrasjonen er oppgitt i nM.

Reagenser	Volum (μl) per reaksjon	Konsentrasjon
PerfeCTa FastMix II Low ROX	7,5 μl	1X
Forward primer (5 μM)	0,9 μl	300 nM
Revers primer (5 μM)	1,2 μl	400 nM
Probe (2,5 μM)	1,8 μl	300 nM
DNA templat	2 μl	
Nuklease-fritt vann	1,6 μl	
Totalt volum	15 μl	

Tabell 6: Tilsatte reagenser ved preparering av cDNA for qPCR. Volumet er oppgitt i μl . Startkonsentrasjonen til primerne og proben er oppgitt i μM og sluttkonsentrasjonen er oppgitt i nM.

Reagenser	Volum (μl) per reaksjon	Konsentrasjon
PerfeCTa FastMix II Low ROX	7,5 μl	1X
Forward primer (5 μM)	0,9 μl	300 nM
Revers primer (5 μM)	1,2 μl	400 nM
Probe (2,5 μM)	1,8 μl	300 nM
DNA templat	1 μl	
Nuklease-fritt vann	2,6 μl	

3.3 Analyse av relativ genekspressjon

Deteksjonen av Ct -verdiene ble gjort automatisk av AriaMx Real-Time PCR instrumentet. Ct-verdiene for de forskjellige konsentrasjonene og tidsperiodene ble satt inn i en tabell i Microsoft® Excel. Gjennomsnittet av Ct-verdiene og standardavvikene mellom to og to

paralleller ble bestemt. Det ble utført en uteligger test (Dixon Reeds test) av verdiene som var svært høye for å finne ut om de var akseptert eller om de skulle forkastes. Til slutt ble ΔC_t mellom de forskjellige konsentrasjonene regnet ut.

4.0. Resultater

Presentasjonen av resultatene er hentet fra 16 forskjellige prøver som har blitt tilsatt fire ulike konsentrasjoner av sialinsyre, 0,0 mM, 0,4 mM, 1,2 mM eller 2,0 mM, og isolert etter fire forskjellige tidspunkter, 0, 8, 24 og 48 timer. Ct-verdiene presentert i *tabell 9 til 12*, er hentet fra programvaren til AriaMx og gir grunnlaget for dataanalysen. Videre presenteres Δ Ct-verdiene mellom forskjellige tidspunkter med samme konsentrasjon sialinsyre.

4.1 cDNA konsentrasjon

I *Tabell 7* presenteres cDNA konsentrasjonene i prøvene målt med Qubit 4.0 fluorometeret etter fullført cDNA syntesen. Det ble målt varierende mengde cDNA konsentrasjon for de forskjellige prøvene og konsentrasjonen var oppgitt i $\mu\text{g/ml}$

Tabell 7: De ulike prøvene og deres cDNA konsentrasjonene etter endt cDNA syntese målt med Qubit 4.0 er fremstilt. Konsentrasjonen av cDNA er oppgitt i $\mu\text{g/ml}$.

Prøve Tid (T), Konsentrasjon (mM)	Konsentrasjon av cDNA ($\mu\text{g/mL}$)
T0 (0,0 mM)	5,59
T0 (0,4 mM)	6,71
T0 (1,2 mM)	7,05
T0 (2,0 mM)	8,16
T1 (0,0 mM)	4,9
T1 (0,4 mM)	5,38
T1 (1,2 mM)	4,78
T1 (2,0 mM)	3,96
T3 (0,0 mM)	5,11
T3 (0,4 mM)	5,13
T3 (1,2 mM)	3,25
T3 (2,0 mM)	5,6
T6 (0,0 mM)	5,75
T6 (0,4 mM)	5,11
T6 (1,2 mM)	6,38
T6 (2,0 mM)	4,95

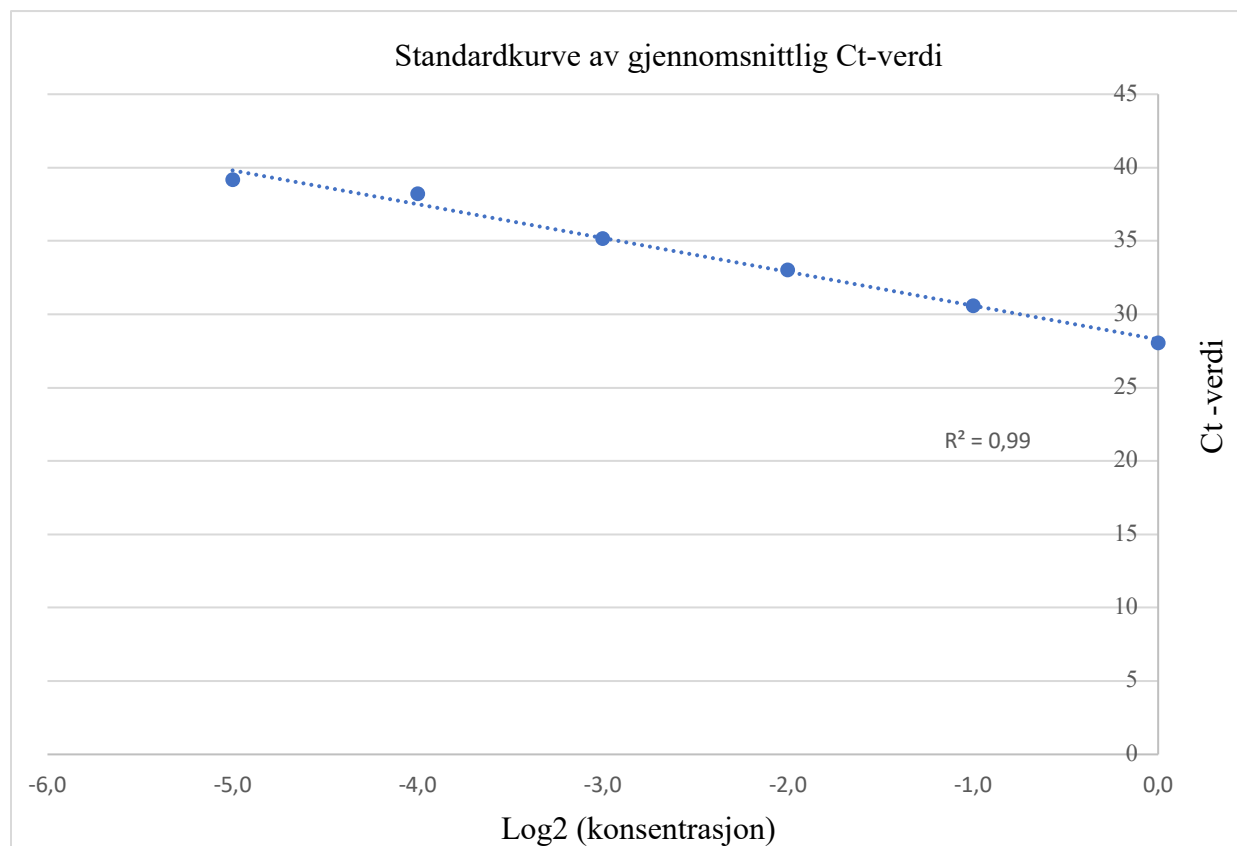
4.2 Standardkurve og deteksjonsgrense

Standardkurven er kalibrert ut ifra gjennomsnittet til duplikatene, og er oppgitt i *tabell 8*. Ct-verdien stiger for økende fortytning, unntatt for parallell 1. Der økte Ct-verdien frem til fortytning 4, etterfulgt av en lavere verdi ved fortytning 5. I *figur 7* vises den kalibrerte standardkurven for gjennomsnittlig Ct-verdi. Fortytning 4, med en gjennomsnittlig Ct-verdi på 38,2, ble bestemt til å være deteksjonsgrensen i forsøket. R^2 -verdien ble bestemt til 0,99. cDNA konsentrasjonen i prøve T0 (0,0 mM) og fortytningsfaktoren, ble brukt til å regne ut cDNA konsentrasjonen i hver fortytning.

Tabell 8: Viser en oversikt over antall fortynninger, fortynningsfaktorene, Ct –verdiene for parallellene og gjennomsnittlig Ct -verdi. Finner også utregnet DNA konsentrasjon til hver av parallellene.

Fortynnings- nummer	Fortynnings- faktor	Ct – verdi (1)	Ct – verdi (2)	Gjennom- snittlig Ct- verdi	Konsentrasjon av DNA i prøvene
Ufortynnet prøve	2 ⁰	28,06	28,04	28,05	5,59 µg/ml
1	2 ⁻¹	30,08	30,93	30,505	2,795 µg/ml
2	2 ⁻²	33,16	32,94	33,05	1,3975 µg/ml
3	2 ⁻³	34,92	35,41	35,165	0,6987 µg/ml
4	2 ⁻⁴	38,8	37,6	38,2	0,3494 µg/ml
5	2 ⁻⁵	38,66	39,74	39,2	0,175 µg/ml
6	2 ⁻⁶	No Ct	No Ct	No Ct	0,0873 µg/ml
7	2 ⁻⁷	No Ct	No Ct	No Ct	0,0437 µg/ml

Figur 7: Kalibrert standardkurve for gjennomsnittlig Ct-verdi av duplikatene. Finner $R^2=0,99$ oppgitt. På x-aksen er konsentrasjonen i log2 oppgitt og på y-aksen er Ct-verdiene oppgitt.



4.3 Analyse av prøvene

4.3.1 Ct – verdiene

Ct-verdiene hentet fra programvaren til AriaMx er presentert i tabell 9-12. Tabell 9 representerer Ct-verdiene til 0,0 mM, tabell 10 representerer 0,4 mM, tabell 11 representerer 1,2 mM og tabell 12 representerer 2,0 mM sialinsyre tilsatt over en tidsperiode på 48 timer. I forsøket ble det satt opp triplikater. Verdiene markert med rødt er ekskludert fra videre analyse, og de to gjenværende verdiene ble brukt til utregning av gjennomsnitt og standardavvik.

I tabell 9 er prøvegruppe 0,0 mM sialinsyre tilsatt representert. Prøvene som utmerker seg med et for høyt standardavvik på 0,6576 og 0,5447 er T1 (0,0 mM) og T6 (0,0 mM), i tillegg mangler T1 (0,0 mM), parallell 3, en Ct-verdi.

