

10005

10013

Genekspresjonsanalyse av *hsp70*, *cyp1a*, *p38* og *nrf2* hos atlantisk laks ved eksponering for kobber *in vivo* og *in vitro*

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Kine Samset Hoem

Mai 2023

10005

10013

**Genekspresjonsanalyse av *hsp70*, *cyp1a*,
p38 og *nrf2* hos atlantisk laks ved
eksponering for kobber *in vivo* og *in vitro***

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Kine Samset Hoem
Mai 2023

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser,

Denne bacheloroppgaven er skrevet av to bioteknologistudenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Ålesund. Bakgrunnen for valg av tema var vår interesse innenfor akvakulturnæringen og et ønske om å bidra til økt kunnskap. Alt av laboratoriearbeid ble utført på NTNUs laboratorier. I løpet av studietiden i Ålesund har vi tilegnet oss mye kunnskap som vi har kunnet benyttet i denne oppgaven. I tillegg har arbeidet bak vært en lærerik prosess både teoretisk og praktisk. Vi har lært hvor mye arbeid som går inn i et forskningsprosjekt, og vi kommer til å ta med oss all lærdom til videre studier og ut i arbeidslivet.

Vi ønsker å rette en stor takk til NTNU i Ålesund som har bidratt med økonomiske midler, som har gjort denne bacheloren mulig å gjennomføre, samt tidligere studier som har optimalisert primere og metoder. Spesielt vil vi også takke vår veileder, Kine Samset Hoem for god praktisk og teoretisk veiledning disse siste månedene. Takk for din tålmodighet og hjelpsomhet rundt alle spørsmål knyttet til oppgaven. Takk også til andre personer tilknyttet Institutt for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

Sammendrag

Genekspresjon av ulike målgener i kommersiell atlantisk laks kan gi en indikasjon på fiskens helse og velferd. I denne studien blir det sett på stressrespons fra atlantisk laks *in vivo*, og *in vitro*. Økt kunnskap om hvordan fiskens stressrespons er før og etter notspyling, kan danne et viktig grunnlag for informasjon om fiskens fysiologiske stressrespons under ulike typer stress. Dette kan bidra til å optimalisere driftsprosessene i oppdrettsanleggene. Mer kunnskap om hva som forårsaker stress hos fisken vil kunne bidra til å i større grad unngå eller minimere dette, og også forbedre fiskens helse.

Første del av denne oppgaven er basert på vevsprøver fra gjeller tatt fra atlantisk laks ved sjøoverføring, og seks uker etter sjøoverføring. Et interessant aspekt ved den siste gruppen er at det ble gjennomført notspyling tre dager før prøveuttaket. Ettersom notspyling fører til at kobberpartikler frigjøres til vannet og kan tas opp i gjellene, er dette en relevant driftsoperasjon med hensyn til stress. I andre del av denne oppgaven benyttes kommersielle nyreceller fra atlantisk laks. Gjennom et stressforsøk ble cellene utsatt for stress ved tilsetning av CuSO₄ i en konsentrasjon på 100 mg/L. ASK-cellene ble høstet inn ved ulike tidspunkt i en tidsserie opp mot 24 timer.

RT-qPCR ble brukt som analysemetode for alle prøvene, både ASK-celler og gjelleprøver fra sjø. Det ble benyttet fire målgener og to normaliseringsgener, henholdsvis målgenene *cyp1a*, *hsp70*, *p38*, *nrf2*, og referansegenene *actb* og *efl α* . Δ Ct-metoden ble brukt til normalisering av målgenene, og til utregning av $-\Delta\Delta$ Ct for bestemmelse av relativ genekspresjon.

Hovedfunnene fra oppgaven var at det ble observert en oppregulering av alle målgen i gjellevevsprøvene, dog kun signifikant for *hsp70*. Dette indikerer at fisken har blitt noe stresset og at det har skjedd en fysiologisk respons i fisken, som følge av notspylingen. Dette kan potensielt være (delvis) grunnet kobberpartikler som blir virvlet opp i miljøet, men man kan ikke konkludere med det.

Hos ASK-cellene viste RT-qPCR resultatene signifikante endringer i ekspresjonsnivåer av mRNA for genene *cyp1a*, *nrf2*, *hsp70* og *p38* ved flere tidspunkter av stressforsøket, som følge av eksponering for 100 mg/L kobbersulfat. Dette bekrefter at kobbersulfat fungerer som stressor hos ASK-celler, og at eksponering ved denne konsentrasjonen kan gi langvarig risiko.

Selv om *hsp70* ble signifikant oppregulert i genuttrykk av både prøver fra sjø og ASK-celler, kan vi ikke stadfeste at kobber i seg selv er årsaken til stresset hos prøvene fra sjø. For å kunne si at kobber fra notspylingen er en miljøstressor for laksen, er det nødvendig med videre forskning.

Abstract

Gene expression of various target genes in commercial Atlantic salmon can give an indication of the fish's health and welfare. In this study, the stress response of Atlantic salmon is looked at *in vivo* and *in vitro*. Increased knowledge of how the fish's stress response is before and after a net pen cleaning, can form an important foundation for information about the fish's physiological stress response under different types of stress. With increased knowledge, this can help to optimize the operating processes in the fish farming industry. By having more knowledge of what causes stress for the fish, one can try to avoid or minimize the stress to a greater extent.

The first part of this study is based on tissue samples from gills taken from Atlantic salmon during sea transfer, and from six weeks after the sea transfer. The most interesting aspect about the last group is that a net pen cleaning was performed three days before the sampling. As a net pen cleaning causes particles of copper to be released into the water, that can be taken up in the gills, this is a relevant operation in terms of stress. In the second part of this study, commercial kidney cells from Atlantic salmon are used. These cells were exposed with a CuSO_4 concentration of 100mg/L in a stress experiment. The ASK-cells were harvested at different times in a time series up to 24 hours.

RT-qPCR was used as the analysis method for all the samples, both ASK-cells and gill samples from the sea. Four target genes and two normalization genes were used, respectively the target genes *cyp1a*, *hsp70*, *p38*, *nrf2*, and the reference genes *actb* and *efl α* . The ΔCt -method was used to normalize the target genes, to calculate $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -values for determining relative gene expression.

The main findings of the study were up-regulation of all target genes, observed in the gill tissue samples, although only *hsp70* had significant value. This indicates that the fish has become somewhat stressed and that a physiological response has occurred in the fish, as a result of the net pen cleaning. This can potentially be caused by the particles of copper that get swirled in the environment, but it cannot be concluded.

For the ASK-cells our RT-qPCR results showed significant changes in mRNA expression levels of *cyp1a*, *nrf2*, *hsp70* and *p38* at several sampling times of the stress experiment as a result of exposure to 100mg/L copper sulfate. This confirms that copper sulphate acts as a stressor for ASK-cells, and that exposure at this high concentration can cause long-term risk.

Although *hsp70* was significantly upregulated in gene expression of both samples from the sea and ASK-cells, we cannot confirm that copper in itself is the cause of stress in the samples from the sea. To be able to say that copper from the net pen cleaning is an environmental stressor for the salmon, further research is needed.

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|-----------|
| Sammendrag | 2 |
| Abstract | 4 |
| Terminologi og forkortelser | 8 |
| 1 Introduksjon | 9 |
| 1.1 <i>Problemstilling</i> | 10 |
| 2 Teori | 11 |
| 2.1 <i>Stressrespons</i> | 11 |
| 2.2 <i>Kobber og CuSO₄ i oppdrettssammenheng</i> | 13 |
| 2.3 <i>RT-qPCR metoden</i> | 14 |
| 2.4 <i>Kvalitetskontroller genekspressjon</i> | 16 |
| 2.5 <i>Biomarkører</i> | 17 |
| 2.5.1 <i>Cyp1a</i> | 17 |
| 2.5.2 <i>Hsp70</i> | 17 |
| 2.5.3 <i>p38</i> | 18 |
| 2.5.4 <i>Nrf2</i> | 18 |
| 2.6 <i>Normalisering og referansegener</i> | 19 |
| 2.6.1 <i>actb</i> | 19 |
| 2.6.2 <i>ef1α</i> | 20 |
| 2.7 <i>$\Delta\Delta Ct$-metoden for normalisering av RT-qPCR data</i> | 20 |
| 3 Metoder og materialer | 21 |
| 3.1 <i>Cellefiksering</i> | 21 |
| 3.2 <i>RNA-isolering og cDNA syntese</i> | 22 |
| 3.3 <i>RT-qPCR</i> | 23 |
| 3.3.1 <i>RT-qPCR primere</i> | 24 |
| 3.4 <i>Datanalyse</i> | 25 |
| 3.5 <i>Statistikk</i> | 25 |
| 4 Resultater | 26 |
| 4.1 <i>Observasjoner av ASK-celler fra stressforsøket</i> | 26 |
| 4.2 <i>Relativ genekspressjon av in vivo - gjelleprøver fra atlantisk laks</i> | 28 |
| 4.3 <i>Relativ genekspressjon av in vitro - ASK-celler</i> | 29 |
| 5 Diskusjon | 36 |
| 5.1 <i>Analyse av genekspressjon hos gjellevevsprøver fra sjø</i> | 36 |
| 5.2 <i>Pilotstudie og celleproliferasjon av ASK-celler</i> | 37 |
| 5.3 <i>Analyse av genekspressjon hos ASK-celler eksponert for CuSO₄</i> | 38 |
| 5.4 <i>Mulige feilkilder</i> | 40 |
| 5.5 <i>Sammenligning av in vivo og in vitro prøver</i> | 40 |
| 5.6 <i>Videre forskning</i> | 41 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6 | Konklusjon | 42 |
| 7 | Litteraturliste | 43 |
| 8 | Vedlegg | 46 |
| | <i>Vedlegg 1 – Resultater for D- og S6-prøvene</i> | <i>46</i> |
| | <i>Vedlegg 2 – Resultater for ASK-celler uten kobbersulfat</i> | <i>48</i> |
| | <i>Vedlegg 3 – Resultater for ASK-celler med kobbersulfat</i> | <i>50</i> |
| | <i>Vedlegg 4 – Prosedyre for innhøsting av celler</i> | <i>52</i> |
| | <i>Vedlegg 5 – Prosedyre for lysis av cellene</i> | <i>54</i> |
| | <i>Vedlegg 6 – Prosedyre for bruk av Quibit</i> | <i>55</i> |
| | <i>Vedlegg 7 – Prosedyre for cDNA-syntese</i> | <i>56</i> |
| | <i>Vedlegg 8 – Prosedyre for qPCR</i> | <i>57</i> |
| | <i>Vedlegg 9 – RT-qPCR resultater for prøve 1-6 i D-gruppen</i> | <i>60</i> |
| | <i>Vedlegg 10 – RT-qPCR resultater for prøve 7-12 i D-gruppen</i> | <i>63</i> |
| | <i>Vedlegg 11 – RT-qPCR resultater for prøve 1-6 i S6-gruppen</i> | <i>66</i> |
| | <i>Vedlegg 12 – RT-qPCR resultater for prøve 8-13 i S6-gruppen</i> | <i>69</i> |
| | <i>Vedlegg 13 – RT-qPCR resultater for ASK-celler uten CuSO₄</i> | <i>71</i> |
| | <i>Vedlegg 14 – RT-qPCR resultater for ASK-celler med CuSO₄</i> | <i>74</i> |

Terminologi og forkortelser

| | |
|-------------------------------|--|
| Apoptose | Programmert celledød (1) |
| ASK-celler | Atlantic Salmon Kidney celler (2) |
| Autofagi | Selvspising, nedbrytningsprosess hos celler (3) |
| cDNA | Komplementær deoksyribonukleinsyre |
| Ct | Syklus terskelverdi |
| <i>cyp1a</i> | Cytokrom P4501A |
| ΔCt | Delta Ct-verdi |
| $\Delta\Delta Ct$ | Delta delta Ct-verdi |
| DNA | Deoksyribonukleinsyre |
| dsDNA | Dobbeltrådet deoksyribonukleinsyre |
| <i>ef1α</i> | <i>Elongeringsfaktor-1-alfa</i> |
| <i>hsp70</i> | Heat shock proteins 70kD |
| mRNA | BudbringerRNA |
| <i>nrf2</i> | <i>Nukleær faktor erytroid-2-relatert faktor</i> |
| NTC | No template control |
| <i>p38</i> | <i>Mitogenaktiverede proteinkinaser</i> |
| PCR | Polymerasekjedereaksjon |
| qPCR | Kvantitativ real-time polymerasekjedereaksjon |
| RNA | Ribonukleinsyre |
| ROX | Carboxyrhodamine |
| RT- qPCR | Revers transkriptase kvantitativ (real time) polymerasekjedereaksjon |
| <i>Salmo Salar</i> | Atlantisk laks |
| <i>ssDNA</i> | Enkeltrådet deoksyribonukleinsyre |
| SYBR green | Fluorescent reporter i RT-qPCR |
| T _m | Smeltepunktstemperatur |

1 Introduksjon

Fiskeoppdrett er en av Norges viktigste næringer, hvor atlantisk laks (*Salmo salar*) sammen med regnbueørret og sjørøye står for over 98 prosent av norsk oppdrett (4). Dette gjør Norge til verdens største eksportør av oppdrettslaks. Flere fiskehelse rapporter beskriver at forholdene til oppdrettsfisk ikke er gode nok (5).

I oppdrettsanlegg impregneres nøter med kobber. Dette gjøres av ulike grunner og en av årsakene er at kobber virker som antibegroingsmidler for små organismer slik som alger og blåskjell, som vokser på nøtene når de står en stund i sjøen. Vekst av blåskjell kan hindre vannstrømmen gjennom nøtene. Et annet problem er at rensefisken spiser det som vokser på nøtene i stedet for lakselus. Dette fører til mer lakselus, i tillegg til eventuelle andre sykdommer. Spyling av nøtene fører til utslipp av kobber i miljøet (6). Havforskningsinstituttet gjennomførte i 2020 en risikovurdering av kobberkonsentrasjoner i norsk fiskeoppdrett, og resultatet var at utslippene av kobber fra nøtene er i en slik størrelsesorden at man må forvente at det kan være påvirkning på marine organismer (7). Det er manglende kunnskap om kobber som blir frigjort ved notspyling er en potensiell miljøstressor for atlantisk laks, og det er derfor behov for mer kunnskap om fysiologiske reaksjoner på cellenivå. Denne oppgaven undersøker det relative genuttrykket av utvalgte stressrelaterte gener i atlantisk laks. Notspyling frigjør en større mengde kobber som kan tas opp i fisken, det er da interessant å se om kobberet i seg selv kan opptre som en stressor for fisken.

Første del av oppgaven studerer genuttrykk i gjeller fra naturlig saltvannsmiljø (*in vivo*) før og etter en potensiell eksponering for kobber, ved notspyling. To prøvegrupper av gjellelev ble hentet ut ved to ulike tidspunkt fra oppdrettslaks fra felt i 2020. D-gruppen inneholdt prøver fra fisk hentet ut i det fisken ble satt ut i sjøen. De brukes som kontrollgruppe fordi det er fiskens første møte med sjøvann og det nye miljøet. S6-gruppen er prøver som ble hentet ut seks uker etter sjøoverføring. I løpet av disse seks ukene kan fisken potensielt ha blitt eksponert kontinuerlig for lave nivåer av kobber, samt at det ble gjennomført spyling av not tre dager før prøveuttaket. På bakgrunn av dette, er hensikten å se på effekten av notspyling på genuttrykk av spesifikke stressmarkører, for å dermed se om det har påført stress på fisken.