Tabell 9: Representerer Ct-verdiene til triplikatene for prøve T0, T1, T3 og T6 med 0,0 mM sialinsyre. Her er også gjennomsnittlig Ct-verdi og standardavvikene representert. De røde verdiene er ekskludert fra videre analyse. T1 (0,0 mM), parallell 3, er markert med grått, fordi den mangler en Ct-verdi.

Prøve	Tid	Konsentrasjon sialinsyre	Ct verdi (1)	Ct - verdi (2)	Ct - verdi (3)	Gjennomsnitt	Standardavvik
T0 (0,0 mM)	0 timer	0,0 mM	27,58	27,74	27,82	27,78	0,056568542
T1 (0,0 mM)	8 timer	0,0 mM	36,12	35,19		35,655	0,657609307
T3 (0,0 mM)	24 timer	0,0 mM	34,12	34,21	33,25	34,165	0,06363961
T6 (0,0 mM)	48 timer	0,0 mM	34,93	37,87	37,1	37,49	0,544722222

I tabell 10 er prøvegruppe 0,4 mM sialinsyre tilsatt representert. Prøven som utmerker seg med et høyt standardavvik på 0,8414 er og manglende Ct-verdi for parallell 3 er T1 (0,4 mM).

Tabell 10: Representerer Ct-verdiene til triplikatene for prøve T0, T1, T3 og T6 med 0,4 mM sialinsyre. Her er også gjennomsnittlig Ct-verdi og standardavvikene representert. De røde verdiene er ekskludert fra videre analyse. T1 (0,4 mM), parallell 3, er markert med grått, fordi den mangler en Ct-verdi.

Prøve	Tid	Konsentrasjon sialinsyre	Ct verdi (1)	Ct - verdi (2)	Ct - verdi (3)	Gjennomsnitt	Standardavvik
T0 (0,4 mM)	0 timer	0,4 mM	27,17	27,46	27,24	27,205	0,049497475
T1 (0,4 mM)	8 timer	0,4 mM	36,25	35,06		35,655	0,84145707
T3 (0,4 mM)	24 timer	0,4 mM	33,9	32,97	33,12	33,045	0,106066017
T6 (0,4 mM)	48 timer	0,4 mM	35,83	36,84	36,67	36,76	0,120208153

I tabell 11 er prøvegruppe 1,2 mM sialinsyre tilsatt representert. Prøvene som utmerker seg med et for høyt standardavvik på 0,8415 og 0,3818 er T0 (1,2 mM) og T6 (1,2 mM). I tillegg mangler prøve T1 (1,2 mM) en Ct-verdi for parallell 1.

Tabell 11: Representerer Ct-verdiene til triplikaten for prøve T0, T1, T3 og T6 med 1,2 mM sialinsyre. Her er også gjennomsnittlig Ct-verdi og standardavvikene representert. De røde verdiene er ekskludert fra videre analyse. T1 (1,2 mM), parallell 3, er markert med grått, fordi den mangler en Ct-verdi.

Prøve	Tid	Konsentrasjon sialinsyre	Ct verdi (1)	Ct - verdi (2)	Ct - verdi (3)	Gjennomsnitt	Standardavvik
T0 (1,2 mM)	0 timer	1,2 mM	28,02	25,52	26,83	26,175	0,84145707
T1 (1,2 mM)	8 timer	1,2 mM		34,73	35,15	34,94	0,296984848
T3 (1,2 mM)	24 timer	1,2 mM	34,93	33,59	35,29	35,11	0,254558441
T6 (1,2 mM)	48 timer	1,2 mM	35,45	34,32	34,91	35,18	0,381837662

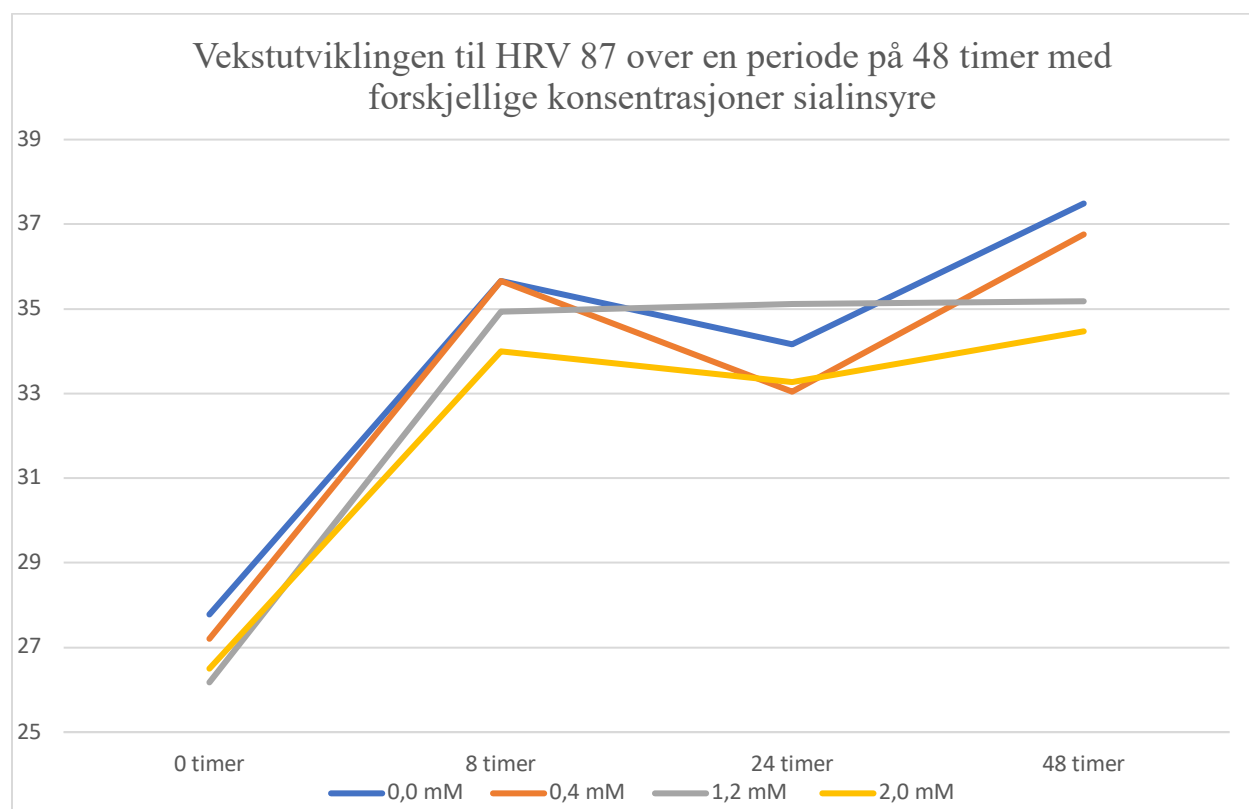
I tabell 12 er prøver gruppe 2,0 mM sialinsyre tilsatt representert. Det er ingen prøver som utmerker seg her med et for høyt standardavvik eller en manglende Ct-verdi.

Tabell 12: Representerer Ct-verdiene til triplikaten for prøve T0, T1, T3 og T6 med 2,0 mM sialinsyre. Her er også gjennomsnittlig Ct-verdi og standardavvikene representert. De røde verdiene er ekskludert fra videre analyse.

Prøve	Tid	Konsentrasjon sialinsyre	Ct verdi (1)	Ct - verdi (2)	Ct - verdi (3)	Gjennomsnitt	Standardavvik
T0 (2,0 mM)	0 timer	2,0 mM	25,69	26,67	26,33	26,5	0,240416306
T1 (2,0 mM)	8 timer	2,0 mM	34,92	33,89	34,11	34	0,155563492
T3 (2,0 mM)	24 timer	2,0 mM	33,3	33,76	33,23	33,265	0,049497475
T6 (2,0 mM)	48 timer	2,0 mM	34,83	34,59	34,35	34,47	0,169705627

I figur 8 blir vekstutviklingen til de forskjellige prøvene sammenlignet over en tidsperiode på 48 timer. For prøvene markert med 0,0 mM, 0,4 mM og 2,0 mM sialinsyre øker Ct-verdien frem til 8 timer, synker ved 24 timer, for så igjen ved 48 timer. Prøven markert med 1,2 mM sialinsyre har en økende Ct-verdi frem til 8 timer, deretter jevnes grafen ut frem til 48 timer.

Figur 8: Figuren sammenligner vekstutviklingen til HRV 87 over en tidsperiode på 48 timer mellom konsentrasjonene 0,0 mM, 0,4 mM, 1,2 mM og 2,0 mM sialinsyre. Y-aksen viser Ct-verdiene og x-aksen viser timer. Blå farge representerer 0,0 mM, oransje 0,4 mM, grå 1,2 mM og gul 2,0 mM sialinsyre.



4.3.2 Dixon-Reed Test

Ut ifra Dixon-Reed Test er Ct -verdien hos prøve T3 (1,2 mM), parallell 2, identifisert som en uteligger og ekskludert fra videre dataanalyse. Denne prøven hadde en verdi høyere enn 0,970, som tilsvarer 95 prosent signifikantnivå.

Tabell 13: Presenterer prøver og verdiene som ble mistenkt for å være uteliggere, hva resultatet av Dixon-test var og vurdering av testsvaret. T3 (1,2 mM) ble bestemt til å være en uteligger.

Prøve	Verdi som skal testes	Dixons test - finne uteliggere	Vurdering av svar (95% signifikant nivå)
T0 (1,2 mM)	28,02	0,476	0,476 < 0,970. Ct -verdi kan beholdes
T6 (0,0 mM)	34,21	0,738	0,738 < 0,970. Ct - verdi kan beholdes
T3 (1,2 mM)	33,59	3,722	3,72 > 0,970 Ct - verdi må forkastes

4.2.3 Δ Ct-verdi

Δ Ct-verdiene er definert i tabell 14, og ble beregnet ut ifra gjennomsnittverdiene i tabell 9 til 12.

Ut ifra Δ Ct-verdiene kan en se hvordan Ct-verdiene endrer seg mellom forskjellige tidspunkt med samme konsentrasjon av sialinsyre. Δ Ct-verdien avtar mellom T3 og T1 for konsentrasjon 0,0 mM, 0,4 mM og 2,0 mM sialinsyre, mens Δ Ct-verdien øker for resten av prøvene for alle konsentrasjonene sialinsyre.

Tabell 14: Viser hvilke tider og konsentrasjoner som det regnes ΔC_t -verdi av. I siste kolonne er ΔC_t -verdiene definert, hvor fortegnet uttrykker om verdien øker eller minsker.

Hvilke tider	Konsentrasjon	ΔC_t
T1 - T0	0,0 mM	7,88
T3 - T0	0,0 mM	6,39
T6 - T0	0,0 mM	9,71
T3 - T1	0,0 mM	-1,49
T6 - T1	0,0 mM	1,83
T6 - T3	0,0 mM	3,32
T1 - T0	0,4 mM	8,45
T3 - T0	0,4 mM	5,84
T6 - T0	0,4 mM	9,55
T3 - T1	0,4 mM	-2,61
T6 - T1	0,4 mM	1,10
T6 - T3	0,4 mM	3,71
T1 - T0	1,2 mM	8,765
T3 - T0	1,2 mM	8,935
T6 - T0	1,2 mM	9,005
T3 - T1	1,2 mM	0,17
T6 - T1	1,2 mM	0,24
T6 - T3	1,2 mM	0,07
T1 - T0	2,0 mM	7,50
T3 - T0	2,0 mM	6,765
T6 - T0	2,0 mM	7,97
T3 - T1	2,0 mM	-0,73
T6 - T1	2,0 mM	0,47
T6 - T3	2,0 mM	1,205

5.0. Diskusjon

Dette *in vitro* forsøket ble utført på Humant Rhinovirus 87, hvor hensikten var å se hvordan veksten av viruset varierte med forskjellige konsentrasjoner sialinsyre tilsatt over ulike tidsperioder. Fire ulike konsentrasjoner sialinsyre (Neu5Ac) ble inkubert med viruset over en lengre tidsperiode, og ble isolert etter 0, 8, 12 og 24 timer. I diskusjonsdelen av oppgaven blir prosedyrene, Ct-verdiene og replikasjonsprosessen diskutert.

5.1 *cDNA syntese og Qubit*

Prøvematerialet kom ferdig ekstrahert og måtte omdannes til cDNA. Før cDNA-syntesen av prøvematerialet, var det fare for at prøvematerialet kunne bli utsatt for kontaminering fra miljøet eller menneskene på laben. Krysskontaminering kan forekomme mellom prøvene, derfor er det viktig å jobbe systematisk og sterilt. Ved en eventuell kontaminering kan det skje en interferering med prøvematerialet, som resulterer i svekkede og unøyaktige resultater i qPCR. En DNA kontaminering, forårsaket av krysskontaminering, kan føre til et falskt positivt resultat i amplifiseringsplotet. Prøvematerialet må derfor behandles med forsiktighet.

I følge MIQE guidelines kan prøvematerialet trygt settes på is over en kortere periode under forsøket uten at det har en stor effekt på RNA kvaliteten, likevel bør det behandles med forsiktighet. Prøvematerialet skal lagres ved -80 °C når det ikke er i bruk. Hensikten med å lagre prøvematerialet slik, er å unngå at RNase degraderer RNA og for å holde RNA mest mulig intakt. I -80 °C kan prøvematerialet lagres opptil et år, uten at RNA blir degradert. Hvis RNA mot formodning skulle bli brutt ned, vil dette svekke signalene og gi ut et falskt negativt resultat. Dette fordi mindre mengde RNA blir omgjort til cDNA.

RNA konsentrasjonen i de ekstraherte prøvene var ikke mulig å måle, selv ved gjentatte forsøk og med ulikt forhold mellom working solution og prøvematerialet. Det var ikke noe problem knyttet til måling av standardene, noe som indikerer at working solution fungerte. Manglende målinger skyldes derfor lave konsentrasjoner av ssRNA, som ofte kan forekomme hos virale ssRNA prøver ifølge MIQE guidelines.

Etter endt cDNA syntese ble konsentrasjonen av cDNA kvantifisert, for å kvalitetssikre at RNA har blitt omdannet til DNA. Resultatet i *tabell 9, vedlegg A.3*, viser at RNA ble omdannet til cDNA. Siden RNA konsentrasjonen ikke ble målt før cDNA syntesen, er det ikke mulig å sammenligne hvor mye RNA som har blitt med videre i forsøket. Det er derfor vanskelig å påpeke om noe kan forbedres. Den varierende konsentrasjon cDNA kvantifisert i de forskjellige prøvene vil ha en innvirkning på videre analyse i qPCR.

5.2 Standardkurve og deteksjonsgrense

Den analytiske sensitiviteten og effektiviteten til qPCR ble bestemt ut ifra en standardkurve, og er nødvendig for å kunne kvalitetssikre forsøket. Det ble satt opp duplikater for kalibrering av standardkurve, til tross for at triplikater er anbefalt. Triplikater gjør det lettere å identifisere en avvikende verdi og øke presisjonen. Det ble anvendt duplikater for å spare prøvevolum og tid.

Standardkurven ble laget ved hjelp av en 1:5 fortynningsrekke, bestående av syv fortyninger av den positive kontrollen (*tabell 8 og figur 7*). Det ble regnet ut gjennomsnittlig Ct-verdier, som ble plottet inn i Microsoft® Excel for å danne standardkurven. Kurven består av seks punkter, med økende Ct-verdi, hvor den høyeste verdien er 39,2. Dette er en høy Ct-verdi, med tanke på at verdier over 40 ikke kan godkjennes. For fortykning 5, parallell 1, gikk Ct-verdien ned. I teorien skal ikke dette kunne skje, grunnet at fortykning 5 trenger flere sykluser for å påvise et fluorescerende signal enn for fortykning 4. Dette skyldes at fortykning 5 består av en lavere konsentrasjon cDNA. Avviket tyder på en tilfeldig feil, siden hendelsen skjer kun en gang. Det har sannsynligvis skjedd en pipetteringsfeil når fortykning 5 ble overført til brønnen på PCR-platen eller at en dråpe har blitt sittende igjen på veggen til brønnen. For fortykning 6 og 7 var det ikke mulig å detektere en Ct-verdi, fordi det fluorescerende signalet ikke gikk over terskelverdien. Korrelasjonskoeffisienten for standardkurven til gjennomsnittlig Ct-verdi var 0,99, noe som er akkurat innenfor kravet for linearitet. Ut ifra fortynningsfaktoren på x-aksen ble konsentrasjonene av cDNA til prøve T0 (0,0 mM) hos hver fortykning kvantifisert, som et ledd i kvalitetssikringen av forsøket.

LoD ble bestemt ut ifra standardkurven, ved å se på den siste fortyningen som hadde en Ct-verdi under 40. I *figur 7* kan en se at dette stemte for fortykning 5. Til tross for dette ble det

bestemt at fortytning 4 ble LoD, siden fortytning 5, parallell 1, hadde et avvik og at gjennomsnittlig Ct-verdi var svært høy. Det er vanskelig å avgjøre om Ct-verdien ville vært høyere enn 40 for fortytning 5 om ikke avviket hadde vært der. I slike tilfeller hadde det vært gunstig å hatt triplikater, for å lettere avgjøre hvor høy Ct-verdien ville vært. LoD ble dermed bestemt til å være fortytning 4, med en Ct-verdi på 38,2.

5.3 Analyse av prøver

Hensikten med forsøket var å se hvordan veksten av virus endret seg over en periode på 48 timer, å sammenligne forskjellen i vekst mellom ulike konsentrasjoner sialinsyre tilsatt. Endringene i veksten ble analysert ved å regne ut differansen mellom en tid og neste, innenfor samme konsentrasjon sialinsyre. Denne differansen blir betegnet som ΔCt , og en Ct-verdi tilsvarer rundt 300 viruspartikler. I *tabell 9-12* er det en oversikt over Ct-verdiene, gjennomsnittlig Ct-verdi og standardavvik, og i *tabell 14* er det en oversikt over ΔCt -verdi. Positiv ΔCt -verdi vil si at antallet viruspartikler avtar og negativ ΔCt -verdi vil si at antallet viruspartikler øker. Sammenligningen av vekst mellom de forskjellige konsentrasjonene over en tidsperiode på 48 timer blir illustrert i *figur 8*.

Prøvene markert med 0,0 mM sialinsyre ble isolert etter 0, 8, 24 og 48 timer, og er en ren virusprøve. Ren virusprøve vil si at prøvene inneholder naturlig mengde sialinsyre og kan derfor brukes som referanse til en normal veksttrend. Til sammenligning med de andre prøvene med tilsatt sialinsyre og likt tidspunkt, inneholder prøvene en lavere andel viruspartikler. Unntatt for T1 (0,0 mM) og T1 (0,4 mM) hvor Ct-verdien er lik. Antall viruspartikler for 0 timer, uansett konsentrasjon, er ulik. Dette er ikke forventet, siden det skal være tilsatt like mange viruspartikler i hver cellekultur og replikeringen av viruspartikler skal heller ikke ha rukket å starte.

I *figur 8* sammenlignes veksten til de ulike konsentrasjonene sialinsyre. For prøvene markert med 0,0 mM sialinsyre avtar veksten mellom 0 og 8 timer, før den øker frem mot 24 timer og til slutt avtar frem til 48 timer. Prøven markert med T0 (0,0 mM) har høyest andel viruspartikler og T6 (0,0 mM) har lavest andel, ΔCt -verdien er på 9,72. Dette er ikke forventet, fordi etter 24 timer skal virusene ha gått gjennom en replikasjonsprosess, som mest sannsynlig resulterer i en økning

i antall viruspartikler. Det har i stedet vært en reduksjon i antall viruspartikler mellom start og slutt. I qPCR blir tilstedeværelsen av templatet av arvestoffet til virus oppdaget, og en økning i Ct-verdi vil si at mindre mengde av templatet har blitt detektert. Standardavvikene for prøve T1 (0,0 mM) og T6 (0,0 mM) skiller seg negativt ut, med et for høyt standardavvik over 0,35. Et høyt standardavvik ble i dette forsøket satt til $>0,35$. Prøve T1 (0,0 mM) mangler også en verdi for en av parallellene, noe som er negativt. Denne mangelen, i tillegg til standardavvikene svekker troverdigheten til forsøket.