Andre del av oppgaven undersøker genekspressjonen til de samme genene ved eksponering for kobberforbindelsen CuSO₄ (kobbersulfat) *in vitro* med kommersielle laboratoriedyrkede ASK

(Atlantic salmon kidney)- celler. ASK-celler er representative for atlantisk laks og utgjør en god modell (2). En gruppe ASK-celler utsettes for en konsentrasjon på 100 mg/L CuSO₄. En gruppe utsettes ikke for CuSO₄, og brukes som kontrollgruppe. Celler fra begge grupper høstes inn over flere tidspunkter opp mot en tidsserie på 24 timer. Hensikten er dermed å stimulere stress på ASK-celler for å få større forståelse av de fysiologiske følgene av kobbereksponering i levende atlantisk laks.

Det blir etablert en RT-qPCR metode for normalisering av to referansegen(*actb*, *efl α*), og genekspresjonen til fire målgener(*cyp1a*, *hsp70*, *nrf2* og *p38*) for begge deler av forsøket. Vi tar først for oss det teoretiske grunnlaget for studien og forklarer deretter hvordan vi går frem ved praktisk gjennomførelse av prosedyrer og bearbeider resultatet. Etter dette vil vi legge frem resultatene fra oppgaven og diskutere disse, før vi kommer frem til en konklusjon. Oppgaven avsluttes med referanseliste og vedlegg.

1.1 Problemstilling

I denne oppgaven studeres genekspresjon av stressrelaterte gener *cyp1a*, *hsp70*, *nrf2* og *p38* hos atlantisk laks ved eksponering for kobber *in vivo* og *in vitro*. Det analyseres gjellevev fra oppdrettslaks og kommersielt laboratoriedyrkede ASK-celler for å sammenlikne og øke kunnskapen om effekten av kobber på stressrelaterte gener i atlantisk laks. Problemstillingen til oppgaven er som følger:

Hvilken effekt har en notspyling på genekspresjon av de stressrelaterte genene *hsp70*, *cyp1a*, *p38* og *nrf2* til oppdrettslaks, og hvilke fysiologiske responser kan man forvente av ASK-celler ved eksponering for CuSO₄? Ved å sammenligne disse prøvene, kan man da anta at det er kobber som forårsaker effektene?

2 Teori

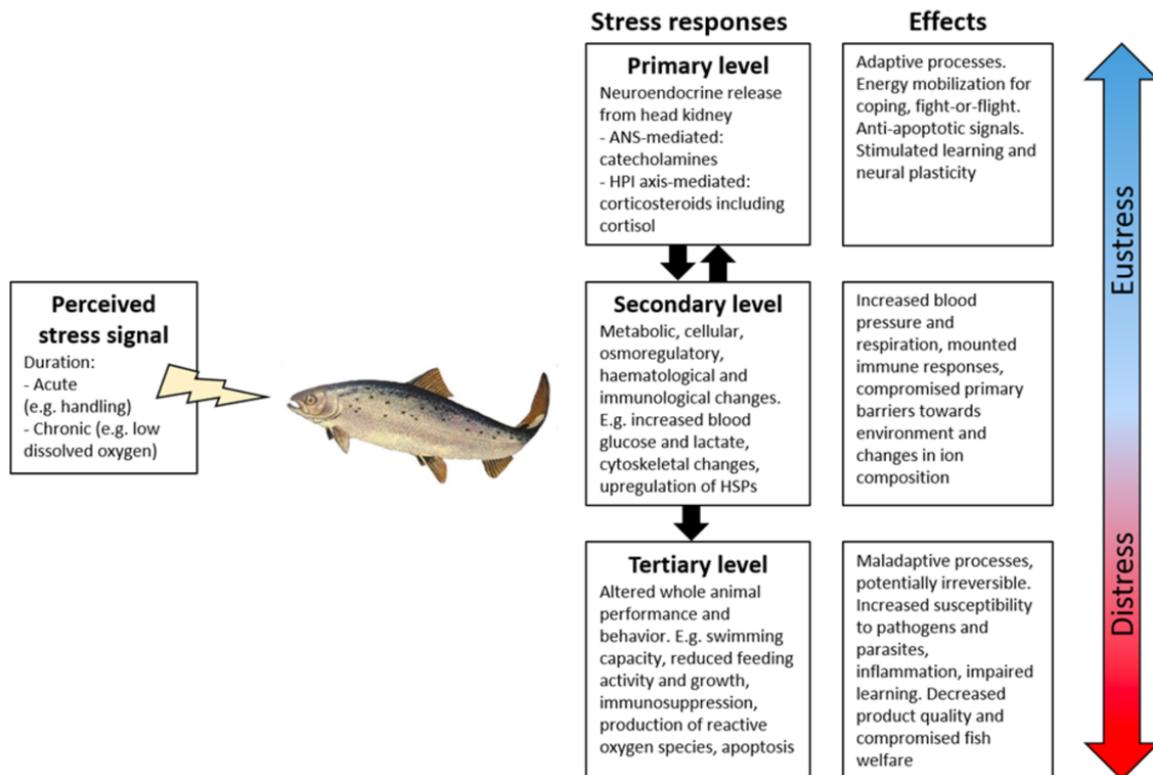
Teorien vil gå gjennom relevant informasjon for oppgaven. Her blir blant annet stressrespons og de ulike analyseprøvene våre, *in vivo* og *in vitro* forklart. Det blir også forklart hvilke målgener og normaliseringsgen vi har valgt i studien vår og hvorfor disse er valgt.

2.1 Stressrespons

For at oppdrettsnæring av atlantisk laks skal klare å oppnå bærekraftig utvikling, er god fiskehelse og velferd en nødvendighet. God velferd er avgjørende for å holde en høy produktkvalitet og stressorer er faktorer som forårsaker redusert fiskehelse og –ytelse. Stress refereres som den generelle fysiologiske responsen en organisme reagerer på truende situasjoner og utfordringer i miljøet (8)

På oppdrettsanlegg finnes det mange stressorer som påvirker fisken. Stressorer er hendelser, forhold eller påvirkninger som resulterer i økt stress. Disse kan deles inn i miljøstressorer, biologiske stressorer og fysiske stressorer. Miljøstressorer er knyttet til det akvatiske miljøet og er eksempelvis vannkvalitet, temperatur, oksygennivå og salinitet. Fysiske stressorer omfatter blant annet driftsrelaterte prosesser slik som håndtering (rengjøring av nøter), transport, sortering og pumping. Biologiske stressorer omhandler det biologiske samspillet mellom individer i en populasjon, og i tillegg kan bakterier og mikroorganismer som fører til ubehag og sykdom for fisken klassifiseres som biologiske stressorer (9).

Ved stress vil organismer indusere en rekke stressresponser. Stressresponser kan være nedsatt vekst, reproduksjon, immunkapasitet og overlevelse (10). Cellulært uttrykkes dette gjennom tre forskjellige nivåer som er primært, sekundært og tertiært nivårespons. Ved primært nivå foregår initiering av en nevroendokrin som frigjør katekolaminer, hovedsakelig adrenalin og noradrenalin (11). Sekundærnivået representerer respons i form av hormoner, eksempelvis varmesjokkproteiner (HSPs) (12). På tertiærnivå blir hele dyrets ytelse og atferd påvirket. Dersom stresstimuli vedvarer i dette nivået slik som kronisk stress, kan stressresponsene til slutt føre til destruktive effekter. Kompensere for dette endrer fisken energibudsjettet sitt til mindre vitale energikrevende prosesser og kroppsfunksjoner settes på vent. Dette fører til eksempelvis tap av appetitt, nedsatt vekst og reproduksjonssvikt (13).



Figur 1 De primære, sekundære og tertiære stressresponsnivåene i fisk. Den primære stressresponsen fremkalles umiddelbart etter møte med en stressfaktor. Stressfaktorer kan være i form av miljømessige, driftsrelaterte prosesser og biologiske. Ettersom stressfaktorer vedvarer blir stressreaksjoner kroniske og gir en ugunstig tilstand. Langvarig stress gir irreversible effekter på tertiært nivå. (14)

Stressresponsen i atlantisk laks kan påvises ved å bruke metabolske stressmarkører til å vise signifikante endringer i gjenuttrykk. Forståelse av de induserende faktorene, og endringene på cellulært nivå er viktig for å øke forståelsen om hva som skjer med organismen under stressende situasjoner både på kort- og lang sikt. Stressforsøk på atlantisk laks ved notspyling og ved tilsetning av kobbersulfat på ASK-celler kan bidra til informasjon for stresstilstanden til fisken. Det er dermed et nyttig verktøy for å kunne evaluere velferdstilstanden til oppdrettsfisk, og til å kunne forutsi stress. Dette kan også gi mer kunnskap om hvilke korrigerende inngrep man burde sette inn for å forhindre skade.

2.2 Kobber og CuSO₄ i oppdrettssammenheng

I norsk oppdrettsnæring blir kobber brukt som grohemmende middel ved at nøter blir impregnert med kobber(II)oksid (Cu₂O). For høye konsentrasjoner av kobber kan føre til skade på atlantisk laks eller andre organismer, og kan gi skadelige langtidsvirkninger i vannmiljøet. I 2020 ble det registrert 1539 tonn kobber til bruk som grohemmende midler. Ved førstegangsspyling av nøter kan 20% av den opprinnelige kobbermengden forsvinne. Det er mangel på nøyaktig data for hvor mye kobber som faller ut som partikler og virvler i sjøen. Resultater fra sedimentfeller viser ytterligere at en vesentlig andel av kobberimpregneringen synker ned på sjøbunnen i anleggssonen. I fjorder på Vestlandet er det målt konsentrasjoner fra <0,5 til 1,9 mg/L i 2021. Pulser med høyere konsentrasjoner kan forekomme ved spyling av kobberimpregnerte nøter. Bioakkumulering av kobber i atlantisk laks kan også forekomme i form av kobber-ion (Cu²⁺), men det er lite studier på om kobber i seg selv kan opptre som en stressor for fisken (15).

I denne oppgaven brukes kobbersulfat(CuSO₄) som en stressfaktor i en modell med fiskeceller på laboratoriet. Kobbersulfat brukes på bakgrunn av at det er en mindre giftig kobberforbindelse enn ren kobber. Det løses også opp i vann og spaltes til kobber- og sulfationer. Kobberioner er tilstede naturlig i vannmiljøer, men med da en konsentrasjon mindre enn 5 mg/L. Overskudd av kobber produserer frie radikaler som er giftige for celler og organismer. Det er derfor effektivt å impregnere nøter med kobber, for å hindre vekst av biofilm og alger (16).

En tidligere studie hvor fiskearten *Poecilia reticulata* ble eksponert for kobbersulfat for å evaluere effekten på vekst, overlevelse og reproduksjon, viste en bedring av vekst og reproduksjon hos kontrollgruppen enn den eksperimentelle gruppen. Grunnen til dette var at etterhvert som kobbersulfatkonsentrasjonen økte, sank blant annet relativ fruktbarhet, og overlevelseshastighet. Det var åpenbart at kobbersulfat hadde negative effekter på fisken og var en potensiell stressor for fisken (17).

På den positive siden, kan kobbersulfat fungere som et kjemoterapeutisk middel og benyttes for å kontrollere og behandle ektoparasittinfeksjoner i oppdrettsfisk ved lave kostnader. Dersom det blir for høy konsentrasjon av kobber, eller kobbersulfat kan det påvirke fisken negativt ved at det fører til toksisk miljø. Toksisiteten vil avhenge av konsentrasjon, eller tidsperiode for eksponering. Akutt eksponering for kobbersulfat hos fisk kan føre til dødelighet, mens en fatal dose

eksponering kan forårsake endringer iblant annet fôrings- og svømmeatferd, vekstevne, histormorfologi til gjeller, lever, nye og milt, og oksygenforbruk (16).

2.3 RT-qPCR metoden

For genekspresjonanalyse brukes to-trinns RT-qPCR (revers transkriptase kvantitativ polymerasekjedereaksjon). Denne metoden gjør at man kan analysere genekspresjon av spesifikke gener ved å se på mengden mRNA i cellene. Mengden mRNA fra ulike gener i cellene representerer transkripsjonsnivået av de ulike genene. RT-qPCR består av revers transkripsjon (RT) etterfulgt av kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR). Metoden har høy sensitivitet og spesifisitet som muliggjør en kvantifisering og detektering av små mengder RNA (18).

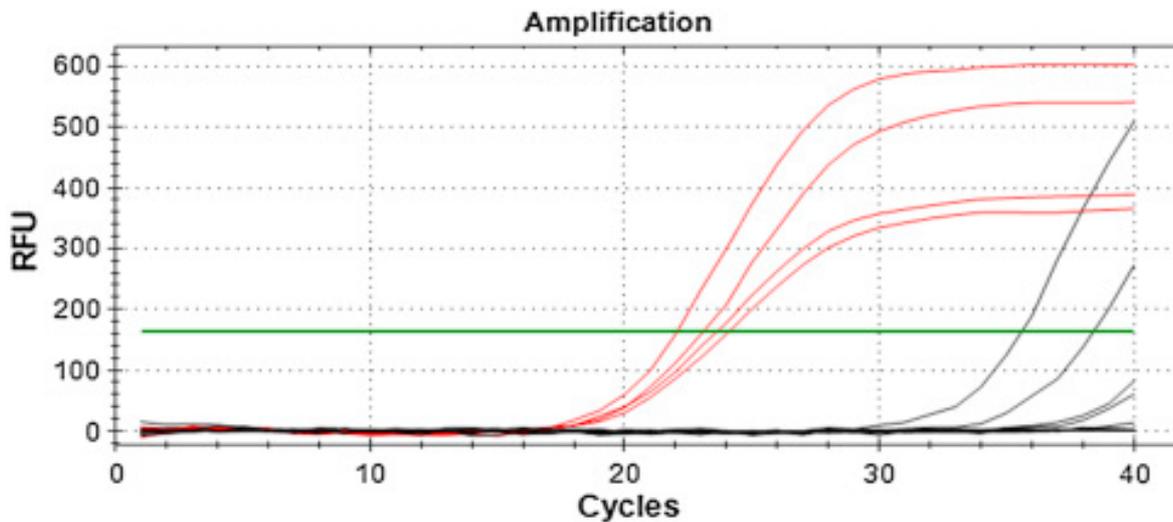
På bakgrunn av dette kan man måle genuttrykksendringer både før (ubehandlet gruppe/kontrollgruppe) og etter (behandlet gruppe) eksperimenter(19). Fordeler med denne metoden er evnen til å måle flere prøver samtidig, og at den kan gi umiddelbar informasjon. Ved studering av genuttrykk er det viktig å sikre at man har et sammenligningsgrunnlag for uttrykket til gener av interesse. For dette formålet brukes referansegener, da de uttrykkes konstitutivt. I tillegg endres de ikke drastisk som respons på ulike faktorer som kan påvirke målgener (20).