Antall viruspartikler i prøve T0 og T6 øker med økende konsentrasjon sialinsyre for alle prøvene. Prøvegruppene markert med 0,4 mM og 2,0 mM sialinsyre har den samme veksttrenden som 0,0 mM sialinsyre. Dette ser en tydelig i *figur 8*. Veksten avtar mellom 0 og 8 timer, øker frem til 24 timer og avtar igjen frem til 48 timer. Δ Ct-verdi mellom T6 og T0 for 0,4 mM sialinsyre er noenlunde det samme som for 0,0 mM, med en verdi på 9,55. Prøvene som inneholdt 2,0 mM sialinsyre har en Δ Ct-verdi på 7,67, noe som vil si at forskjell i antall viruspartikler er lavest for 2,0 mM sialinsyre. Det er også færrest viruspartikler til stede i prøve T6 for 0,4 mM og 2,0 mM sialinsyre. Prøven markert med T1 (0,4 mM) skiller seg ut med et for høyt standardavvik og manglende Ct-verdi for parallell 3.

Det skjer en endring i veksttrenden for prøvene markert med 1,2 mM sialinsyre. Her avtar veksten frem til 8 timer, før den deretter jevnes ut. Forskjellen i antall viruspartikler mellom start og slutt tid er 9,005. Det kan se ut som denne prøvegruppen har nådd platåfasen etter 8 timer, som et resultat av det ikke har blitt produsert nye viruspartikler. Dette kan forekomme dersom cellene ikke har blitt infisert, noe som er lite sannsynlig. Endringen mellom T3 (1,2 mM) og T6 (1,2 mM) i Ct-verdi er også ekstremt lav i forhold til de andre gruppene med prøver. Standardavviket for prøvene markert med T0 (1,2 mM) og T6 (1,2 mM) er for høye. Hos prøven markert T3 (1,2 mM) er det identifisert en uteligger (*tabell 13*). Dette kan være med på å forklare hvorfor det ikke har blitt registrert en økende vekst mellom T1 (1,2 mM) og T3 (1,2 mM), slik som hos de andre prøvene. Prøvene markert med 1,2 mM sialinsyre vil bli sett bort i fra når veksttrenden senere blir forklart, grunnet at en kan fastslå ut ifra teorien at veksttrenden er feil. Dette var tydelig når prøvene ble sammenlignet opp mot veksttrenden til 0,0 mM sialinsyre. Feilen skyldes sannsynlig uteliggeren og standardavvikene.

De høye standardavvikene tyder på manglende presisjon og svekker troverdigheten til prøvene/parallellene. Spesielt for prøvegruppe T1 er det manglende Ct-verdier og en bør derfor være skeptisk til resultatet. Veksttrenden til gruppe 0,4 mM og 2,0 mM er lik med prøvegruppe 0,0 mM, noe som tyder på en realistisk veksttrend. Forskjellen mellom T3 og T1 gir en negativ Ct-verdi, noe som tyder på en økning i antall viruspartikler. Økningen er størst for 0,4 mM og minst for 2,0 mM. Standardavvikene og manglende Ct-verdier hos T1 til disse konsentrasjonene, gir derfor ikke et for stort utslag på veksttrenden. I motsetning til de andre prøvene, påvirker manglende Ct-verdi, standardavvikene og uteliggeren veksttrenden til prøvegruppe 1,2 mM sialinsyre. Den manglende presisjonen på laboratoriet førte til høye standardavvik og manglende Ct-verdi mellom enkelte av parallellene til prøvene 0,0 mM, 0,4 mM og 1,2 mM, gjør endringene i Ct-verdi (*tabell 14*) mindre pålitelig.

5.4 Tolkning av resultater

Replikasjonsprosessen til et virus er kompleks, grunnet at de strukturelle enhetene, syntetisert underveis, blir satt sammen *de novo*. Under en normal viral replikasjonsprosess vil veksten variere. Prøvene markert med T0 er antall viruspartikler en har før replikasjonen har startet. Den første gruppen med prøver, 0,0 mM sialinsyre, ble brukt som referanse til hvordan veksten varierte underveis i 48 timer. Prøvegruppen 0,4 mM og 2,0 mM sialinsyre ble derfor sammenlignet opp mot denne prøven. Prøvene markert med 1,2 mM sialinsyre hadde en avvikende veksttrend i forhold til 0,0 mM og teorien. Dette er sannsynlig et resultat av høye standardavvik og uteliggeren, derfor blir de sett bort i fra når replikasjonsprosessen diskuteres.

Celler inneholder sialinsyre naturlig, slik som hos cellene for prøvene markert med 0,0 mM sialinsyre. Disse prøvene viser til utviklingen av den naturlige virale replikasjonsprosessen. Denne prosessen kan deles inn i syv trinn; binding av reseptor, celleinntrengelse, nedbrytning av viruspartikkel, replikering, pakking av virus, modning og frigjørelse. Disse trinnene er nærmere beskrevet i teorien. I *figur 8* blir blant annet veksttrenden til prøvegruppen 0,0 mM sialinsyre illustrert. Startfasen av infeksjonen skjer mellom T0 og T1, og illustrerer formørkelsesfasen hvor nye virusavkom ikke blir produsert. Viruspartiklene som er til stede i T0 binder seg til sialinsyrereseptoren, men ikke alle viruspartiklene vil binde seg. Virus er avhengig av celler for å

replikere og overleve, derfor kan det oppstå en konkurranse mellom virusene når det er for høy andel virus i forhold til sialinsyre. Mangel på sialinsyre vil føre til at de med mest affinitet til reseptoren vinner.

Videre skjer celleinntrengelse og nedbrytning av viruspartikler. Disse to trinnene, sammen med bindingen av reseptoren, skjer normalt etter to timer og kan vare opp til tolv timer. Prøvene markert med T1 illustrerer hvor mange viruspartikler som har bundet seg til reseptoren og gått gjennom disse tre fasene etter en tidsperiode på 8 timer. Ikke alle viruspartiklene vil kunne binde seg til reseptoren. Ct-verdien for T1 går opp, som skyldes at færre virus er til stede i prøven. I *tabell 14* er endringen i Ct-verdi mellom T1 og T0 for de tre konsentrasjonene ikke langt unna hverandre, noe som betyr at det er omtrent like stor minskning i antall viruspartikler.

Reduksjonen av antall viruspartikler mellom T0 og T1, for alle prøvene, var høyere enn forventet, noe som betyr at qPCR instrumentet har detektert mindre konsentrasjon templat i prøve T1. Det som var forventet var en liten reduksjon mellom T0 og T1, men at grafen skulle være nokså rett. Dette kan tyde på feil under laboratoriearbeidet, som har ført til falske resultater. For å kunne sammenligne ulike prøver med hverandre må isoleringen av RNA være vellykket for alle prøvene. Isolering av RNA er et meget kritisk punkt, med mange mulige feilkilder og eventuelle forurensinger som kan interferere med reagenser under cDNA syntesen eller qPCR reaksjonene. Det ble utlevert ferdig ekstrahert RNA, derfor tas det utgangspunkt i at det ikke var noe feil med selve prøvematerialet. Mulige årsaker til falske lave resultatet er feil behandling av prøver før cDNA syntese, siden RNA er svært ustabil. Ved feil opparbeiding av prøver kan det føre til at RNA degraderes av for eksempel RNase ved å bli lagret på feil temperaturer eller oppholde seg i romtemperatur for lenge. For høy pH er en annen faktor som også kan degradere RNA. Det kan også være mulig at cDNA syntesen ikke gikk som forventet, og at følgende ga dårlig utbytte. Pipetteringsproblemer, som blir diskutert senere, kan ha ført til at det var varierende mengde templat i PCR brønnene. PCR reaksjonene kan også ikke vært optimale. I starten av forsøket var ikke ssRNA mulig å måle, grunnet lave konsentrasjoner. Dette kombinert med små volum og pipetteringsutfordringer kan være årsaken til at ulik konsentrasjon templat befinner seg i brønnene.

Etter 8 timer og frem til 24 timer øker antallet viruspartikler, noe negativ ΔCt -verdi for prøve T3-T1 viser til (*Tabell 14*). Mellom disse to tidspunktene skjer replikasjon, pakking av virus, modning og frigjørelse av smittsomme viruspartikler. Dette resulterer i nye viruspartikler som er til stede i prøvene markert med T3. Etter 24 timer skjer det et dropp i antallet viruspartikler, derfor kan det tenkes at den latente perioden varte frem til 24 timer for den første replikasjonszyklusen. Etter frigjørelsen fra cellene er virionene klare for å infisere nye celler, å starte en ny replikasjonsprosess. Opprinnelig var det forventet at antallet viruspartikler skulle være høyere for T3 enn for T1, grunnet at replikasjonen inne i en celle skal føre til dannelsen av flere viruspartikler inne i den cellen. Dette skal resultere i en akkumulering av viruspartikler. Forventingene sto altså ikke i stil med resultatene. Det er vanskelig å fastslå hvorfor det ble sånn, men de lave falske resultatene kan skyldes ulik konsentrasjon templat i prøvene som ble satt inn i reaksjonsblokken. Dette er nærmere diskutert i et tidligere avsnitt, om hvorfor endringen i Ct-verdi mellom T1 og T0 var såpass høy.

Når sialinsyre tilsettes, kan det tenkes at noe av sialinsyren vil binde seg til cellene og fungere som en reseptor. Dette fører til at cellene får en høyere konsentrasjon sialinsyre og det er da naturlig å tenke at flere virus vil kunne trenge inn i en celle. Ut ifra *tabell 14* og *figur 8* kan denne påstanden analyseres. Antall viruspartikler ved 24 timer er høyest for 0,4 mM og ΔCt -verdien er også lavest, sammenlignet med de andre prøvene markert med 24 timer. For 2,0 mM sialinsyre tilsatt er antallet viruspartikler nest høyest, men ΔCt -verdi er høyere enn for 0,0 mM sialinsyre. Ut ifra dette stemmer det ikke at en høyere sialinsyre stimulering påvirker veksten i positiv retning, altså mot en økning av vekst. Det blir altså ikke som tenkt, dannet flest viruspartikler under den første replikasjonen for 2,0 mM sialinsyre. Hvis en bare skulle sammenlignet 0,0 mM og 0,4 mM sialinsyre stemmer hypotesen derimot, det kan se ut til at høyere konsentrasjon sialinsyre øker veksten til viruset. Det kan derfor ikke konkluderes med hvordan sialinsyre stimulering påvirker veksten. Standardavvikene for prøvegruppe 0,0 mM og 0,4 mM sialinsyre kan være grunnen til at det ikke blir registrert noe trend.

I *tabell 14* er ΔCt -verdi mellom T6 og T3 lavere enn for ΔCt -verdi mellom T3 og T0. Det kan tenkes at de syv trinnene i replikasjonsprosessen gjentas, selv om antall viruspartikler mellom 24 og 48 timer avtar. Dette kan henge sammen med at det er færre celler tilgjengelig, som

resterende tilsatt sialinsyre kan binde seg til. Det er da for få celler tilgjengelig til å opprettholde eller øke antallet viruspartikler. Endringen mellom T6 og T3 er minst for 2,0 mM sialinsyre, noe som kan komme av at det er mer tilsatt sialinsyre igjen etter første replikasjonssyklus enn for de lavere konsentrasjonene. Flere virus har da mulighet til å binde seg til samme celle. For 0,4 mM sialinsyre er endringen i Ct-verdi mellom T6 og T3 høyere enn for 0,0 mM sialinsyre, dermed stemmer det ikke om en sammenlignet 0,0 mM OG 0,4 mM. Det kan heller ikke nå konkluderes med at høyere konsentrasjon sialinsyre påvirker veksten i riktig retning.

Antall viruspartikler avslutningsvis øker med økende konsentrasjon sialinsyre tilsatt. ΔC -verdi mellom 0 og 48 timer avtar også med økende konsentrasjon sialinsyre tilsatt, noe som tilsier at færre viruspartikler er til stede i prøve T6. Det kan se ut som økende sialinsyre stimulering, fører til at nedgangen i antall viruspartikler hemmes. Dette kan komme av at det vil ta lengre tid før alle cellene har blitt infisert, for så bli ødelagt. En forklaring på dette er at flere virus kan binde seg til samme celle, grunnet at cellene inneholder en høyere konsentrasjon sialinsyre enn de normalt ville gjort. Flere virus har da muligheten til å gjennomgå replikasjonsprosessen.

5.5 Feilkilder

RT- qPCR er en svært sensitiv metode, noe som gjør den følsom for kontaminering. Det ble brukt NTC for å overvåke om det var forurensinger til stede. Programvaren ga ikke ut Ct-verdier for brønnene som inneholdt NTC, noe som indikerte at reagensene virket som de skulle og at de ikke var blitt forurenset. Likevel kunne en se variasjoner mellom verdiene og resultater som ikke var forventet, som tydet på at andre feilkilder var til stede.

Mastermiks ble anvendt for å redusere antall pipetteringsstrinn og pipettering av små volum, som et tiltak for å redusere pipetteringsfeil og kontaminering. Dersom det ikke blir benyttet ferdig laget mastermiks, må en finne nøyaktige verdier for enzymer, buffer, salter, vann og dNTPer som skal tilsettes i hver reaksjon. Det ble derfor anvendt ferdig laget mastermiks under forsøket, slik at forholdene mellom de forskjellige konsentrasjonene av reagensene forble optimale.

Krysskontaminering kan føre til at hele forsøket blir mislykket, derfor er det viktig å tenke på hvordan en kan minimere risikoen for kontaminering. Det ble satt opp fire separerte kjøring for

de forskjellige tidene og hver plate inneholdt alle konsentrasjonene sialinsyre for den gitte tiden. NTC var plassert med avstand til de andre prøvene som inneholdt templat. Dette for å unngå at NTC ble forurenset med templat, og om det mot formodning skulle skje ville en ha oppdaget det i amplifiseringsplotet. Hver konsentrasjon hadde også sin egen rad, for å hindre krysskontaminering. Det kunne også ha vært en rad mellomrom for hver konsentrasjon, for å minimere risikoen for kontaminering mellom konsentrasjonene ytterligere.

Det ble satt opp triplikater for analyse av prøver i qPCR, for å øke presisjonen og for å gjøre det lettere å oppdage om en Ct-verdi skilte seg ut innad i parallellene. Etter er å ha studert Ct-verdiene, så en stor variasjon innad i parallellene for mange av prøvene og det ble regnet standardavvik for to og to verdier. De verdiene som ga lavest standardavvik ble tatt med videre i forsøket, grunnet at disse verdiene ble ansett som gyldige og ga god kvalitet på datasettet. De avvikende Ct-verdiene ble forkastet. Det er likevel fire standardavvik som utmerker seg negativt, ved at de er for høye. For å kvalitetssikre resultatene kan det være hensiktsmessig å sette opp en ny kjøring med flere replikat.

De høye standardavvikene skyldes antageligvis ikke kontaminering, siden NTC ikke ga ut noe Ct-verdi. Når NTC blir forsterket er det en indikasjon på kontaminering. Avvikene var også tilfeldige, noe som tyder på at instrumentet og kalibrering av utstyret ikke var problemet. Ved problemer knyttet til instrumentet eller feil kalibrering av utstyret vil det oppstå systematiske feil som går igjen for alle prøvene. Det ble gitt ut Ct-verdi for de fleste av prøvene og parallellene, unntatt hos T1 (*tabell 9-11*), hvor det manglet en verdi hos flere av parallellene. De manglende Ct-verdiene var kun hos en av parallellene hos prøve 0,0 mM, 0,4 mM og 1,2 mM sialinsyre. Dette indikerer at det ikke var problemer med reagensene som var tilsatt. Mastermiksen, primere og prober var vortexet og tilsatt, og primerne og probene ble bundet til nukleotidsekvensen. En kan derfor konkludere med stor sikkerhet at feilene skyldtes tilfeldige feil og manglende presisjon. De høye standardavvikene gjør det vanskelig å reprodusere prøveresultatene og fører til svekket analyse.

Ved RT-qPCR jobber en med ekstremt små volum, noe som krever god pipetteringsteknikk. Det er derfor viktig å sørge for at pipettene er kalibrert og metodene er standardisert. I tillegg er det

viktig å sørge for konsistente volum. En må passe på at pipettespissen sitter tett på, og at en pipetterer løsningen sakte opp. Ved avlevering av reagenser at spissen kommer ned i brønnen, uten å levere langs veggen. Hos prøvene markert med T1 var det flere prøver som manglet en Ct-verdi og to av verdiene hadde et høyt standardavvik. Prosedyren og pipetteringsteknikken ble derfor gjennomgått for forbedring. Det ble da konstatert at det ikke var gunstig å pipettere ned templatet i brønnen med de andre reagensene, for så å blande ved å pipettere opp og ned. Dette fordi noe av templatet kan henge igjen i pipettespissen og bli med opp igjen. Etter forbedring av teknikk ble det en liten bedring på standardavvikene, men det var fortsatt indikasjon på unøyaktighet.

Andre faktorer som kan ha spilt inn på standardavvikene var luftbobler i brønnene og små dråper som ble igjen på veggen. Platene ble spinnert med platespinner og undersøkt for å se om alle brønnene hadde likt volum, men ved små volum kan det være vanskelig å oppdage forskjeller. Det var også viktig at plastfilmen satt godt på og at den ikke inneholdt luftbobler, noe som kan føre til fordampning av reagenser. De høye standardavvikene skyldes sannsynlig at ulik mengde av templat har blitt pipettert ned i brønnene til parallellene. Ulikt volum av templat fører til ulik konsentrasjon cDNA innad i prøvene, som medfører ulik Ct-verdi. Det kan også vurderes å bruke ett-trinns RT-qPCR ved en ny kjøring, fordi dette fører til færre pipetteringstrinn. Færre pipetteringstrinn gjør også forsøket mer reproducerbart, og reduserer risikoen for kontaminering og menneskelige feil.

5.6 Videre forskning

Analysen av veksten til HRV 87 etter sialinsyre stimulering ga vage resultater, og det var vanskelig å tolke hvordan økende konsentrasjon sialinsyre påvirket veksten. Flere virus bruker sialinsyre som reseptor, som gjør forsøket enda mer aktuelt. Særlig under pandemien, som sannsynlig kommer til å prege verden på et senere tidspunkt også, har det vært ekstremt viktig å se hvordan veksten til viruset påvirkes. Under en pandemi eller for andre truende virussykdommer som anvender sialinsyreresptor, er det viktig å forstå hvordan virus og reseptor samhandler, og ikke minst hvordan veksten kan påvirkes for å eventuelt hemme den.

Dette forsøket var preget av manglende presisjon, som er grunn nok til å gjenta forsøket. Gjentakelse vil sannsynligvis føre til at prøvegruppe 1,2 mM sialinsyre gir gyldige resultater og kan være med i tolkningen. Det blir dermed lettere å konkludere med hvordan veksten påvirkes. Forsøket kan bli utvidet ved å inkludere en isolering ved 32 timer. Dette for å se om grafen mellom 24 og 32 timer ville vært jevn eller om reduksjonen ville vært like stor som mellom 0 og 8 timer. I tillegg ville det vært interessant å se endringen i antall viruspartikler var høyere eller lavere mellom 32 og 48 timer enn mellom 8 og 24 timer. Dette er interessant å se på med tanke på at de fleste av cellene har blitt infisert og ødelagt etter den første replikasjonsyklusen. Hvordan sialinsyre stimulering virker på virus er per i dag fortsatt et område som kan forskes mye mer på og det er fortsatt mange ubesvarte spørsmål.

6.0. Konklusjon

Hensikten med oppgaven var å finne ut hvordan sialinsyre virker hos Humant Rhinovirus 87, og om sialinsyre stimulering påvirker veksten av viruset. For å finne ut av problemstillingen ble det anvendt RT-qPCR analyse. Ut ifra resultatene så en tendens til en normal viral replikasjonsprosess og at sialinsyre bidro til at viruset trengte inn i cellene for replikering. Likevel er det vanskelig å konkludere hvordan sialinsyre stimulering påvirker veksten. Det kan se ut som økende konsentrasjon sialinsyre stimulering hemmer nedgangen i antallet virus over tid. Utenom dette kan det ikke fastslås om høyere sialinsyre stimulering fører til at flere viruspartikler dannes, som et resultat av replikasjonsprosessen. Det var store variasjoner mellom triplikatene til templatet, og flere av duplikatene ga høye standardavvik. Dette er en indikasjon på lav presisjon under analysen. For 1,2 mM sialinsyre var veksttrenden feil i forhold til teorien og prøvegruppen ble derfor ikke brukt til tolkning av resultatet. For å konkludere er det hensiktsmessig å gjennomføre forsøket en gang til. Et nytt forsøk ville muligens gitt bedre presisjon og bedre forståelse av hvordan sialinsyre stimulering påvirker veksten. Gjør en forsøket om igjen kan dette forsterke eller svekke hypotesen.