Med to-trinns metoden utføres revers transkripsjon av RNA først. Dette gjøres i en prosess kalt cDNA-syntese. Enzymet revers transkriptase sammen med primere, og deoksyribonukleotid trifosfater (dNTP-er) omdanner mRNA til cDNA. Videre amplifiseres cDNA i en separat reaksjon (21). Dette cDNA-et blir deretter brukt som templat for qPCR-reaksjonen, hvor cDNA-et amplifiseres til DNA ved å tilsette en mastermiks(22).

No template control (*NTC*) uten cDNA må inkluderes i alle RT-qPCR analyser for å bekrefte at primere, SYBR green og vann ikke er forurenset av DNA (22).

I RT-qPCR-analysen blir amplifikasjon detektert ved hjelp av det fluorescerende molekylet, SYBR Green. Dette er et fargestoff som interkaleres uspesifikt til dsDNA. Kvantifiseringen av målgen baseres på måling av fluorescens. Resultat fra RT-qPCR-analyse plottes inn i et diagram med mengden fluorescens på y-aksen og antall sykluser på x-aksen. Terskelnivået defineres som mengden fluorescens som kreves for å overgå bakgrunnsstøy, og dette skjer ved terskelsyklusen (*Ct*-verdien). *Ct*-verdien er omvendt proporsjonal med mengden DNA i prøven fra start, og en lav

Ct-verdi indikerer høye mengder av DNA-molekyl i prøven. Lineariteten til reaksjonen fremstilles på en graf, og sammenlignes med en standardkurve, se på Figur 2 (20).



Figur 2 Grafisk framstilling av resultater fra en RT-qPCR. Akkumuleringen av PCR-produkt blir representert som relative fluorescerende enheter på y-aksen, og antall sykluser på x-aksen. Den relative fluorescensenheten referer til bruken av fargestoffer som binder seg med dsDNA når det syntetiseres (20). Under amplifisering vil DNA øke i mengde, og derfor er fluorescens målt proporsjonal med mengden amplifiserte produkt (23).

SYBR Green kan også binde seg til primer-dimere og uspesifikke DNA-sekvenser, derfor utføres det smeltepunktanalyser etter at amplifiseringen er ferdig. Ved kontaminering av prøven vil ulike amplikonsekvenser ha ulike smeltepunkter, og kan sees ved at det fører til flere toppe på grafen (20).

Programvaren Aria Mx 1.8 konverterer den relative fluorescensavlesningen til Ct-verdier på et Excel-ark. Relativ kvantifisering av transkripsjoner utføres for å beregne fold-forskjellen til ekspresjonsnivåer av mRNA mellom ulike prøver (24).

2.4 Kvalitetskontroller genekspressjon

Ved genekspressjon utføres kvalitetskontroller for å kunne utføre en mest mulig optimal analyse. Qubit er et fluorometer som blir brukt for å bestemme konsentrasjon av eksempelvis nukleinsyrer i prøvematerialet. Ved utførelse brukes et fargestoff som binder seg spesifikt til RNA, DNA eller protein. Fargestoffet fluoresceres ved binding, og dette måles automatisk. Qubit er en sensitiv automatisert metode som er effektiv ved måling av svært lave konsentrasjoner (25).

NTC er brukt i RT-PCR analyser, og sikrer at signal som detekteres i brønnene med prøve er spesifikk for amplikonene man ser etter. *NTC* brukes altså for å detektere kontaminering, uspesifikk amplifisering og primer-dimere (26).

Carboxyrhodamine (ROX) fungerer som et passivt fluorescerende fargestoff i RT-qPCR-maskiner. På bakgrunn av at ROX er passivt, tilsettes det i mastermiksen og forblir stabil under hele reaksjonen, og påvirker ikke signal av PCR reaksjonene. Hensikten med ROX er å normalisere signalet og dermed redusere variansen mellom parallellene. Det sørger dermed for korreksjon av volumforskjeller mellom de ulike brønnene, som kan forekomme ved pipettering og fluorescensfluktueringer. (27)

Smeltepunktanalyse (T_m) blir gjennomført for å bekrefte at ønskede målgen er til stede i reaksjonen. Denne analysen baserer seg på at under oppvarming vil dsDNA bli denaturert til enkelttrådet deoksyribonukleinsyre, ssDNA og dette fører til tap av fluorescensintensitet. Smeltepunktet er den temperaturen hvor 50% av dsDNA har denaturert til ssDNA. De ulike målgenene under en analyse har ulike smeltepunkt basert på guanin-cytosin innhold, lengde og baserekkefølge. I tillegg gir flere topper under analysen indikasjon på at prøven er kontaminert. En topp tyder på en type amplikon og at produktet er rent (28).

2.5 Biomarkører

Biomarkører for biologisk respons er kvantifiserbare biologiske endringer i en celle eller organisme ved et gitt tidspunkt. I denne oppgaven brukes biomarkører for å kvantifisere forskjeller angående nivå av uttrykt mRNA som skyldes eksponering for kjemiske stoffer, som for eksempel kobbersulfat (29).

Målgener ble valgt basert på deres roller i tidligere stressforsøk med atlantisk laks, sammen med vitenskapelige funn i artikkelen «*Sea transfer and net pen cleaning induce changes in stress-related gene expression in commercial Atlantic Salmon (Salmo Salar) gill tissue*» av Hoem & Tveten (30).

2.5.1 *Cyp1a*

Cytokrom P4501A (*cyp1a*) er en godt studert biomarkør i feltforsøk med fisk fra ferskvann og marint miljø (31). Feltforsøkene viste at *cyp1a*-induksjon er signifikant relaterte til forurensinger i miljøet og egnet seg derfor som en biomarkør for eksponering av miljøgifter. Miljøgifter som polyklorerte bifenyler og dioksiner, ga genekspresjonsmønstre av *cyp1a* både under laboratorie- og feltforhold (32). Gjellebiopsier kombinert med RT-qPCR-analyse, og *cyp1a* som biomarkør kan være verdifulle verktøy for å vurdere miljøforurensing og helse hos atlantiske laksebestander (33).

2.5.2 *Hsp70*

HSP70 er en gruppe proteiner som er essensielle for de molekylære chaperonene ved intracellulære proteintranslokasjon. De er viktige for proteinfoldingsprosesser i cellen, og assisterer ved folding og sammenstilling av nysyntetiserte proteiner, samt forhindrer aggregering og kontrollerer feilfoldede proteiner. De hjelper også til i membrantranslokasjon av organellære sekretoriske proteiner, og kontrollerer aktiviteten til regulatoriske proteiner (34).

HSP70 finnes i nesten alle celler, og er en av de mest konserverte HSP-ene, samt mest studerte proteinene. *Hsp70*-genet uttrykkes hele tiden og har i tillegg høy følsomhet. Syntesen kan vanligvis økes eller reduseres under stressende forhold. Den klassiske aktiveringen av *hsp70* skyldes økning av temperatur i miljøet, men også andre faktorer kan utløse genekspresjon av dette proteinet. Eksponering for kjemiske stoffer, eller andre fysiske eller biologiske faktorer (metaller, metabolismehemmere, m.m) kan også utløse genekspresjon. HSP70-produksjonen er blitt evaluert

til å ha sammenheng med miljøforurensing og derfor passer *hsp70* bra som en stressmarkør i dette forsøket (35).

2.5.3 *p38*

P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) er en klasse av mitogenaktiverede proteinkinaser som reagerer på stress stimuli, og er involvert i celledifferensiering, apoptose og autofagi. Funksjonene og interaksjonene til dette proteinet er godt studert hos mennesker, men har også blitt funnet i atlantisk laks (36). Cellestudier foreslår at *p38* har anti-apoptiske egenskaper (37).

En økning i transkripsjonen av *p38* kan virke som en indikator på cellulær nød. Dette kan gå foran G1-cellesyklusstans. Dersom *p38* ikke blir nedregulert kan det føre til apoptose.

Transkripsjonsendringer i apoptose assosierte proteiner, kan virke som en målestokk for å kalibrere kobberkonsentrasjon som bidrar til fiskehelse. I ASK-celler og levende laks kan systemet fungere annerledes enn hos mennesker (38).

I artikkelen «*Sea transfer and net pen cleaning induce changes in stress-related gene expression in commercial Atlantic salmon (Salmo salar) gill tissue*» av Hoem & Tveten ble *p38* foreslått som en interessant stressmarkør, da resultatet viste en betydelig forhøyet ekspresjon av *p38* under transport og etter rengjøring av nøtene (30).

2.5.4 *Nrf2*

Nukleær faktor erytroid-2-relatert faktor (NRF2), kodet av genet *nrf2*, er en transkripsjonsfaktor som regulerer det cellulære forsvaret mot toksiske og oksidative fornærmelser gjennom ekspresjon av gener involvert i oksidativ stressrespons. Aktivering av *nrf2* gjør celler motstandsdyktige mot kreftfremkallende stoffer, og inflammatoriske utfordringer. De reparerer og fjerner skadede, eller feilfungerende proteiner, hemmer betennelse og inkluderer andre transkripsjonsfaktorer. *nrf2* vil derfor fungere som en stressmarkør for oksidativt stress i cellene (39).

2.6 Normalisering og referansegener

For å oppnå optimale genekspressjonsresultater er det nødvendig med normalisering for å korrigere for teknisk variasjon ved RT-qPCR. Variasjon kan oppstå ved blant annet ulik startmengde av startmateriale (gjellevev og ASK-celler), ulik utbytte ved RNA-isolering og ulik mengde RNA som er blitt omdannet til cDNA ved cDNA-syntese (40).

Referansegener brukes for å normalisere mRNA-nivåer mellom ulike prøver. Ekspresjonsnivået til referansegenene kan variere mellom vev og celler, og kan endres under visse omstendigheter.

Valget av referansegener er kritisk for genekspressjonsstudier (41).

Referansegener er ofte beskrevet som stabilt uttrykte gener på tvers av prøver, grunnet de uttrykkes konstant i cellen uavhengig av cellens tilstand. I tillegg er de essensielle i cellulær eksistens, deltar i cellulært vedlikehold og er evolusjonært konserverte gener (42). Ved å bruke de til å analysere målgener på alle prøver, kan de fungere som intern referanse. Variasjon i prøvematerialet kan bli eliminert ved å bruke DDcT-metoden, hvor differansen mellom målgen og referansegen blir kalkulert for hver enkelt prøve. Differansen mellom målgen og referansegen kan benyttes til å sammenligne det relative uttrykket av målgener (40).

2.6.1 *actb*

Beta-actin (*actb*) er et stabilt uttrykt gen i gjelle- og miltvev hos atlantisk laks (43).

Studier viser at genet uttrykkes stabilt i både frisk og stresset fisk. I en undersøkelse ble stabiliteten av seks referansegener undersøkt i åtte vev av atlantisk laks, for å bestemme de mest egnede genene som skal benyttes til kvantitative RT-PCR-analyser. *Actb* ble rangert som en tredje plass for referansegener i voksen atlantisk laks, og en fjerde plass i smoltifiseringsprosessen (44).

I en tidligere genekspressjonsanalyse av gjelleprøver fra atlantisk laks, ble *actb* brukt som et referansegen. Fire potensielle referansegener (β -aktin, forlengelsesfaktor 1 α , α -tubulin og 18S rRNA) ble tidligere testet for stabilitet ved bruk av GeNorm-programvaren, hvor *actb* viste seg å være det mest stabile referansegenet (44).

2.6.2 *efl* α

Den eukaryote forlengelsesfaktor 1A (*efl* α) er en av tre forlengelsesfaktorer *efl* α , *efl* β og *efl* γ som er involvert i forlengelsessyklusen i proteinbiosyntesen. Det er et proteinkompleks som består av to underenheter, *efl* α og *efl* β . *efl* α -underenheten eksisterer i to paralogiske former *efl* α A og *efl* α B. *efl* α aktiveres gjennom GTP-binding, og danner et tertiært kompleks med aminoacylerte elongator-tRNA (aa-tRNA). Komplekset er involvert i forlengelsesfasen av translasjonen og dekode den genetiske informasjonen (45).

Genekspressjon av *efl* α har vist seg å være en av de mest stabile referansegene for atlantisk laks. Olsvik konkluderte i 2005 om at det var et av de mest egnede for RT-qPCR-analyser ved testing for genuttrykk i atlantisk laks (45).

2.7 $\Delta\Delta$ Ct-metoden for normalisering av RT-qPCR data

Relativ genekspressjonsdata analyseres ved bruk av RT-qPCR og Δ Ct-metoden.

De to vanligste metodene som brukes for å analysere RT-qPCR resultater er absolutt kvantifisering og relativ kvantifisering (46).

Relativ kvantifisering er sammenligning av PCR signal fra et transkriptert målgen i en målgruppe (behandlet) mot en kontrollgruppe (ubehandlet gruppe). Den ubehandlede gruppen brukes som en nullkontroll (46).

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

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

$$\text{Ligning 3: } \text{Fold changes} = -\Delta\Delta Ct$$

I denne oppgaven blir Δ Ct utregnet for å normalisere Ct-verdier for målgenene mot referansegene, det vil si å ta høyde for intern bakgrunnsekspressjon i prøvene. $\Delta\Delta$ Ct utregnes for å sammenligne genekspressjonen til målgener i en behandlet gruppe, mot genekspressjonen til målgener i en ubehandlet kontrollgruppe. Dette resulterer i en relativ kvantifisering av genuttrykk, hvor man sammenligner genekspressjon til en eksperimentell gruppe med en ubehandlet kontrollgruppe (46).

3 Metoder og materialer

Materialer og metode vil ta for seg de ulike trinnene i prosedyrene som ble brukt for å gjennomføre de praktiske delene av oppgaven og bearbeidelse av resultat.

3.1 Cellefiksering

Forsøket startet med utdeling av ferdigkultiverte ASK-celler med en konfluens på 80%. Disse cellene hadde regelmessig blitt splittet av veileder.

Atlantic salmon kidney (ASK)-celler er en epitelcellelinje som i 1998 ble isolert fra nyrene til en voksen atlantisk hunnlaks. Denne cellelinjen(ATCC: CRL-2747) ble høstet av J Rolland, J Winton og B Krossoey. ASK-celler vokser adherente og optimalt ved 20°C i Leibovitz's L-15 Medium (2).

Leibovitz's L-15 Medium er brukt for å kultivere ASK-cellene. L-15 mediumet er bufret av fosfater og frie baseaminosyrer i stedet for natriumbikarbonat. Dette mediumet er designet for å støtte cellevekst i miljøer uten CO₂-ekvilibrering. Det inneholder ingen proteiner, lipider eller vekstfaktorer. På bakgrunn av dette krever L-15 tilskudd av 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (47).

Før selve cellefikseringen, ble et pilotforsøk gjennomført hvor det ble testet ulike konsentrasjoner av CuSO₄ i 24 timer. 100 mg/L ble bestemt som konsentrasjon da det ved mikroskopering ble observert 50% levende celler. Ved denne konsentrasjonen ble det forventet en respons på gennivå gjennom tidsserien på 24 timer.