7.0. Litteraturliste

7.1 Kilder

1. Taylor MW. What Is a Virus? NCBI2014 [cited 2022 05.05]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7122971/>.
2. Anderson M, Chauhan T, Roger K, Young G. RNA: Britannica; 2011 [updated 2018; cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.britannica.com/science/RNA/additional-info#contributors>.
3. Martinsen L, Børresen-Dale A-L, Dissen E. RNA: Store Medisinske Leksikon; [updated 10.05.2021; cited 2022 25.01]. Available from: <https://sml.snl.no/RNA>.
4. Folkehelseinstituttet. Rhinovirusinfeksjon - veileder for helsepersonell: FHI; 2010 [updated 06.02.2019; cited 2022 25.01]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/rhinovirusinfeksjon---veileder-for-/>.
5. Alexander DA, Dimock K. Sialic Acid Functions in Enterovirus 70 Binding and Infection: Journal of Virology; 2020 [cited 2022 25.01]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.76.22.11265-11272.2002>.
6. Blomqvist S, Svolainen C, Råman L, Roivainen M, Hovi T. Human Rhinovirus 87 and Enterovirus 68 Represent a Unique Serotype with Rhinovirus and Enterovirus Features NCBI2022 [cited 2022 05.05]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC139630/>.
7. Lauinger IL, Bibelen JM, Halligan EP, Aarons EJ, MacMahon E, Tong CY. Lineages, Sub-Lineages and Variants of Enterovirus 68 in Recent Outbreaks: Journals.plos; 2012 [cited 2022 07.02]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036005>.
8. Tmamura I, Fuji N, Suzuki A, Tamaki R, Saito M, Anicento R, et al. Enterovirus 68 among Children with Severe Acute Respiratory Infection, the Philippines: NCBI; 2011 [cited 2022 25.01]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381551/>.
9. Louten J. Virus Replication: NCBI; 2016 [cited 2022]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149683/>.

10. Ganjian H, Rajput C, Elzoheiry M, Sajjan U. Rhinovirus and Innate Immune Function of Airway Epithelium *Frontiers* 2020 [cited 2022 05.05]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00277/full>.
11. Stobart CC, Nosek JM, Moore ML. Rhinovirus Biology, Antigenic Diversity, and Advancements in the Design of a Human Rhinovirus Vaccine: *Frontiers*; 2017 [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02412/full>.
12. Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition: *Nature*; 2003 [cited 16.02 2022]. Available from: <https://www.nature.com/articles/1601704>.
13. C. Traving, R. Schauer. Structure, function and metabolism of sialic acids *link.springer.com* 1998 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s000180050258.pdf>.
14. Schauer R, Kamerling JP. Chapter One - Exploration of the Sialic Acid World: *ScienceDirect*; 2018 [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065231818300015>.
15. Nokbeh MR, Hazra S, Alexander DA, , Khan A, McAllister M, Suuronen EJ, et al. Enterovirus 70 Binds to Different Glycoconjugates Containing α 2,3-Linked Sialic Acid on Different Cell Lines *Journal of Virology* 2005 [cited 2022 05.05]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.79.11.7087-7094.2005>.
16. Varki A. Sialic acids in human health and disease: *ScienceDirect*; 2008 [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491408001330>.
17. Cooper JA. Receptor: *Britannica*; 2009 [updated November 20183; cited 2022 24.01]. Available from: <https://www.britannica.com/science/receptor-nerve-ending>
18. Cavalcante T, Medeiros M, Mule S, Palmisano G, Stolf B. The Role of Sialic Acids in the Establishment of Infections by Pathogens, With Special Focus on Leishmania: *Frontiers*; 2021 [cited 2022 25.01]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.671913/full>
19. M. Matrosovich, G. Herreler, H.D Klenk. Sialic Acid Receptors of Viruses *NCBI* 2013 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120183/>.
20. B.J. Thomson. Viruses and apoptosis *NCBI* 2001 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2517702/>.

21. Cohen FS. How Viruses Invade Cells: NCBI; 2016 [cited 2022 07.02]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4788752/>
22. Wasik BR, Barnard KN, Parrish CR. Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection: Sciencedirect; 2016 [cited 07.02 2022]. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X16300932?casa_token=8bqOiWUfNoUAAAAA:mRcox2jRHN3PgeKNHkL518lI2-q_gLKK2XHJ82t_b4Goo5ESjC8simJWvYhZ7WfoO9NaURA_mtY.
23. NIH. Polymerase Chain Reaction (PCR) NIH [cited 2022 25.05]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.
24. UiO. PCR: UiO; 2011 [updated 19.05.2021; cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
25. Yourgenome. What is PCR (polymerase chain reaction)? : Yourgenome; [updated 21.07.2021; cited 2022 07.02]. Available from: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>.
26. L. Jansson, J. Hedman. Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase ScienceDirect2019 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214753518300196>.
27. Thermofisher. Applied Biosystems Real-Time PCR Instruments: Thermofisher; [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments.html>.
28. Biosystems A. Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System: Thermofisher; 2008 [updated 2011; cited 2022 26.01]. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_040313.pdf.
29. RT. Hayden, Z. Gu, J. Ingersoll, Abdul-Ali D, L.. Shi, S. Pounds, et al. Comparison of Droplet Digital PCR to Real-Time PCR for Quantitative Detection of Cytomegalovirus NCBI2013 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3553899/>.
30. ThermoFisher. Introduction to Gene Expression: Getting Started Guide: ThermoFisher; [cited 2022 26.01]. 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>.

31. Integrated DNA Technologies. Gene expression analysis: Idtdna; [cited 26.01 2022]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/applications/gene-expression>.
32. ThermoFisher. Basic Principles of RT-qPCR: ThermoFisher; [cited 2022 07.02]. 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>.
33. Prediger E. Starting with RNA—one-step or two-step RT-qPCR? : IdtDNA; 2011 [updated 7.09.2016; cited 2022 27.01]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/one-step-two-step>.
34. Chauhan T. The Function of dNTPs in PCR Reaction: Geneticeducation; 2018 [cited 2022 26.01]. Available from: <https://geneticeducation.co.in/the-function-of-dntps-in-pcr-reaction/>.
35. Best DH, Roberts KA. In Vitro Amplification Techniques - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: Sciencedirect; 2014 [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/reverse-transcription>.
36. Clinisciences. Two-step RT-PCR Mixes and Kits Clinisciences [cited 2022 14.05]. Available from: <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-two-step-rt-pcr-mixes-and-kits-3531.html>.
37. Rios M, Reid ME. General Considerations - 2.2.4 DNA Polymerase: Sceincedirect; 2000 [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/taq-polymerase>.
38. Abramson RD. Thermostable DNA Polymerases: ScienceDirect; 1995 [updated 2007; cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/taq-polymerase>.
39. Børresen-Dale A-L. Revers transkriptase: Store Norske Leksikon; 2009 [updated 30.012020; cited 2022 26.01]. Available from: https://sml.sn.no/revers_transkriptase.
40. Bio Rad. cDNA Synthesis: Bio-Rad; [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.bio-rad.com/featured/en/cdna-synthesis.html>.
41. Lotha G, Rodtriguez E, Rogers K, Young G. reverse transcriptase: Britannica; 2009 [updated 2018. Available from: <https://www.britannica.com/science/reverse-transcriptase/additional-info#history>.

42. Pietri J, Land D. Introduction to Buffers: Chemistry LibreTexts; [updated 15.08.2020]. Available from: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Acids_and_Bases/Buffers/Introduction_to_Buffers](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Acids_and_Bases/Buffers/Introduction_to_Buffers).
43. SpringerLinks. PCR Primers: SpringerLink; 2008 [cited 2022 16.02]. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6241-4_5.
44. Wacker JM, Godard. M.J. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III: NCBI; 2005 [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2291734/>.
45. Robertson JM, Walsh-Weller J. An Introduction to PCR Primer Design and Optimization of Amplification Reactions: SpringerLink; 1998 [cited 2022 16.02]. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-443-7:121>.
46. BioRad. Introduction to PCR Primer & Probe Chemistries: BioRad; [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/introduction-pcr-primer-probe-chemistries?ID=LUSOJW3Q3>.
47. ThermoFisher. TaqMan™ MGB-sonde: ThermoFisher; [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316034>.
48. Moldovan E, Moldovan V. Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques: Sciendo; 2020 [cited 16.02 2022]. Available from: <https://sciendo.com/pdf/10.2478/amma-2020-0025>.
49. M.R. Zambenedetti, D. P. Pavoni, A.C. Dallabona, A. C. Dominguez, C.O. Poersch, S.P. Rago, et al. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics NCBI2017 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5398160/>]
50. E. Moldovan, Moldovan V. Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques Sciendo2020 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://sciendo.com/pdf/10.2478/amma-2020-0025>.
51. ThermoFisher. ROX Reference Dye ThermoFisher [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12223012>.

52. ThermoFisher. Purpose of ROX Reference Dye in Real-Time PCR (qPCR) ThermoFisher2021 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/the-purpose-of-rox-reference-dye-in-real-time-pcr-qpcr/>.
53. ThermoFisher. The Basics: RNA Isolation: ThermoFisher; [cited 2022 16.02]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>.
54. Islam MS, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods: NCBI; 2017 [cited 2022 07.02]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190294/>.
55. Bologna JL. Molecular Biology - The Foundations of Molecular Techniques for Analyzing DNA, RNA, and Protein: Sciencedirect; 2018 [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/complementary-dna>.
56. Pelley JW. Recombinant DNA and Biotechnology - Complementary DNA: Sciencedirect; 2012 [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/complementary-dna>.
57. ThermoFisher. 5 Steps to Optimal cDNA Synthesis: ThermoFisher; [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription/5steps-cDNA.html>.
58. Andréola M-L, Parissi V, Litvak S. DNA Polymerases: Reverse Transcriptase Integrase, and Retrovirus Replication: Sciencedirect; 2013 [cited 2022 26.01]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786302002589>.
59. Kumar V. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Microbiologynotes2021 [cited 2022 05.05]. Available from: <https://microbiologynotes.org/reverse-transcription-polymerase-chain-reaction-rt-pcr/>.
60. ThermoFisher. Real-Time vs. Digital PCR vs. Traditional PCR: ThermoFisher; [cited 2022 26.01]. 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-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>.
61. Oswald N. What Is a Cq (Ct) Value? : BiteSizeBio; 2015 [updated November 2020; cited 2022 26.01]. Available from: <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>.

62. ThermoFisher. Real-Time PCR: Understanding Ct: ThermoFisher; [cited 2022 16.02]. 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-understanding-ct.html>.
63. Bradburn S. What Is A Cycle Threshold (Ct) Value In qPCR? : Toptipbio; [cited 2022 26.01]. Available from: <https://toptipbio.com/ct-value-qpcr/>.
64. S. A. Bustin, V. Benes, Garson JA, Hellemans J, J. Huggett, M. Kubista, et al. Article Navigation
The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Academic2009 [cited 2022 25.04]. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762?login=true>.
65. Qiagen. How do I determine the amplification efficiency of my qPCR assay? Qiagen [cited 2022 25.04]. Available from: <https://www.qiagen.com/ca/resources/faq?id=2d04d81f-ef1f-4d7e-aaa5-2f30767445b1&lang=en>.
66. Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba JJ, Andrade MJ. Design av primere og prober for kvantitative sanntids PCR-metoder NCBI2015 [cited 2022 06.05]. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2365-6_3.
67. ThermoFisher. TaqMan™ MGB Probe: Thermofisher; [cited 2022 27.01]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316034>.
68. Quantabio. qScript® XLT One-Step RT-qPCR ToughMix®, Low ROX™: Quantabio; [cited 2022 27.01]. Available from: https://www.quantabio.com/media/contenttype/IFU-090.1_REV_03_95134_qScript_XLT_One-Step_RT-qPCR_ToughMix_Low_ROX.pdf.

A.0. Vedlegg

A.1 Prosedyrer

A.1.1 Prosedyre for cDNA syntese

Henviser til prosedyre *qScript cDNA Synthesis Kit* fra Quantabio for utarbeidelse av prosedyren. Utklippet er av side 1 av 2, og beskriver trinnene i cDNA syntesen. Side 2 er ikke tatt med, men beskriver retningslinjer og kvalitetskontroll ytterligere.



qScript® cDNA Synthesis Kit

Cat. No. 95047-025 Size: 25 x 20-µL reactions
 95047-100 100 x 20-µL reactions
 95047-500 500 x 20-µL reactions

Store at -25°C to -15°C

Description

The qScript cDNA Synthesis Kit is a sensitive and easy-to-use solution for RNA quantification using two-step RT-PCR. The novel qScript Reaction Mix provides all the necessary components for cDNA synthesis except enzyme and RNA template. The optimized blend of random and oligo(dT) primers provides robust, consistent and unbiased first-strand synthesis over a broad range of RNA template concentrations. qScript reverse transcriptase is a mixture of an engineered MMLV RT and a ribonuclease inhibitor protein. The simplified reaction procedure is ideally suited for high throughput expression studies using real-time quantitative RT-PCR. The resulting cDNA product is directly compatible with current real-time PCR methods or conventional end-point RT-PCR of targets ≤1 kb in length.

Components

	95047-025	95047-100	95047-500
qScript Reaction Mix (5X) 5X concentrated solution of optimized buffer, magnesium, oligo(dT) and random primers, and dNTPs	1 x 100 µL	1 x 400 µL	2 x 1 mL
qScript Reverse Transcriptase, 20X concentration	1 x 25 µL	1 x 100 µL	1 x 500 µL
Nuclease-free water	1 x 1.5 mL	1 x 1.5 mL	4 x 1.5 mL

Storage and Stability

Store components in a constant temperature freezer at -25°C to -15°C upon receipt. After thawing, mix thoroughly before using. For lot specific expiry date, refer to package label, Certificate of Analysis or Product Specification Form.

Reaction Protocol

- Thaw all frozen components. Mix thoroughly, and briefly centrifuge to collect contents before using. Place all components, including qScript RT on ice.
- Add the following to a 0.2-mL thin-walled PCR tube or 96-well PCR reaction plate sitting on ice:

RNA (1 µg to 10 pg total RNA)	variable
Nuclease-free water	variable
qScript Reaction Mix (5X)	4.0 µL
qScript RT	1.0 µL
final volume	20.0 µL

Note: When performing multiple first-strand reactions, a master mix can be prepared with water, qScript Reaction Mix and qScript RT.

	Single rxn.	25 rxns.	100 rxns.
Nuclease-free water	10 µL	250 µL	1000 µL
qScript Reaction Mix (5X)	4 µL	100 µL	400 µL
qScript RT	1 µL	25 µL	100 µL
total volume	15 µL	375 µL	1500 µL

Dispense 15 µL of cDNA master mix to each well / tube.
 Add 5 µL of RNA sample to each reaction.
 Cover the reaction plate with sealing film or cap each reaction.

- Vortex gently, and then centrifuge 10s to collect contents.
- Place tube(s) in a thermal cycler programmed as follows:
 - 1 cycle: 22°C, 5 min
 - 1 cycle: 42°C, 30 min
 - 1 cycle: 85°C, 5 min
 - 4°C hold
- Initiate run.
- After completion of cDNA synthesis, use 1/5th to 1/10th of the first-strand reaction (2-4 µL) for PCR amplification. If desired, cDNA product can be diluted with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA and stored at -20°C.

Tabell 1: Viser til oppsettet til cDNA syntese i varmeblokken, hvilken brønns om inneholdt hvilken prøve. Prøvematerialet: Tid (T) og konsentrasjon (mM).

	1	2	3	4
A	T0 (0,0 mM)	T0 (0,4 mM)	T0 (0,4 mM)	T0 (2,0 mM)
B	T1 (0,0 mM)	T1 (0,4 mM)	T1 (0,4 mM)	T1 (2,0 mM)
C	T3 (0,0 mM)	T3 (0,4 mM)	T3 (0,4 mM)	T3 (2,0 mM)
D	T6 (0,0 mM)	T6 (0,4 mM)	T6 (0,4 mM)	T6 (2,0 mM)

A.1.2 Prosedyre for å måle konsentrasjonen av cDNA med Qubit

Henviser til *Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit* fra Quantabio for utarbeidelse av prosedyre for måling av cDNA konsentrasjon med Qubit. Utklippet består av side 3 og 5, av en større PDF fil på 10 sider om beskriver brukerveiledning for dette kitet. Disse to sidene er de mest relevante og beskriver preparering og avlesning av standarder og prøver på Qubit 4.0 Fluorometer.

Prepare standards and samples

This protocol assumes that you are preparing standards for calibrating the Qubit™ Fluorometer. If you plan to use the last calibration performed on the instrument (see “Qubit™ Fluorometer calibration”, page 2), you need fewer tubes (step 1.1) and less working solution (step 1.3).

- 1.1 Set up the required number of assay tubes (or tube strips) for standards and samples. The Qubit™ 1X dsDNA HS Assay requires 2 standards.

Note: Use thin-wall, clear, 0.5-mL PCR tubes (Cat. No. Q32856) for the Qubit™ 4 Fluorometer and 8 × 200 µL tube strips (Cat. No. Q33252) for the Qubit™ Flex Fluorometer.

- 1.2 Label the tube lids.

Note: Do not label the side of the tube as this could interfere with the sample read. Label the lid of each standard tube correctly. Calibration of the Qubit™ Fluorometer requires the standards to be inserted into the instrument in the right order.

- 1.3 Add 10 µL of each Qubit™ standard to the appropriate tube.

- 1.4 Add 1–20 µL of each user sample to the appropriate tube.

Note: If you are adding 1–2 µL of sample, use a P-2 pipette for best results.

- 1.5 Add the Qubit™ 1X dsDNA working solution to each tube such that the final volume is 200 µL.

Note: The final volume in each tube must be 200 µL. Each standard tube requires 190 µL of Qubit™ working solution, and each sample tube requires anywhere from 180–199 µL. Ensure that you have sufficient Qubit™ working solution to accommodate all standards and samples.

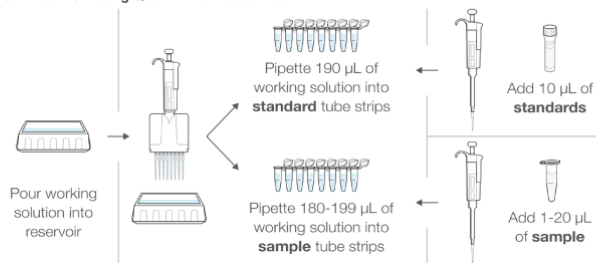
Note: To avoid any cross-contamination, we recommend that you remove the total amount of working solution required for your samples and standards from the working solution bottle and then add the required volume to the appropriate tubes instead of pipetting directly from the bottle to each tube.

- 1.6 Mix each sample vigorously by vortexing for 3–5 seconds.

- 1.7 Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes, then proceed to “Read standards and samples”. Follow the procedure appropriate for your instrument:

Read standards and samples

Figure 1. Workflow using Qubit™ Flex Fluorometer



Qubit™ 4 Fluorometer

- 3.1 On the **Home** screen of the Qubit™ 3 or the Qubit™ 4 Fluorometer, press **DNA**, then select **1X dsDNA HS** as the assay type. The “Read standards” screen is displayed. Press **Read Standards** to proceed.

Note: If you have already performed a calibration for the selected assay, the instrument prompts you to choose between reading new standards and running samples using the previous calibration. If you want to use the previous calibration, skip to step 3.4. Otherwise, continue with step 3.2.

- 3.2 Insert the tube containing Standard #1 into the sample chamber, close the lid, then press **Read standard**. When the reading is complete (~3 seconds), remove Standard #1.
- 3.3 Insert the tube containing Standard #2 into the sample chamber, close the lid, then press **Read standard**. When the reading is complete, remove Standard #2.