Fikseringen av cellene startet med at de ble tatt ut av inkubatorskapet og konfluens ble avgjort i invertmikroskop. Ved en konfluens på 80% ble en parallell med celler videre behandlet i LAF-benk hvor gammelt medium ble fjernet og nytt medium med en konsentrasjon på 100mg/L CuSO₄ ble tilsatt. Den tilhørende parallellen fungerte som ubehandlede prøver, hvor gammelt medium ble fjernet og nytt ble tilsatt. Totalt ble 24 celleflasker med størrelse 25 cm² analysert, i tillegg til 2 celleflasker som ble brukt som nullprøver. Celleflaskene ble plassert i inkubatorskapet ved 20°C, og celler ble høstet ved ulike tidspunkt. Totalt var det 6 ulike tidspunkt og forsøket foregikk i 24 timer. De ulike tidspunktene cellene ble tatt ut var etter 2, 4, 6, 8, 12 og 24 timer og er illustrert i Tabell 1.

Tabell 1 Oversikt over klokkeslett cellene fra stressforsøket ble høstet inn.

| Tidspunkt | - CuSO ₄ (h) | + CuSO ₄ (h) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 09:30 | 0 | |
| 11:30 | 2 | 2 |
| 13:30 | 4 | 4 |
| 15:30 | 6 | 6 |
| 17:30 | 8 | 8 |
| 21:30 | 12 | 12 |
| 09:30 | 24 | 24 |

Selve innhøstingen av cellene ble utført etter protokoll KSH 001, vedlegg 4. Dette ble gjort ved å først fjerne gammelt medium, for så å vaske cellene forsiktig med PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). 1,5 ml av 0,25% trypsin-EDTA ble tilsatt og trypsinering ble overvåket i invertmikroskop. Trypsineringen ble inaktivert etter at 80% av cellene hadde løsnet.

Deretter ble trypsin inaktivert ved å tilsette 4,0 ml av Leibovitz's L-15 vekstmedium.

Cellesuspensjonen ble overført til 15 ml falconrør (Falcon, a.nr. 352070), og sentrifugert på 1300 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellepelletten ble resuspendert i 350 µl buffer RLT+ DTT (10%). Deretter ble cellene pipettert over i 2 ml Eppendorf rør. Prøvene ble direkte lagret i -80 °C fryser før videre RNA-isolering

I tillegg ble et pH-meter brukt til å måle pH- verdien i vekstmediumet som ble fjernet fra nullprøvene og kobberprøvene, både før og etter stressforsøket. Dette var for å se om CuSO₄ påvirket pH-verdien i vekstmediumet.

3.2 RNA-isolering og cDNA syntese

ASK-cellene fra stressforsøket ble RNA-isolert med RNeasy mini spin kit fra Qiagen etter prosedyren KSH 001 vedlegg 4. Dette gjaldt 14 ASK-celleprøver uten eksponering for CuSO₄, inkludert nullprøvene. I tillegg til 12 ASK-celleprøver med eksponering for CuSO₄. Totalt ble RNA isolert fra 26- celleprøver fra stressforsøket og videre cDNA-syntetisert.

cDNA ble også syntetisert fra RNA-prøver av gjelleprøver fra et tidligere eksperiment, hvor RNA allerede var isolert og klare til bruk. Det var to grupper gjelleprøver, en D-gruppe og en S6-gruppe. Prøvene for D-gruppen ble hentet ut fra oppdrettslaks i det tidspunktet laksen ble satt i sjøen ved sjøoverføring. Prøvene for S6-gruppen ble hentet ut seks uker etter sjøoverføringen. Det var 13 prøver av hver prøvegruppe D og S6.

cDNA-syntesen ble gjennomført med qScript cDNA Synthesis Kit fra Quantabio i henhold til leverandørens prosedyre. 10ml RNA-prøve og 5ml nukleasefritt vann ble tilsatt da dette tilsvarte en mengde RNA innenfor et spesifisert område i alle prøvene. Syntesen ble gjennomført i en termosyklus etter følgende program: 1 syklus av 22°C i 5min, 1 syklus med 42°C i 30min, 1 syklus av 85°C i 5 min, etterfulgt av hold på 4°C. Qubit 4.0 fluorometer og DNA High Sensitivity kit fra Invitrogen ble brukt for å måle cDNA-konsentrasjon etter Qubit manualen, se vedlegg 6.

3.3 RT-qPCR

RT-qPCR-reaksjoner ble gjennomført etter prosedyren KSH 004, vedlegg 8. Dersom cDNA var fryst, ble konsentrasjonen målt på nytt ved hjelp av Qubit. Resultatene fra Qubit ble brukt til å kalkulere fortynning av cDNA til en konsentrasjon 400pg/7,34ml H₂O. Primerstocks for Forward primers, og Reverse primers var på 500nM, og ble fortynnet med autoklavert H₂O. Hver brønn på qPCR-plata inneholdt følgende: 10µl SYBR Green Low Rox, 1.33µl Forward primer, 1.33µl Reverse primer og 7,34µl av cDNA+H₂O, med et volum på 20µl per brønn. På hver RT-qPCR-kjøring ble hver av prøvene analysert i duplikater, samt at NTC uten cDNA for hver primertype ble tatt for å verifisere at primerne, SYBR green og H₂O ikke var kontaminerte med DNA.

Analysen ble utført på Aria Mx ved bruk av 96-brønnsplater, MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate. Platene ble kjørt med følgende sykluser: 3 min på 95°C, 38 sykluser med 15s på 95°C, 20s på 58°C og 30s på 72°C. Resultatene fra Aria Mx ble eksportert til Excel.

3.3.1 RT-qPCR primere

Primere og tilhørende sekvenser som ble brukt for RT-qPCR analysene i denne oppgaven er listet opp i Tabell 2.

Tabell 2 Sekvenser, amplikonlengde, GenBank nummer til primere for RT-qPCR for de valgte genene. F= Forward, R= Reverse

| Gen | Sekvens (5'→3') | GenBank nr. | Amplikonlengde (bp) |
|--------------|---|----------------|---------------------|
| <i>cyp1a</i> | (F): TGGAGATCTTCCGGCACTCT; (R): CAGGTGTCCTTGGGAATGAA | AF361643.1 | 100 |
| <i>hsp70</i> | (F): TCAAACATCGACTCAACGAGAA; (R): CCCAGGTCAATGCCGATAGA | XM_014191271 | 140 |
| <i>nrf2</i> | (F): GAGGGACGAGGATGGGAAG; (R): ATCGGTGGTCTGCTGGAG | NM_001139807.1 | 61 |
| <i>p38</i> | (F): CGAGGCCAGGAACTACATCA; (R): GCTCCGATGAACACGTCAGA | NM_001123715.1 | 72 |
| <i>actb</i> | (F): CCATCCAGGCAGTGTTGT; (R): CGGAGTCCATGACGATACC | KU885449.1 | 63 |
| <i>ef1a</i> | (F): TGCCCCTCCAGGATGTCTAC; (R): CACGGCCCACAGGTACTG | XM_014141923.1 | 57 |

3.4 Datanalyse

Aligent AriaMx 1.8 fungerer som RT-qPCR-instrumentets software. Alt av deteksjon og innsamling av rådata slik som Ct-verdier, og smeltepunkter (T_m) transporteres direkte til Microsoft Excel.

For gjelleprøvene ble det tatt ut 11 prøver fra hvert tidsintervall, det vil si 11 prøver fra D-gruppen (i det fisken ble satt ut i sjøen) og 11 prøver fra S6 (seks uker etterpå). S6-gruppen ble sammenlignet med D-gruppen som fungerte som kontrollgruppe (baseline 0). Hver prøve ble analysert i duplikat. Etter RT-qPCR-kjøringen var fullført, ble rådata fra Aria Mx presentert i Excel.

I Excel ble standardavvik av duplikatene regnet ut, og relativ genekspressjon ble utregnet ved å bruke ΔC_t -metoden og de tre tilhørende ligninger, som beskrevet i teoridelen 2.7 $\Delta\Delta C_t$ -metoden for normalisering av RT-qPCR data.

$-\Delta\Delta C_t$ -verdiene ble fremstilt ved stolpediagrammer for å kunne gi tolkbar informasjon når det kommer til relativ opp- og nedregulering av målgener. Ct-verdier for alle gener og referansegener ble fremstilt på trendlinjer for å gi informasjon om stabiliteten av genene.

3.5 Statistikk

Etter å ha beregnet relativ genuttrykk ble statistiske analyser utført ved hjelp av IBM SPSS hvor statistikk ble analysert på $D C_t$ nivå. For å beregne statistisk signifikans ble independent two sample t-test benyttet. P-verdi $< 0,05$ gir uttrykk for signifikant forskjell i endring i gennivå mellom behandlet gruppe og kontrollgruppe (48).

4 Resultater

Resultatene som fremstilles er knyttet til observasjoner rundt stressforsøk av ASK-celler og datafremstillinger fra genekspresjonsanalysene av *in vivo* og *in vitro*.

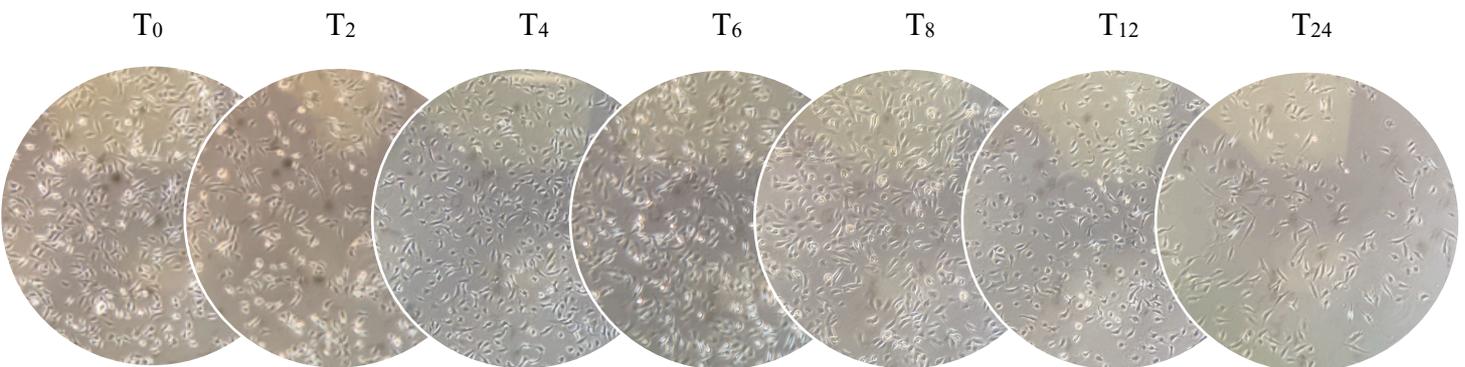
4.1 Observasjoner av ASK-celler fra stressforsøket

Observasjoner av celleproliferasjon ble utført i invertmikroskop ved hvert tidspunkt cellene ble innhøstet, se Figur 2 og Figur 3 for bilder av cellene i tidsserien opp mot 24 timer. Hos både kontrollprøvene og prøvene eksponert for CuSO₄ ble det gradvis observert en økning av døde celler. Allerede ved T₆ ble det observert cellerester og celledød hos prøvene tilsatt CuSO₄. Døde celler var enkle å observere ved at de tydelig lå og fløyt ved overflaten av celleflasken og endret struktur fra å være langstrakte til runde celler.

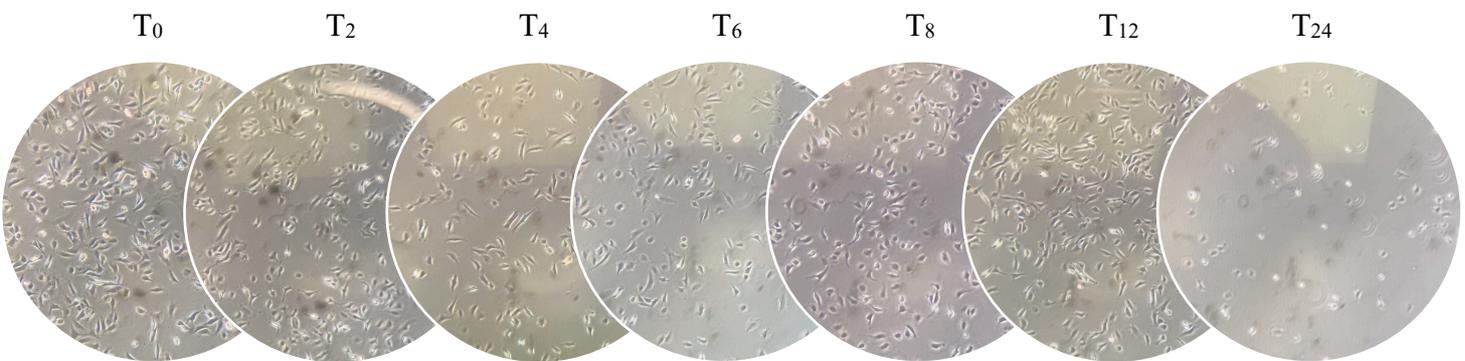
Hos kontrollprøvene var det ikke registrert celledød før ved T₈. Hos prøvene eksponert for CuSO₄ steg antall døde celler gradvis, og etter 12 timer var omtrent en tredjedel av cellene døde.

Konfluensen holdt seg lenge lik hos både prøvene med og uten CuSO₄. Først etter 12 timer ble det observert ulikheter. Nullprøvene hadde en nedgang i til 60-70% i konfluens, som holdt seg konstant opp mot 24 timer. Prøvene eksponert for CuSO₄ hadde først en kraftig økning i konfluens ved T₆, og etter dette sank konfluensen gradvis opp mot 24 timer. Ved T₂₄ var konfluensen til prøvene eksponert CuSO₄ sunket ned til 30%, og nesten alle cellene var døde.

Bilder av cellekonfluensen til ASK-celler fra hvert tidsintervall av stressforsøket er vist i Figur 3 og Figur 4.



Figur 3 Cellekonfluensen til ASK-celler uten kobbersulfat ved de ulike tidsintervallene i stressforsøket. Bildene er tatt med mobilkamera i et invertmikroskop.



Figur 4 er Cellekonfluensen til ASK-celler med kobbersulfat ved de ulike tidsintervallene i stressforsøket. Bildene er tatt med mobilkamera i et invertmikroskop.

Resultater fra pH-målinger av medium fra stressforsøket er framstilt i Tabell 3.

Tabell 3 Resultater fra pH-målingene

| Tidspunkt (h) | pH av medium uten CuSO ₄ | pH av medium med CuSO ₄ |
|---------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 0 t | 7.4 | 7.3 |
| 24 t | 8 | 7.9 |

4.2 Relativ genekspressjon av *in vivo* - gjelleprøver fra atlantisk laks

Resultatene er basert på RT-qPCR-analysene av målgenene *cyp1a*, *hsp70*, *nrf2* og *p38*. Ct-verdier av målgener er blitt normaliserte med Ct-verdier fra en kontrollgruppe. Alle utregninger for gjennomsnittlige Ct-, Tm- og Δ Ct-verdier med tilhørende standardavvik er gjort på Excel. Statistikk og utregning av p-verdier er gjort med SPSS. Se vedlegg 1, 2 og 3 for gjennomsnittlige Ct-, Tm- og Δ Ct-verdier med tilhørende standardavvik for alle prøvene.

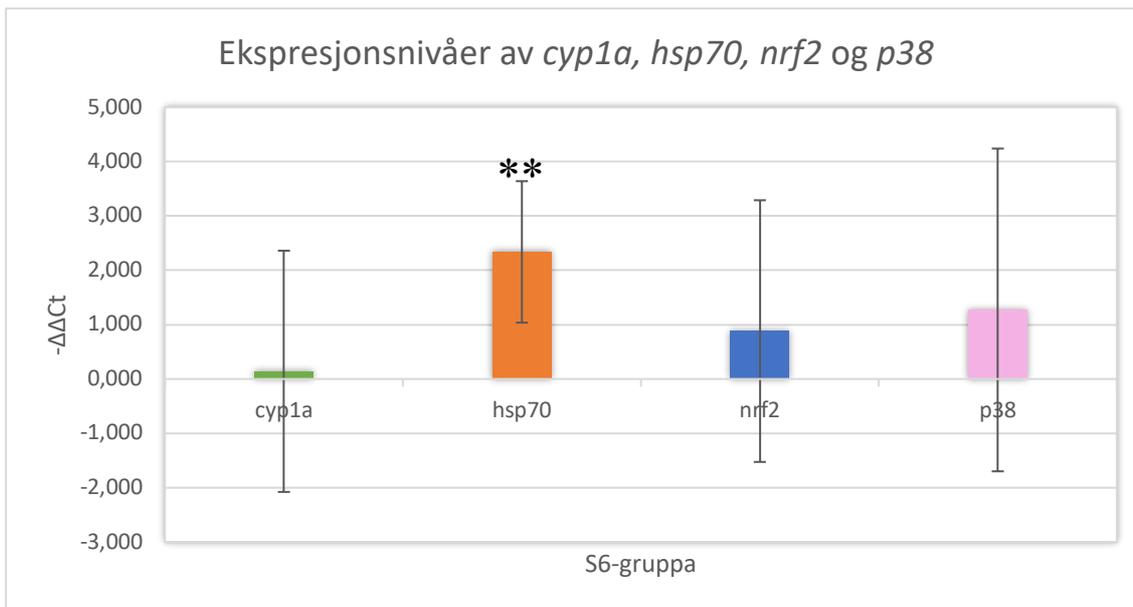
Resultatene for *in vivo* prøvene er fremstilt i Tabell 4 og Figur 5. Kun målgenet *hsp70* var signifikant oppregulert i relativ genekspressjon, med en p-verdi på 0,001.

Tabell 4 Oversikt over gjennomsnittlige -DDCt for hvert målgen for prøve 1-11 for S-gruppen samt standardavviket for -DDCt-verdiene . Beregninger av -DDCt og standardavvik er blitt gjort i Microsoft Excel versjon 16. Statistikkberregninger av p-verdi er blitt gjort i SPSS ved T-test metoden.

| | $-\Delta\Delta$ Ct gjennomsnitt | Standardavvik | Opp/Ned regulering | p-verdi | Sign./Ikke Sign |
|--------------|---------------------------------|---------------|--------------------|---------|------------------|
| <i>cyp1a</i> | 0,14 | 2,22 | Opp | 0,573 | Ikke signifikant |
| <i>hsp70</i> | 2,34 | 1,30 | Opp | 0,001 | Signifikant |
| <i>nrf2</i> | 0,88 | 2,41 | Opp | 0,223 | Ikke signifikant |
| <i>p38</i> | 1,27 | 2,97 | Opp | 0,154 | Ikke signifikant |

Relativ genekspressjon er visualisert på Figur 5 ved bruk av $-\Delta\Delta$ Ct-verdier presentert på y-aksen. Prøvegruppe S6 ble normalisert i forhold til kontrollgruppa (prøvegruppe D). Positive y-verdier tilsvarer oppregulering av genekspressjon. Negative y-verdier tilsvarer en nedregulering av genekspressjon.

For S6-gruppen er *cyp1a* noe oppregulert med en gjennomsnittlig $-\Delta\Delta$ Ct-verdi på 0,14, og standardavvik på 2,22. *Hsp70* er det høyeste oppregulerte genet i denne prøvegruppen med gjennomsnittlig $-\Delta\Delta$ Ct-verdi på 2,34, og laveste standardavvik i prøvegruppen på 1,30. *Hsp70* er også eneste målgenet med signifikant endring i genekspressjon. *Nrf2* blir oppregulert med gjennomsnittlig $-\Delta\Delta$ Ct-verdi på 0,88, og standardavvik på 2,41. *p38* blir oppregulert med gjennomsnittlig $-\Delta\Delta$ Ct-verdi på 1,27, og standardavvik på 2,97.



Figur 5 Relative mRNA ekspresjonsnivå av målgenene *cyp1a*, *hsp70*, *nrf2* og *p38*, for gruppe S6 er sammenlignet med kontrollgruppe D (representert ved $y=0$). Gruppenavnene er basert på tidspunkt prøvene er tatt på, D=det tidspunktet laksen settes ut i sjø og er dermed et nullpunkt i sjøfasen til laksen. S6 = 6 uker etter sjøoverføringen, men i tillegg 3 dager etter notspyling. Signifikante verdier er markert med (**) for $p < 0,01$. Standardavvikene er representert med feilfelt. Figuren viser at *hsp70* er oppregulert med signifikant endring i genekspressjon mellom D- og S6-gruppen.

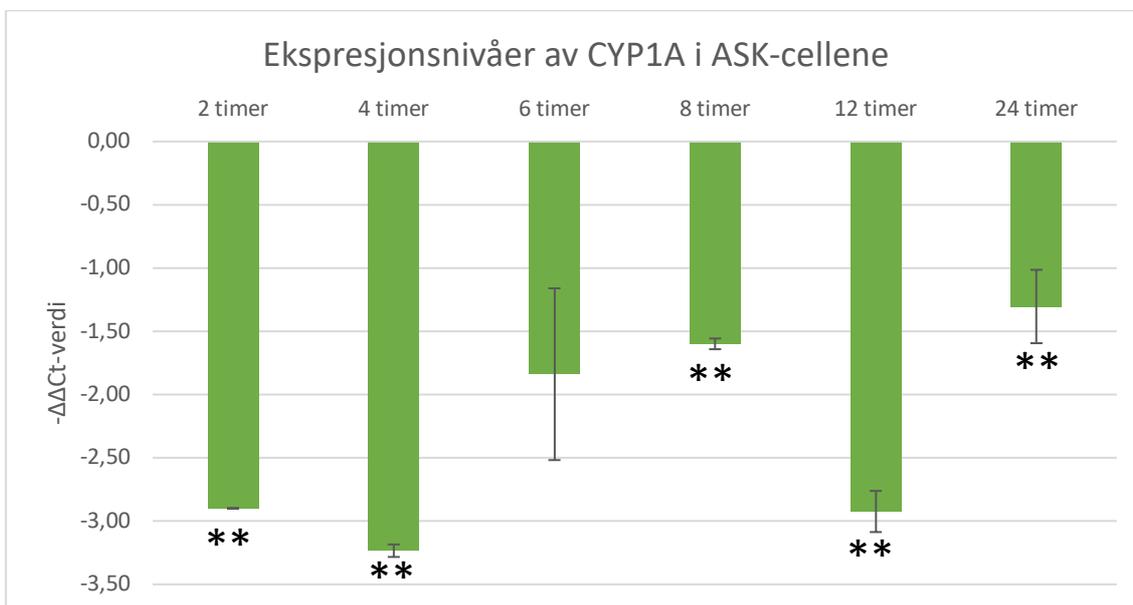
4.3 Relativ genekspressjon av *in vitro* - ASK-celler

Det ble gjort RT-qPCR-analyser av prøvegruppene ASK-celler uten kobbersulfat, og ASK-celler med kobbersulfat. Det ble høstet inn celler fra begge prøvegruppene fra 6 ulike tidspunkter til RT-qPCR-analyse. Parallele biologiske prøver av ASK-cellene ble analysert. Resultatene av relativ genekspressjonen av målgenene blir presentert hver for seg med hver sine tabeller og stolpediagram.

Resultatene for relativ mRNA ekspresjonsnivåer av *cyp1a* i ASK-cellene er fremstilt i Tabell 5, og Figur 6, hvor man kan se nedregulering av målgenet *cyp1a* ved hvert tidspunkt. Alle tidspunktene hadde en signifikant endring i genekspressjon av *cyp1a* med p-verdier < 0,01, utenom prøvene etter 6 timer hvor p-verdi var 0,067 ga ikke signifikant endring.

Tabell 5 Oversikt over gjennomsnittlige $-\Delta\Delta Ct$ -verdier for biologiske duplikat ved hvert tidsintervall for prøvegruppen ASK-celler med kobbersulfat fra stressforsøket. Denne tabellen gjelder kun genekspressjon av målgenet *cyp1a* ved alle tidsintervaller prøver ble tatt ut i løpet av stressforsøket. Beregninger ble gjort i Microsoft Excel versjon 16. Statistikkberegninger av p-verdi er blitt gjort i SPSS ved T-test metoden.

| CYP1A | | | | | |
|---------------|---------------------------------|---------------|--------------------|---------|------------------|
| Tidsintervall | $-\Delta\Delta Ct$ gjennomsnitt | Standardavvik | Opp/Ned regulering | p-verdi | Sign./Ikke Sign |
| 2 timer | -2,90 | 0,00 | Ned | 0,005 | Signifikant |
| 4 timer | -3,23 | 0,05 | Ned | 0,001 | Signifikant |
| 6 timer | -1,84 | 0,68 | Ned | 0,067 | Ikke signifikant |
| 8 timer | -1,60 | 0,04 | Ned | 0,004 | Signifikant |
| 12 timer | -2,92 | 0,16 | Ned | 0,001 | Signifikant |
| 24 timer | -1,30 | 0,29 | Ned | 0,002 | Signifikant |

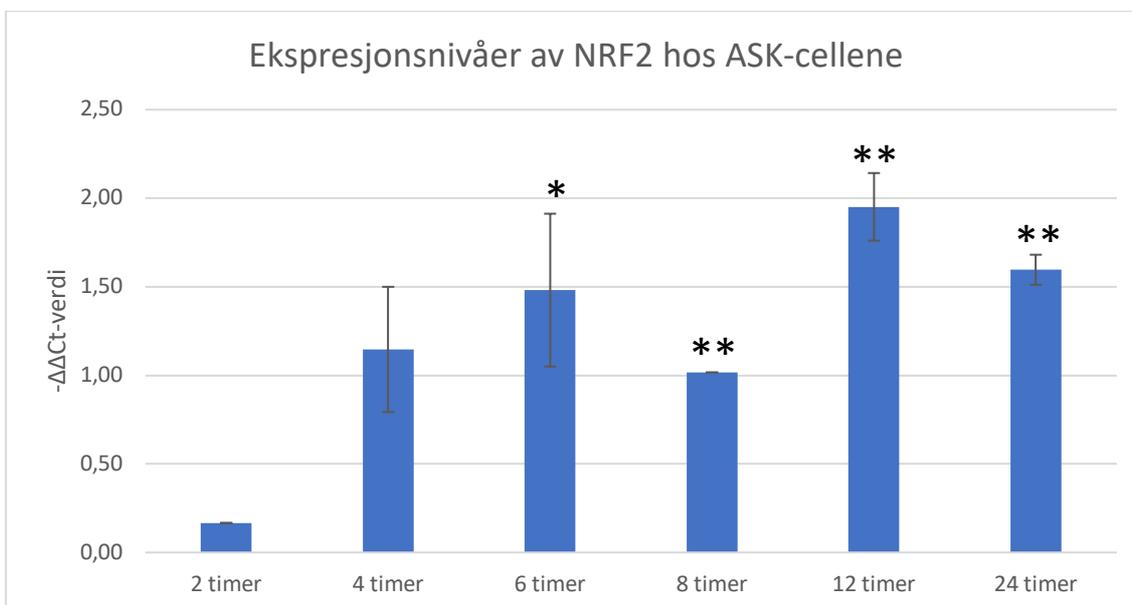


Figur 6 Relative endringer i mRNA nivåer for målgenet *cyp1a*. Det er nedregulering av *cyp1a* ved alle tidspunkter av stressforsøket. Y-aksen viser $-\Delta\Delta Ct$ -verdier, og $y=0$ regnes som normale forhold hvor prøvegruppen ASK-celler uten kobbersulfat er kontrollgruppen. Signifikante verdier er markert med (**) for $p < 0,01$. Standardavvikene er representert med feilfelt.

Resultatene for relativ mRNA ekspresjonsnivåer *nrf2* er fremstilt i Tabell 6 og Figur 7. Målgenet *nrf2* blir oppregulert ved alle tidsintervallene av stressforsøket. Alle standardavvik tilhørende $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdiene var under 0,5. Genekspresjonen av *nrf2* de første 2 timer var relativ lav, og ikke signifikant. Etter 4 timer ble *nrf2* oppregulert fra en $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdi på 0,17 til 1,15, men forskjellen utgjorde ingen signifikans. Etter 6 timer ble det signifikant genekspresjon med p -verdi $<0,05$. Fra 8 timer til 24 timer var det signifikant genekspresjon med p -verdi $<0,01$.

Tabell 6 Oversikt over gjennomsnittlige $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdier for biologiske duplikat ved hver tidsintervall for prøvegruppen ASK-celler med kobbersulfat fra stressforsøket. Denne tabellen gjelder kun genekspresjon av målgenet *nrf2* ved alle tidsintervaller prøver ble tatt ut i løpet av stressforsøket. Beregninger ble gjort i Microsoft Excel versjon 16. Statistikkberegninger av p -verdi er blitt gjort i SPSS ved T-test metoden.

| NRF2 | | | | | |
|---------------|---------------------------------------|---------------|--------------------|---------|------------------|
| Tidsintervall | $-\Delta\Delta\text{Ct}$ gjennomsnitt | Standardavvik | Opp/Ned regulering | p-verdi | Sign./Ikke Sign |
| 2 timer | 0,17 | 0,00 | Opp | 0,080 | Ikke signifikant |
| 4 timer | 1,15 | 0,35 | Opp | 0,073 | Ikke signifikant |
| 6 timer | 1,48 | 0,43 | Opp | 0,019 | Signifikant |
| 8 timer | 1,02 | 0,00 | Opp | 0,006 | Signifikant |
| 12 timer | 1,95 | 0,19 | Opp | 0,002 | Signifikant |
| 24 timer | 1,60 | 0,08 | Opp | 0,008 | Signifikant |

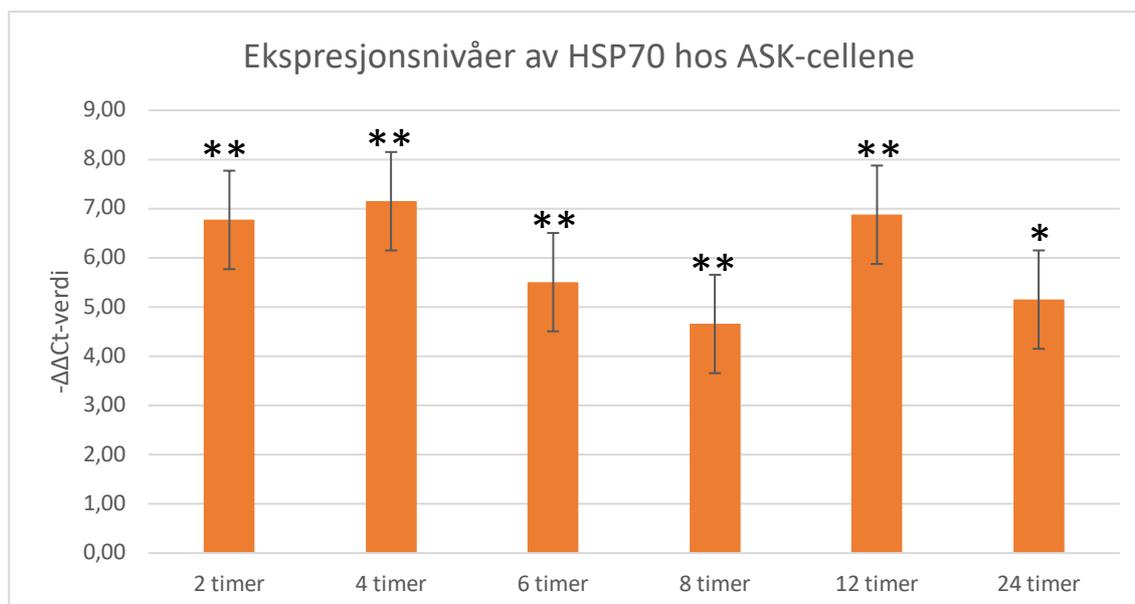


Figur 7 Relative endringer i mRNA nivåer for målgenet *nrf2*, som viser oppreguleringer av *cyp1a* ved alle tidsintervaller av stressforsøket. Y-aksen viser $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdier, og $y=0$ regnes som normale forhold hvor prøvegruppen ASK-celler uten kobbersulfat er kontrollgruppen. Signifikante verdier er markert med (*) for $p < 0,05$ og (**) for $p < 0,01$. Standardavvikene er representert med feilfelt.