The instrument displays the results on the Read standard screen. For information on interpreting the calibration results, refer to the *Qubit™ Fluorometer User Guide*, available for download at thermofisher.com/qubit.

- 3.4 Press **Run samples**.
- 3.5 On the assay screen, select the sample volume and units:
 - a. Press the + or – buttons on the wheel, or anywhere on the wheel itself, to select the **sample volume** added to the assay tube (from 1–20 µL).
 - b. From the **unit** dropdown menu, select the units for the output sample concentration.
- 3.6 Insert a sample tube into the sample chamber, close the lid, then press **Read tube**. When the reading is complete (~3 seconds), remove the sample tube.

The top value (in large font) is the concentration of the original sample and the bottom value is the dilution concentration. For information on interpreting the sample results, refer to the *Qubit™ Fluorometer User Guide*.

- 3.7 Repeat step 3.6 until all samples have been read.

Tabell 2: Viser til rekkefølgen ved måling av cDNA konsentrasjon for prøvene og hvilke qubitrør som inneholder hvilken prøve.

Qubitrør	Prøvemateriale Tid (T) og Konsentrasjon (mM)	Qubitrør	Prøvemateriale Tid (T) og Konsentrasjon (mM)
1	T0 (0,0 mM)	9	T3 (0,0 mM)
2	T0 (0,4 mM)	10	T3 (0,4 mM)
3	T0 (1,2 mM)	11	T3 (1,2 mM)
4	T0 (2,0 mM)	12	T3 (2,0 mM)
5	T1 (0,0 mM)	13	T6 (0,0 mM)
6	T1 (0,4 mM)	14	T6 (0,4 mM)
7	T1 (1,2 mM)	15	T6 (1,2 mM)
8	T1 (2,0 mM)	16	T6 (2,0 mM)

A.1.3 Prosedyre for preparing av prøver til qPCR.

Henviser til prosedyre *PerfeCTa® FastMix® II Low ROX* fra Quantabio for utarbeidelse av prosedyren. Utklippet av prosedyren er av side 2 av 2, viser til arbeidsflyten. Side 1 er ikke tatt med, men består av beskrivelser av komponenter, lagring og retningslinjer.



Reaction Assembly

Component	Volume for 20- μ L rxn.	Final Concentration
PerfeCTa FastMix II, Low ROX (2X)	10 μ L	1x
Forward primer	variable	100 – 900 nM
Reverse primer	variable	100 – 900 nM
Probe	variable	100 – 250 nM
Nuclease-free water	variable	
Template	2 – 5 μ L	variable
Final Volume (μ L)	20 μ L	

Note: For smaller or larger reaction volumes scale all components proportionally.

PCR Cycling Protocol

	Fast 2-Step Cycling	Fast 3-Step Cycling	Standard Cycling
Initial denaturation:	95°C, 30s *	95°C, 30s *	95°C, 2-3 min *
PCR cycling (30-45 cycles):	95°C, 3 to 5s	95°C, 3 to 5s	95°C, 10 to 15s
		55 to 65°C, 15s	
	60°C, 20 to 30s †	68 to 72°C, 10s †	60°C, 30 to 60s †

The appropriate step for fluorescent data collection varies for different probe assay formats. Data collection for 5'-nuclease probe assays (TaqMan probe) should be carried out at the end of the extension step. Use the annealing step for data collection with hybridization probe assays (HybProbe® FRET hybridization probes, Molecular Beacons, Solaris® qPCR Assays, Scorpions® primers, etc.). End-point analysis should be carried out at a suitable temperature for your detection probe chemistry.

* Full activation of the DNA polymerase occurs within 10 seconds at 95°C; however, optimal initial denaturation time is *template dependent* and will affect qPCR efficiency and sensitivity. Amplification of genomic DNA or supercoiled plasmid DNA targets may require 5 to 10 min at 95°C to fully denature and fragment the template. Short double-stranded DNA template (PCR product) or single-stranded DNA template, such as cDNA, may require as little as 1s at 95°C. Use 30s at 95°C as a general starting point.

† Extension time is dependent upon amplicon length and the minimal data collection time requirement for your qPCR instrument. Use 30s at 60°C as a general starting point. Some assay designs and/or detection chemistries may require a 3-step cycling protocol for optimal performance. Optimal annealing temperature and time may need to be empirically determined for any given primer set and real-time instrument.

Quality Control

Kit components are free of contaminating DNase and RNase. PerfeCTa FastMix II, Low ROX is functionally tested in qPCR. Kinetic analysis must demonstrate linear resolution over six orders of dynamic range ($R^2 > 0.990$) with a 2-fold discrimination of starting template and a PCR efficiency > 95%. ‡ Testing of bulk enzyme for residual *E. coli* genomic DNA is validated to be less than 1 copy / unit.

Limited Label Licenses

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

- The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this manual and for use with components contained in the kit only. QIAGEN Beverly, Inc. grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this manual, and additional protocols available at www.quantabio.com. Some of these additional protocols have been provided by Quantabio product users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN Beverly, Inc. QIAGEN Beverly, Inc. neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
- Other than expressly stated licenses, QIAGEN Beverly, Inc. makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
- This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
- QIAGEN Beverly, Inc. specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
- The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN Beverly, Inc. may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

©2018 QIAGEN Beverly Inc. 100 Cummings Center Suite 407J Beverly, MA 01915

Quantabio brand products are manufactured by QIAGEN, Beverly Inc.

Intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention or treatment of a disease.

PerfeCTa, AccuVue, and FastMix are trademarks of QIAGEN Beverly, Inc. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. HybProbe is a registered trademark of Roche Diagnostics GmbH. ROX is a trademark Life Technologies Corporation. Solaris is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific Inc. Scorpions is a registered trademark of DxS, Ltd. of Manchester, UK.

A.2 Plateoppsett

A.2.1 Plateoppsett for preparering av prøver til qPCR for kalibrering av standardkurve-

Tabell 4: Oppsett på 96-brønns plate for fortynningsrekken.

	1	2	3	4
A		F1	F1	F1
B		F2	F2	F2
C		F3	F3	F3
D		F4	F4	F4
E		F5	F5	F5
F		F6	F6	F6
G		F7	F7	F7
H		Uten fortynning	Uten fortynning	Uten fortynning
		10	11	12
A		NTC	NTC	NTC

A.2.2 Plateoppsett for preparering av prøver for analyse til qPCR.

Tabell 5: Plateoppsettet til prøver markert med T0. Tid (T) og Konsentrasjon (mM)

	1	2	3	4
A		NTC (1)	NTC (2)	NTC (3)
B				
C		0,0 mM Sialinsyre (1)	0,0 mM Sialinsyre (2)	0,0 mM Sialinsyre (3)
D		0,4 mM Sialinsyre (1)	0,4 mM Sialinsyre (2)	0,4 mM Sialinsyre (3)
E		1,2 mM Sialinsyre (1)	1,2 mM Sialinsyre (2)	1,2 mM Sialinsyre (3)
F		2,0 mM Sialinsyre (1)	2,0 mM Sialinsyre (2)	2,0 mM Sialinsyre (3)

Tabell 6: Plateoppsettet til prøver markert med T1. Tid (T) og Konsentrasjon (mM)

	1	2	3	4
A		NTC (1)	NTC (2)	NTC (3)
B				
C		0,0 mM Sialinsyre (1)	0,0 mM Sialinsyre (2)	0,0 mM Sialinsyre (3)
D		0,4 mM Sialinsyre (1)	0,4 mM Sialinsyre (2)	0,4 mM Sialinsyre (3)
E		1,2 mM Sialinsyre (1)	1,2 mM Sialinsyre (2)	1,2 mM Sialinsyre (3)
F		2,0 mM Sialinsyre (1)	2,0 mM Sialinsyre (2)	2,0 mM Sialinsyre (3)

Tabell 7: Plateoppsettet til prøver markert med T3. Tid (T), Konsentrasjon (mM) og Konsentrasjon (x).

	1	2	3	4
A		NTC (1)	NTC (2)	NTC (3)
B				
C		0,0 mM Sialinsyre (1)	0,0 mM Sialinsyre (2)	0,0 mM Sialinsyre (3)
D		0,4 mM Sialinsyre (1)	0,4 mM Sialinsyre (2)	0,4 mM Sialinsyre (3)
E		1,2 mM Sialinsyre (1)	1,2 mM Sialinsyre (2)	1,2 mM Sialinsyre (3)
F		2,0 mM Sialinsyre (1)	2,0 mM Sialinsyre (2)	2,0 mM Sialinsyre (3)

Tabell 8: Plateoppsettet til prøver markert med T6. Tid (T) og Konsentrasjon (mM)

	1	2	3	4
A		NTC (1)	NTC (2)	NTC (3)
B				
C		0,0 mM Sialinsyre (1)	0,0 mM Sialinsyre (2)	0,0 mM Sialinsyre (3)
D		0,4 mM Sialinsyre (1)	0,4 mM Sialinsyre (2)	0,4 mM Sialinsyre (3)
E		1,2 mM Sialinsyre (1)	1,2 mM Sialinsyre (2)	1,2 mM Sialinsyre (3)
F		2,0 mM Sialinsyre (1)	2,0 mM Sialinsyre (2)	2,0 mM Sialinsyre (3)

A.3 Resultat av måling av cDNA konsentrasjon

Tabell 9: viser en oversikt over konsentrasjonene av cDNA målt med Qubit

Prøve Tid (T) og Konsentrasjon (mM)	Konsentrasjon av cDNA (ng/mL)
T0 (0,0 mM)	5,59
T0 (0,4 mM)	6,71
T0 (1,2 mM)	7,05
T0 (2,0 mM)	8,16
T1 (0,0 mM)	4,9
T1 (0,4 mM)	5,38
T1 (1,2 mM)	4,78
T1 (2,0 mM)	3,96
T3 (0,0 mM)	5,11
T3 (0,4 mM)	5,13
T3 (1,2 mM)	3,25
T3 (2,0 mM)	5,6
T6 (0,0 mM)	5,75
T6 (0,4 mM)	5,11
T6 (1,2 mM)	6,38
T6 (2,0 mM)	4,95