Resultatene for relativ mRNA ekspresjonsnivåer av *hsp70* er framstilt i Tabell 7 og Figur 8. *Hsp70* ble oppregulert ved alle tidsintervallene av stressforsøket. *Hsp70* er genet med høyest $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdier, og er det mest oppregulerte av alle målgenene i denne oppgaven. Standardavviket ved 6- og 8 timer var over 0,05, mens for de resterende var under 0,05 og dermed signifikant. Alle prøver fra 2 timer, til og med 12 timer fikk p-verdier $<0,01$, og signifikant endring i genekspressjon fra kontrollgruppa. Etter 24 timer var det fremdeles signifikans, men med p-verdi $<0,05$. Figur 8 viser en oppregulering av *hsp70* for alle tidsintervaller ASK-celler ble høstet inn på.

Tabell 7 Oversikt over gjennomsnittlige $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdier for biologiske duplikat ved hver tidsintervall for prøvegruppen ASK-celler med kobbersulfat fra stressforsøket. Denne tabellen gjelder kun genekspressjon av målgenet *hsp70* ved alle tidsintervaller prøver ble tatt ut i løpet av stressforsøket. Beregninger ble gjort i Microsoft Excel versjon 16. Statistikkberegninger av p-verdi er blitt gjort i SPSS ved T-test metoden.

| HSP70 | | | | | |
|---------------|---------------------------------------|---------------|--------------------|---------|-----------------|
| Tidsintervall | $-\Delta\Delta\text{Ct}$ gjennomsnitt | Standardavvik | Opp/Ned regulering | p-verdi | Sign./Ikke Sign |
| 2 timer | 6,77 | 0,00 | Opp | 0,001 | Signifikant |
| 4 timer | 7,15 | 0,10 | Opp | 0,001 | Signifikant |
| 6 timer | 5,51 | 1,07 | Opp | 0,017 | Signifikant |
| 8 timer | 4,66 | 0,62 | Opp | 0,007 | Signifikant |
| 12 timer | 6,88 | 0,22 | Opp | 0,001 | Signifikant |
| 24 timer | 5,15 | 0,13 | Opp | 0,020 | Signifikant |

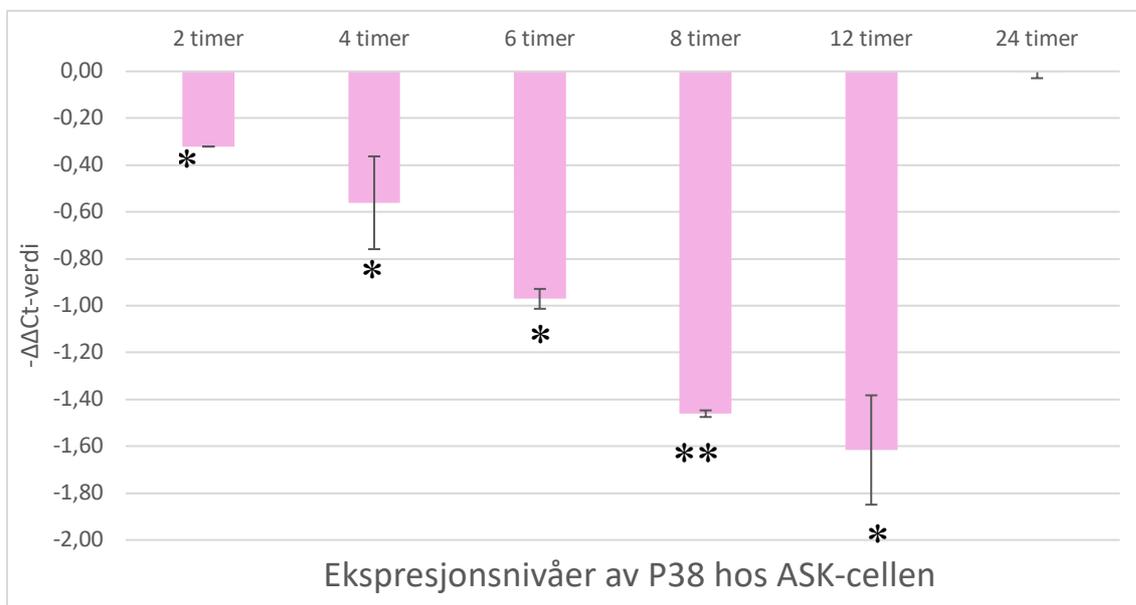


Figur 8 Relative endringer i mRNA nivåer for målgenet viser oppreguleringer av målgenet *hsp70* ved alle tidsintervaller av stressforsøket. Y-aksen viser $-\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdier, og $y=0$ regnes som normale forhold hvor prøvegruppen ASK-celler uten kobbersulfat er kontrollgruppen. Signifikante verdier er markert med (*) for $p<0,05$ og (**) for $p<0,01$. Standardavvikene er representert med feilfelt.

Resultatene for relativ mRNA ekspresjonsnivåer av *p38* er framstilt i Tabell 8 og Figur 9. Målgenet *p38* ble gradvis mer og mer nedregulert de første 12 timene. Ved slutten av forsøket, etter 24 timer er den oppe på samme genuttrykksnivå som prøvene uten kobbersulfat. Alle prøvene hadde standardavvik under 0,5. Ved 8 timer var det signifikant forskjell i genekspressjon fra kontrollgruppa med en p-verdi < 0,01, mens de resterende prøvene ga også signifikant forskjell, men med en p-verdi < 0,05.

Tabell 8 Oversikt over gjennomsnittlige $-\Delta\Delta Ct$ -verdier av biologiske duplikat ved hver tidsintervall for prøvegruppen ASK-celler med kobbersulfat fra stressforsøket. Denne tabellen gjelder kun genekspressjon av målgenet *p38* ved alle tidsintervaller prøver ble tatt ut i løpet av stressforsøket. Beregninger ble gjort i Microsoft Excel versjon 16. Statistikkberegninger av p-verdi er blitt gjort i SPSS ved T-test metoden.

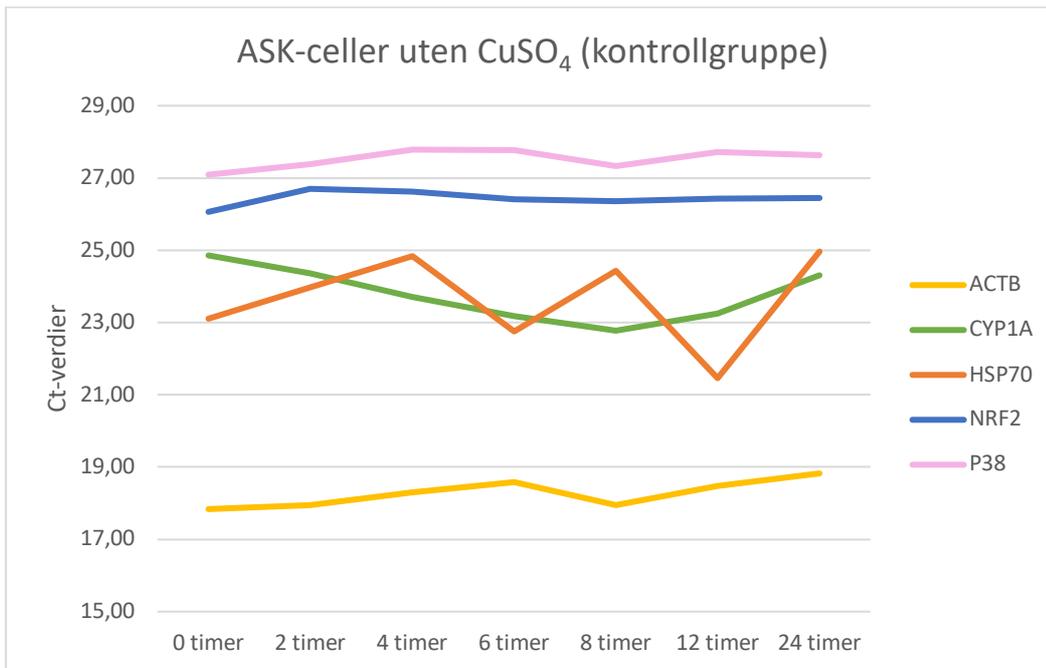
| P38 | | | | | |
|---------------|---------------------------------|---------------|--------------------|---------|-----------------|
| Tidsintervall | $-\Delta\Delta Ct$ gjennomsnitt | Standardavvik | Opp/Ned regulering | p-verdi | Sign./Ikke Sign |
| 2 timer | -0,32 | 0,00 | Ned | 0,045 | Signifikant |
| 4 timer | -0,56 | 0,20 | Ned | 0,043 | Signifikant |
| 6 timer | -0,97 | 0,04 | Ned | 0,025 | Signifikant |
| 8 timer | -1,46 | 0,01 | Ned | 0,011 | Signifikant |
| 12 timer | -1,62 | 0,23 | Ned | 0,001 | Signifikant |
| 24 timer | 0,00 | 0,03 | Ned | 0,039 | Signifikant |



Figur 9 Relative endringer i mRNA nivåer for målgenet viser gradvis nedreguleringer av målgenet *p38* ved alle tidsintervaller av stressforsøket. Etter 24 timer, ved slutten av forsøket kan man se at ekspresjonsnivået av *p38* går tilbake som ved normale forhold. y-aksen viser $-\Delta\Delta Ct$ -verdier, og $y=0$ regnes som normale forhold hvor prøvegruppen ASK-celler uten kobbersulfat er kontrollgruppa. Signifikante verdier er markert med (*) for $p < 0,05$ og (**) for $p < 0,01$. Standardavvikene er representert med feilfelt

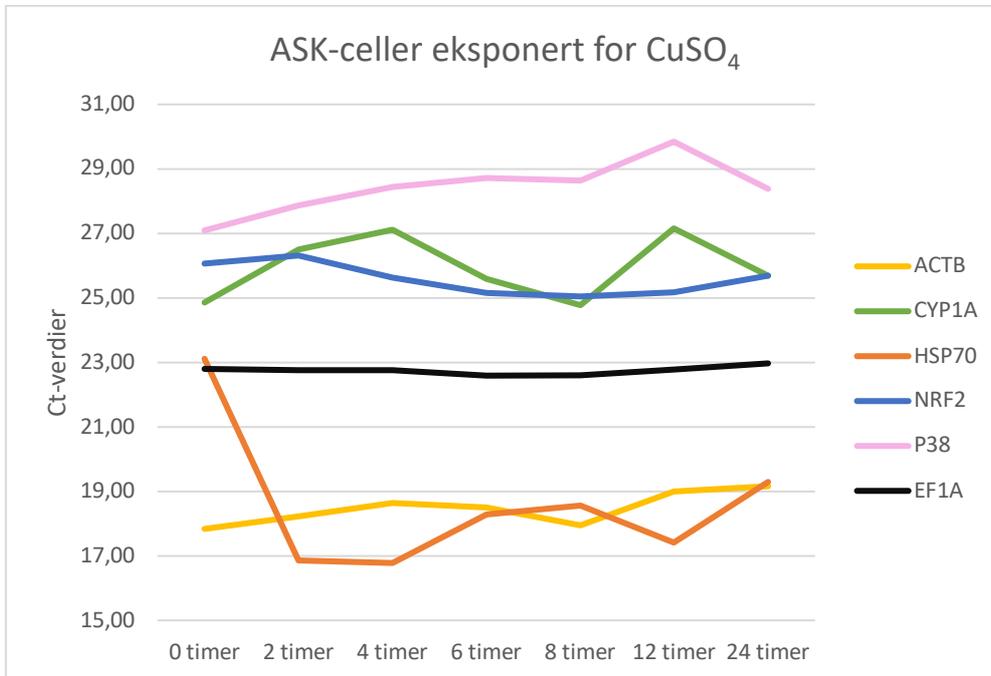
4.4 Referansegener og dets stabilitet

Ct-verdiene til alle de analyserte genene for hvert tidspunkt er presentert i Figur 10 (ubehandlede kontrollceller) og Figur 11 (celler eksponert for CuSO₄). Figurene viser at referansegenene *actb* og *efl α* forblir forholdsvis stabile gjennom tidsserien opp mot 24 timer, også der med cellene har blitt stresset med CuSO₄. Vi fikk ingen resultater av referansegenet *efl α* hos kontrollgruppa grunnet problemer med RT-qPCR-instrumentet og reagenser.



Figur 10 Stabiliteten til de analyserte genene inkludert referansegenene fra starten til slutten av stressforsøket for de ASK-cellene uten kobbersulfat. Det er Ct-verdier på y-aksen, og tidspunktet prøvene ble tatt på x-aksen. Resultatet er ikke normalisert opp mot noe slik som ved figurene for relativt genuttryksnivå sammenlignet med kontrollgrupper.

Figur 11 inkluderer resultater fra *ef1a* selv om dette genet ble ekskludert fra oppgaven. Referansegenet *actb* var stabilt nok, men *ef1a* var enda mere stabilt enn *actb*. Genet *actb* hadde Ct-verdier mellom 17,88 og 19,29. Genet *ef1a* hadde Ct-verdier mellom 22,25 og 23,04.



Figur 11 Stabiliteten til de analyserte genene inkludert referansegenene fra starten til slutten av stressforsøket for de ASK-cellene med kobbersulfat. Det er Ct-verdier på y-aksen, og tidspunktet prøvene ble tatt på x-aksen. Resultatet er ikke normalisert opp mot noe slik som ved figurene for relativt genuttryksnivå sammenlignet med kontrollgrupper. Her er også referansegenet *ef1a* tatt med for å demonstrere at *ef1a* ble analysert for denne prøvegruppen. Den svarte linjen illustrerer stabiliteten til referansegenet *ef1a*, og man kan se på figuren at *ef1a* var meget stabilt.

5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført genekspressjonsanalyser av gjellevevsprøver fra atlantisk laks og kommersielle ASK-celler ved ulike tidsintervaller. Hensikten var å se på genuttrykk for de samme genene for å kunne diskutere potensielle likheter ved eksponering av CuSO₄ på ASK-celler og notspyling i oppdrettsanlegg. Formålet med oppgaven er å øke kunnskap om effekten av kobber på stressrelaterte gener.

5.1 Analyse av genekspressjon hos gjellevevsprøver fra sjø

Endringer i genekspressjon av gjellevevsprøver fra sjø er framstilt på Figur 5, hvor man kan se at målgenene *cyp1a*, *hsp70*, *nrf2* og *p38* ble oppregulert. Kun oppregulering av *hsp70* var av signifikant endring fra kontrollgruppa. Som tidligere nevnt (kapittel 2.5.2) er dette genet en følsom biomarkør og aktiveres vanligvis av en økning i temperatur, men er også evaluert til å ha sammenheng med miljøforurensing (49). Den betydelige oppreguleringen av dette genet kan tyde på at notspylingen kan ha ført til stressende forhold for fisken.

Siden resultatene ikke ga noen signifikant forskjell i genuttrykk av målgenene *cyp1a*, *nrf2* og *p38* mellom S6-gruppen fra kontrollgruppa, kan man anta at notspylingen som ble utført 3 dager før prøveuttak av S6-gruppen ikke har påført laksen noen store eller langvarige negative virkninger. Fra en tidligere studie utført av Østevik (2021) ble det vist at notspyling hadde relativt små og kortvarige negative virkninger hos gjelleprøvene. De hadde ingen signifikante forskjeller i genekspressjon 8-9 dager etter notspyling (50).

Vår genekspressjonsanalyse av gjellevevsprøvene som ble tatt ut 3 dager etter en notspyling ga omtrent samme observasjoner som ved Østevik's studie.

Det må også understrekes at vi kan ikke si med sikkerhet at det er kobber i seg selv som har ført til oppregulering av *hsp70*. Som beskrevet i kapittel 2.1 finnes det også en rekke andre potensielle stressorer i oppdrettssammenheng. I tillegg kan også de stressrelaterte genene i studien ikke være veldig relevante i stressrespons etter notspyling, eller at de ikke var betydelig endret på prøvetakingstidspunktet. Basert på våre resultater og Østevik sin studie, kan man anta at fisken ikke får store eller langvarige negative virkninger etter en notspyling. Det er derimot ukjent hvordan flere notspylinger vil påvirke laksen.

5.2 Pilotstudie og celleproliferasjon av ASK-celler

Før forsøket av ASK-celler ble det utført et testforsøk for å bekrefte hvilken konsentrasjon av CuSO_4 som skulle brukes. Dette grunnet lite forskning rundt emnet og som tidligere nevnt varierer den akutte toksisiteten mellom ulike fiskearter og kan være alt fra 0,001-730 mg/L (16). Målet var å velge en konsentrasjon som ville påføre cellene stress, men ikke drepe dem. Basert på litteratur ble den første konsentrasjonen som ble valgt ut på 300 mg/L. Testforsøket viste seg å være en avgjørende prosess da absolutt alle cellene døde etter 24 timer og det bare sto igjen cellerester. Dette var dermed et svært viktig optimaliseringspunkt i forskningen og indikerte at en konsentrasjon på 100 mg/L sannsynligvis ville være passende for å kunne se en effekt på genekspressjon.

Stressforsøket med ASK-celler viste en stor nedgang i celleantallet og økt celledød (se Figur 3 og 4) hos prøvene tilsatt CuSO_4 . Det ble også observert en viss nedgang i konfluens mot slutten av eksperimentet for kontrollprøvene. Ved slutten av eksperimentet, T_{24} , var cellekonfluensen og antall døde celler hos kontrollprøvene ganske like som de var ved T_{12} . Dette vil altså si at disse cellene ikke hadde noen store endringer de siste 12 timene. Det må likevel nevnes at konfluens er vanskelig å fastslå eksakt, og er en individuell vurdering basert på anslått prosentvis dekningsgrad observert i invertmikroskop. Hos cellene tilsatt CuSO_4 var konfluensen på 30% ved 24 timer. At cellene er i dødsfasen kan sees tydelig ved at cellene skiftet struktur, og fløyt i mediet. Dette indikerer at flesteparten av cellene tilsatt CuSO_4 var da i dødsfasen og er da tydelig påvirket. Resultatene fra stressforsøket viste dermed at konsentrasjonen på 100 mg/L CuSO_4 hadde en effekt på celleproliferasjonen til ASK-cellenene.

pH-målingene fra Tabell 3, viste at pH i medium ikke var forandret fra start til slutt av forsøket. Det vil si at 100mg/L CuSO_4 ikke har en vesentlig påvirkning på pH. Vi kan si at endringene i genekspressjon er grunnet kobbersulfat på cellenivå, og utelukke at det er grunnet pH-endringer.

5.3 Analyse av genespresjon hos ASK-celler eksponert for CuSO₄

Stabiliteten av referansegene kan sees på trendlinjene Figur 10 og Figur 11. Resultatene tyder på at gennuttrykket til referansegene *actb* forholder seg stabilt gjennom tidsserien på 24 timer og vi anser dem som brukbar til normalisering av målgenene. I Figur 11 kan man også se resultatet for *efla*, som ble ekskludert fra oppgaven grunnet mangel på resultater hos kontrollprøvene. *Efla* ble tatt med i figuren for å demonstrere at det var mer stabilt enn *actb*.

Genet *cyp1a* var en foreslått biomarkør for miljøforurensing (51), og det var forventet en oppregulering av *cyp1a* hos ASK-celler ved eksponering for kobbersulfat. Til tross for denne forventningen, ble *cyp1a* nedregulert gjennom hele tidsserien opp mot 24 timer, se Figur 6. Som man kan se på figuren er ekspresjonsnivåer ved alle tidspunkter av signifikant endring, utenom ved 6 timer. I følge Olsvik sin studie om effekter av hypo- og hyporoksi på transkripsjonsnivåer av fem stressrelaterte gener i leveren til atlantisk torsk, kan en nedregulering av *cyp1a* forekomme av hypoksiske forhold (52). En nedregulering av *cyp1a* hos mennesker indikerer oksidativt stress, som kan forstyrre flere cellulære funksjoner, spesielt transkripsjonsregulering (53). Hva en nedregulering av *cyp1a* hos atlantisk laks indikerer, er ukjent.

Nrf2 oppreguleres gjennom hele tidsserien opp mot 24 timer, se Figur 7. De 4 første timene ga ingen signifikante endringer i gennuttrykk av *nrf2*, men fra 6 timer opp mot 24 timer var alle oppreguleringer statistisk signifikante. Under stressforhold, eksempelvis ved eksponering for mildt oksidativt stress eller kjemiske indukere, vil *nrf2* dissosiere og bli stabilisert og translokert inn i kjernene. Dette fører til økt transkripsjon av antioksidanter for å gjøre cellene mer motstandsdyktige mot oksidativt stress (54). Oppreguleringen av *nrf2* i ASK-cellene når de eksponeres for CuSO₄ kan skyldes at cellene prøver å bli motstandsdyktige mot kobbersulfatet ved å øke transkripsjonen av antioksidanter.

Som tidligere nevnt i avsnitt 2.5.2, er *hsp70* en følsom stressmarkør som uttrykkes hele tiden. En økning eller reduksjon i gennuttrykk er vanligvis grunnet temperaturendringer. I vårt stressforsøk utelukkes temperatur som en stressfaktor ved at den behandlede gruppen og kontrollgruppen ble inkubert med samme temperatur på 20°C. På bakgrunn av dette kan vi fastslå at det er kun kobbersulfatet som forårsaker oppreguleringen av *hsp70*. Genet *hsp70* uttrykkes som respons på stress, som betyr at proteinproduktet HSP70 binder seg til proteinsubstratene og stabiliserer dem mot denaturering eller aggregering inntil forholdene blir bedre (55). Det kan være årsaken til resultatene våre viser kraftige oppreguleringer av *hsp70* ved alle tidspunkter i tidsserien opp mot

24 timer, se Figur 8. Siden *hsp70* uttrykkes gjennom hele eksponeringen for CuSO₄, indikerer dette at kobbersulfat er en stressfaktor for ASK-cellene.

Genet *p38* var en potensiell biomarkør for denne analysen fordi den er en av de best studerte MAPK-ene og er blitt funnet å påvirke en rekke cellulære hendelser, som cellevekst og død og celleproliferasjon (56). Det er blitt foreslått at *p38* har anti-apoptiske egenskaper (37), og hjelper til med å koordinere cellulære responser ved nesten alle stressfaktorer (57). *p38* aktiveres blant annet av miljøstressorer, og spiller en viktig rolle i transkripsjonsregulering og inflammatoriske responser (58). På Figur 9 kan man se en gradvis nedregulering av *p38* i ASK-cellene fra 0 til 12 timer. Det kan virke som nedreguleringen øker med tiden cellene er eksponert for CuSO₄. Etter 24 timer er genekspressjonen av *p38* i ASK-celler eksponert for CuSO₄ på samme nivå som kontrollprøvene. De anti-apoptotiske egenskapene til *p38* kan være en forklaring på at nesten alle ASK-cellene var døde etter 24 timer med eksponering for CuSO₄, se Figur 3 og Figur 4. Forklaringen kan være at *p38* sine anti-apoptotiske egenskaper stoppet etterhvert, slik at apoptose hos cellene fikk skje og som førte til en gradvis økning i antall døde celler gjennom tidsserien. De observerte endringene i ekspresjonsnivåer av *p38* kan tyde på at kobbersulfatet har forårsaket stressresponser som kan ha påvirket ASK-cellene sin evne til å håndtere infeksjoner og stress (59). Årsaken til at ekspresjonsnivået av *p38* hos ASK-cellene gikk tilbake til normale forhold etter 24 timer er ukjent.

Resultatene våre viser ulike former for endring i genuttrykk hos de stressrelaterte genene i ASK-cellene. Endringene i ekspresjonsnivåer av mRNA for *cyp1a*, *nrf2*, *hsp70* og *p38* gjør at vi kan konkludere med at en konsentrasjon på 100 mg/L kobbersulfat er en stressfaktor for ASK-cellene. Basert på resultatene fra genekspressjonsanalysen og observasjoner av celleproliferasjonen, kan vi si at den høye konsentrasjonen av kobbersulfat har ført til oksidativt stress.

5.4 Mulige feilkilder

Under studien var det enkelte replikater som ikke fikk Ct-verdi se Vedlegg 11, 13 og 14. Mulige årsaker til dette kan ha vært pipetteringsfeil i den grad av at cDNA-templatet eller primere ikke kom med i RT-qPCR reaksjonsmiksen. Disse prøvene ble ekskludert da det var Ct-verdi av duplikatet. Ved en misforståelse av prosedyren ble det også hos ASK-cellene kun analysert biologiske duplikat, og hver prøve ble dermed ikke RT-qPCR-analysert i duplikat i Aria Mx, slik som hos S6- og D-gruppene. Dette påvirket likevel ikke studien i stor grad, da det fortsatt var nok verdier til å utføre beregninger.

En annen feilkilde var at det ble registrert Ct-verdi på NTC på en av kjøringene. Disse verdiene var såpass høye sammenlignet med brønnene som var tilsatt cDNA se Vedlegg 12 at de tyder på uspesifikk amplifisering fremfor kontaminering, og ble dermed godkjent og var ikke av betydning for resultatet.

Grunnet problemer med RT-qPCR- instrumentet Aria Mx og dets reagenser ble ikke referansegene *efla* analysert for ASK-cellene eksponert for CuSO₄. Dette kan sees i vedlegg 2 hvor det var ingen Ct-verdi hos genen. For denne typen analyser skal det helst være to referansegener og i utgangspunktet var det bestemt at både *actb* og *efla* skulle være referansegener. Det ble underveis i studien besluttet at *efla* ekskluderes fra genekspressjonsanalyse av stressforsøket, og alle målgenene for ASK-celler med og uten kobber ble normalisert med bare *actb* (60).

5.5 Sammenligning av in vivo og in vitro prøver

Dersom vi sammenligner ASK-cellene fra stressforsøket med gjellevevsprøvene fra oppdrettslaks i sjø, kan vi diskutere om kobber kan være en medvirkende årsak til stress hos laks i sjø etter en notspyling. Dette ble gjort ved å se på hvordan de samme genene påvirkes ved eksponering av kobbersulfat *in vitro*. Resultatene våre viser at stressmarkøren *hsp70* ble oppregulert både hos *in vivo* og *in vitro* prøvene. For *in vivo* cellene var det ingen signifikant endring i genuttrykk av målgenene *cyp1a*, *nrf2* og *p38*. Vi kan anta at kobber frigjort fra notspylingen muligens kan være en medvirkende årsak til stress hos oppdrettslaksen, men resultatene våre viser at notspylingen kun har påført signifikant endring i genuttrykk av den følsomme stressmarkøren *hsp70* og ikke noe signifikant endring i genuttrykk hos de andre stressrelaterte genene *cyp1a*, *nrf2* og *p38*. Hos *in vitro* prøvene var det endringer i genuttrykk av alle målgener.

5.6 Videre forskning

For å underbygge resultatene våre er det gunstig å gjennomføre flere studier som bruker andre forutsetninger. Det kan ved ASK-celler også være gunstig å gjennomføre flere delforsøk med mindre, og større mengder CuSO₄. Det burde også være duplikat ved AriaMx og ikke bare biologiske duplikat. I tillegg kan det være interessant å se hvordan celler responderer på en lav konsentrasjon over lengre tid, i forhold til celler som utsettes for en høy konsentrasjon over et kortere tidsintervall. Dette grunnet som tidligere nevnt finnes lite forskning rundt hva kobberkonsentrasjonen er i nøter, og effekten av den kontinuerlige konsentrasjonen fisken utsettes for. I tillegg kan det være interessant å gjennomføre flere uttak av fisken for hver enkelt notspyling i fiskeoppdrett. Dette for å se om responsen er lik ved hver notspyling og om stresset vedvarer, og om de fysiologiske responsene forverres med tiden.

Det kan også ved laboratoriedyrkede ASK-celler være interessant å studere virkningen av CuSO₄ over lenger tidsperioder. Dette da for å se om effekten forsvinner eller vedvarer. Basert på de interessante resultatene av målgenet *p38* anbefales det å gjennomføre flere genekspressjonsanalyser over en lengre tidsserie. I tillegg burde en gjennomføre kontinuerlige hyppige uttak, eksempelvis hver andre time hos ASK-celler og også eventuelt rett etter notspyling og ikke etter flere dager. Det anbefales også å utføre studier på proteinnivå, for å studere sammenheng mellom genuttrykk og proteinmengde.

For videre genekspressjonsanalyser anbefaler vi å bruke *efl α* som et referansegen, da dette genet var meget stabilt (se Figur 11).

6 Konklusjon

For å studere effekten av kobber på atlantisk laks, ble det i denne oppgaven analysert gjellelev *in vivo* fra oppdrettslaks, og kommersielt laboratoriedyrkede ASK-celler *in vitro*.

Hensikten var å se på genuttrykk for de samme stressrelaterte gener, for å kunne diskutere potensielle likheter ved eksponering av CuSO₄ på ASK-celler og notspyling i oppdrettsanlegg. Basert på resultatene fra genekspresjonsanalysen og observasjoner av celleproliferasjon, kan vi si at en kobbersulfatkonsentrasjon på 100mg/L har en stressende effekt på cellene. RT-qPCR-analysene viste at genene *cyp1a*, *nrf2*, *hsp70* og *p38* ga signifikante endringer i genuttrykk ved flere tidspunkter av stressforsøket. Resultater fra stressforsøket tyder på at 100mg/L konsentrasjon av kobbersulfat har ført til oksidativt stress.

For sjøprøvene fikk vi også signifikant endringer i genuttrykk av *hsp70* mellom prøvegruppe S6 og D. Dette indikerer at notspylingen har ført til noe fysiologisk respons hos fisken, men det er usikkert at denne endringen er forårsaket av kobber alene. Det er også usikkert hvordan oppreguleringen av *hsp70* påvirker laksens helse over tid. I tillegg viser resultatene at kobberkonsentrasjonen ved en notspyling ikke er høy nok til at den gir signifikante endringer i uttrykk av de andre stressgenene *cyp1a*, *nrf2* og *p38*. Det er usikkert hvilke følger en så lav konsentrasjon gir på fisken over tid, og ved flere anledninger av notspyling. Samtidig er det ikke kartlagt funksjonene til de aktuelle målgenene hos atlantisk laks, og det anbefales mer forskning rundt dette temaet.

7 Litteraturliste

1. Oslo Ui. Apoptose UiO2022 [Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/apoptose.html>].
2. ATCC. ASK [Atlantic Salmon Kidney] CRL-2747™: ATCC; 2023 [04.05.2023]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-2747>.
3. Oslo Ui. Autofagi 2019 [Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/autofagi.html>].
4. Miljødirektoratet. Fiskeoppdrett- en næring i vekst Miljøstatus: Miljøstatus; 2022 [Available from: <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/hav-og-kyst/fiskeoppdrett/>].
5. Veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten 2021. Vetinst: Veterinærinstituttet; 2022 08.03.2022.
6. Hoddevik B. Kobber fra fiskeoppdrett har trolig negativ miljøeffekt. Havforskningsinstituttet. 2022.
7. Ellen Sofie Grefsrud ØK, Bjørn Olav Kvamme , Kevin Glover , Vivian Husa , Pia Kupka Hansen , Bjørn Einar Grøsvik , Ole Samuelsen , Nina Sandlund , Lars Helge Stien og Terje Svåsand. Risikoreport norsk fiskeoppdrett 2021 - risikovurdering. Havforskningsinstituttet. 2021.
8. Braithwaite VA, Ebbesson LO. Pain and stress responses in farmed fish. *Rev Sci Tech*. 2014;33(1):245-53.
9. IWAMA GK. Stress in Fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;851(1):304-10.
10. Caspers H. A. D. PICKERING (editor): *Stress and Fish*. - 367 pp. London/New York: Academic Press 1981. ISBN 0-12-554550-9. £ 24.60, \$ 59.50. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. 1983;68(2):286-7.
11. Weerd JHv, Komen J. THE EFFECTS OF CHRONIC STRESS ON GROWTH IN FISH : A CRITICAL APPRAISAL. *Comparative Biochemistry and Physiology A-molecular & Integrative Physiology*. 1998;120:107-12.
12. Eissa N, Wang H-P. Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*. 2016;6:1-28.
13. Barton BA, Iwama GK. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1991;1:3-26.
14. Samset Hoem K, Tveten A-K. Current approaches in decoding the molecular mechanisms of long-term stress in adult farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Reviews in Aquaculture*. 2019.
15. Bjørn Einar Grøsvik DBG, Stein Mortensen og Pål Næverlid Sævik. Kunnskapsstøtte om miljøeffekter av kobber. Delrapport 1. Fiskeridirektoratet; 2023 26.01.2023.
16. Tavares-Dias M. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture*. 2021;535:736350.
17. Shamushaki MJMaV-AJ. Effects of Different Levels of Copper Sulfate on Growth and Reproductive Performances in Guppy (*P. reticulata*). *Journal of Aquaculture Research & Development*. 2015;6(2):4.
18. Pfaffl MW. Real-time PCR Dorak T, editor. International University Line.
19. Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 2020;42(3):48-53.
20. Maddocks S, Jenkins R. Chapter 4 - Quantitative PCR: Things to Consider. In: Maddocks S, Jenkins R, editors. *Understanding PCR*. Boston: Academic Press; 2017. p. 45-52.
21. Li K, Brownley A. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2010;630:271-99.
22. S. B. Introduction to RT-qPCR. *Basic Principles of RT-qPCR* [Internet]. 2004. 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>.
23. Laboratories. B-R. SYBR® Green for qPCR. California: Biorad Laboratories [Internet]. 2022. Available from: <https://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>.
24. Wagner EM. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;1027:19-45.

25. Scientific TF. Qubit Fluorometric Quantification Thermo Fischer2023 [Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html?SID=fr-qubit-main>]
26. Qiagen. Commonly used terms in PCR Qiagen 2023 [Available from: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/pcr/commonly-used-terms-in-pcr/commonly-used-terms-in-pcr>]
27. Lumiprobe. ROX reference dye for qPCR: Lumiprobe Life science solutions; [Available from: https://www.lumiprobe.com/p/rox-reference-dye?gclid=Cj0KCOiAraSPBhDuARIsAM3Js4pn237YtfWokJU7DE_E2UMJPHfKuoL5rPx]
28. technologies L. Real-time PCR handbook Life Technologies Corporation 2012. Available from: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
29. Christian Becker IRaMWP. Biomarker Discover via RT-qPCR and Bioinformatical Validation 270.
30. Samset Hoem K, Tveten A-K. Sea transfer and net pen cleaning induce changes in stress-related gene expression in commercial Atlantic salmon (*Salmo salar*) gill tissue. *Aquaculture International*. 2023;1-18.
31. Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 1995;25(3):201-68.
32. C BR, McCormick SD, Vanden Heuvel JP, Li W. Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol*. 2003;62(1):67-78.
33. Rees CB, McCormick SD, Li W. A non-lethal method to estimate CYP1A expression in laboratory and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005;141(3):217-24.
34. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(6):670-84.
35. Moreira-de-Sousa C, de Souza RB, Fontanetti CS. HSP70 as a Biomarker: an Excellent Tool in Environmental Contamination Analysis—a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2018;229(8):264.
36. Gong X, Luo T, Deng P, Liu Z, Xiu J, Shi H, et al. Stress-induced interaction between p38 MAPK and HSP70. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(2):357-62.
37. Hoem KS, Tveten A-K. Sea transfer and net pen cleaning induce changes in stress-related gene expression in commercial Atlantic salmon (*Salmo salar*) gill tissue. *Aquaculture International*. 2023.
38. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-17.
39. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
40. Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Ståhlberg A, Kubista M. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(10):1816-23.
41. Zhang X, Ding L, Sandford AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 2005;6(1):4.
42. Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE. What are housekeeping genes? *PLoS Comput Biol*. 2022;18(7):e1010295.
43. Ingerslev H-C, Pettersen EF, Jakobsen RA, Petersen CB, Wergeland HI. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*. 2006;43(8):1194-201.
44. Dharmaratnam A, Sudhagar A, Nithianantham SR, Das S, Swaminathan TR. Evaluation of candidate reference genes for quantitative RTqPCR analysis in goldfish (*Carassius auratus* L.) in healthy and CyHV-2 infected fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2021;237:110270.
45. Olsvik PA, Lie KK, Jordal A-EO, Nilsen TO, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*. 2005;6(1):21.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
47. Scientific TF. Leibovitz's L-15 Medium 2023 [Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11415064?ef_id=EAAlaIQobChMIItvX9t87b_gIVX0KRBR2EsgYfEAAYASAAEgIxWfD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!592040163246!!!g!!!382790548!127]

[140246227&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&s_kwcid=AL!3652!3!592040163246!!!g!!&clid=EA!aIQobChMItvX9t87b_gIVX0KRBR2EsgYfEAAYASAAEgIxWfD_BwE.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853)

48. Choudhary R. Application of “independent t-test” by using SPSS for conducting physical education researches. *Hypothesis*. 2018;20(92):99.
49. Eissa N, Wang H-P. Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*. 2016;8(1):61-88.
50. Østevik L, Stormoen M, Nødtvedt A, Alarcón M, Lie K-I, Skagøy A, et al. Assessment of acute effects of in situ net cleaning on gill health of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture*. 2021;545:737203.
51. Goksøyr A, editor Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Toxicology in Transition*; 1995 1995//; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
52. Olsvik PA, Kristensen T, Waagbø R, Tollefsen KE, Rosseland BO, Toften H. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol*. 2006;209(Pt 15):2893-901.
53. Morel Y, Barouki R. Down-regulation of Cytochrome P450 1A1 Gene Promoter by Oxidative Stress: CRITICAL CONTRIBUTION OF NUCLEAR FACTOR 1 *. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26969-76.
54. Li R, Jia Z, Zhu H. Regulation of Nrf2 Signaling. *React Oxyg Species (Apex)*. 2019;8(24):312-22.
55. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem*. 2010;53(12):4585-602.
56. Zhao YW, Pan YQ, Tang MM, Lin WJ. Blocking p38 Signaling Reduces the Activation of Pro-inflammatory Cytokines and the Phosphorylation of p38 in the Habenula and Reverses Depressive-Like Behaviors Induced by Neuroinflammation. *Front Pharmacol*. 2018;9:511.
57. Han J, Wu J, Silke J. An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling. *F1000Res*. 2020;9.
58. Hansen TE, Jørgensen JB. Cloning and characterisation of p38 MAP kinase from Atlantic salmon: A kinase important for regulating salmon TNF-2 and IL-1 β expression. *Molecular Immunology*. 2007;44(12):3137-46.
59. Holen E, Winterthun S, Du ZY, Krøvel AV. Inhibition of p38 MAPK during cellular activation modulate gene expression of head kidney leukocytes isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soy bean oil or fish oil based diets. *Fish & Shellfish Immunology*. 2011;30(1):397-405.
60. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLOS ONE*. 2015;10(11):e0141853.

8 Vedlegg

Vedlegg 1 – Resultater for D- og S6-prøvene

Tabell 4.1 viser at referansegenene *actb* og *efl α* hadde noe lavere genekspresjon og Ct-verdier enn målgenene. For D-gruppen er det ingen standardavvik større enn 0,5. Smeltepunktstemperaturene var stabile gjennom analysen for alle genene.

Tabell 4.1 viser gjennomsnittlige Ct- Tm og DCt-verdier for målgenener med tilhørende standardavvik for prøvegruppe S6. Tabellen viser også gjennomsnittlig Ct-verdi og tilhørende standardavvik for referansegenene.

| D-gruppen | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| Gen | Gjennomsnitt Ct-verdi | SD Ct-verdi | Gjennomsnitt Tm-verdi | SD Tm-verdi | Gjennomsnitt Δ Ct-verdi |
| <i>cyp1a</i> | 22,40 | 0,14 | 79,00 | 0,00 | 4,13 |
| <i>hsp70</i> | 26,13 | 0,19 | 77,50 | 0,00 | 7,86 |
| <i>nrf2</i> | 23,49 | 0,09 | 78,46 | 0,14 | 5,22 |
| <i>p38</i> | 25,25 | 0,08 | 77,15 | 0,28 | 6,98 |
| <i>actb</i> | 17,10 | 0,09 | 79,52 | 0,24 | |
| <i>eflα</i> | 19,45 | 0,18 | 77,00 | 0,15 | |

Tabell 4.2 viser gjennomsnittlig Ct- og Tm-verdier for målgenene og referansegenene, samt Δ Ct-verdier for målgenene. Den gir en oversikt over genekspresjon av S6-gruppen, samt standardavvik for Ct- og Tm-verdier. Gjennomsnittlig Ct-verdi for referansegenene *actb* og *efl α* er lavere enn for målgenene. Alle genene hadde gjennomsnittlig stabile smeltepunktstemperaturer.

Tabell 4.2 viser gjennomsnittlige Ct-, Tm- og DCt-verdier for målgenene med tilhørende standardavvik for prøvegruppe S6. Tabellen viser også gjennomsnittlig Ct-, og Tm-verdier med tilhørende standardavvik for referansegenene.

| S6-gruppen | | | | | |
|--------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| Gen | Gjennomsnitt Ct-verdi | SD Ct-verdi | Gjennomsnitt Tm-verdi | SD Tm-verdi | Gjennomsnitt Δ Ct-verdi |
| <i>cyp1a</i> | 25,06 | 0,14 | 78,79 | 0,33 | 3,99 |
| <i>hsp70</i> | 25,87 | 0,13 | 78,34 | 0,25 | 5,52 |

| | | | | | |
|---------------------|-------|------|-------|------|------|
| nrf2 | 25,41 | 0,06 | 78,50 | 0,00 | 4,34 |
| p38 | 26,78 | 0,07 | 77,14 | 0,23 | 5,71 |
| actb | 20,54 | 0,12 | 78,00 | 0,30 | |
| <i>efl</i> α | 21,59 | 0,08 | 77,39 | 0,85 | |

Vedlegg 2 – Resultater for ASK-celler uten kobbersulfat

Tabell 9 viser gjennomsnittlige Ct-, Tm- og delta-Ct-verdier med tilhørende standardavvik for ASK-celleprøver uten kobbersulfat. Beregninger ble gjort i Microsoft excel versjon 16, og Δ Ct-verdiene ble brukt videre til å for å beregne $-\Delta\Delta$ Ct-verdier for å lage visuell framstilling av relativ genekspressjon.

| Tidsintervall | Gen | Gjennomsnitt Ct-verdi | SD Ct-verdi | Gjennomsnitt Tm-verdi | SD Tm-verdi | Gjennomsnitt delta Δ Ct-verdi |
|-----------------|-------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------------|
| T ₀ | cyp1a | 24,86 | 31,48 | 79,5 | 0,00 | 24,86 |
| T ₂ | cyp1a | 24,37 | 0,04 | 79 | 0,00 | 24,37 |
| T ₄ | cyp1a | 23,71 | 0,11 | 79 | 0,00 | 23,71 |
| T ₆ | cyp1a | 23,18 | 0,07 | 79,5 | 0,00 | 23,18 |
| T ₈ | cyp1a | 22,78 | 0,13 | 79 | 0,00 | 22,78 |
| T ₁₂ | cyp1a | 23,24 | 0,17 | 79 | 0,00 | 23,24 |
| T ₂₄ | cyp1a | 24,31 | 0,02 | 79,25 | 0,35 | 24,31 |
| T ₀ | hsp70 | 23,11 | 0,08 | 23,76 | 1,44 | 23,11 |
| T ₂ | hsp70 | 23,98 | 0,12 | 77 | 0,00 | 23,98 |
| T ₄ | hsp70 | 24,84 | 0,10 | 77 | 0,00 | 24,84 |
| T ₆ | hsp70 | 22,75 | 0,10 | 77 | 0,00 | 22,75 |
| T ₈ | hsp70 | 24,43 | 0,01 | 77 | 0,00 | 24,43 |
| T ₁₂ | hsp70 | 21,46 | 0,01 | 77 | 0,00 | 21,46 |
| T ₂₄ | hsp70 | 24,97 | 0,33 | 77 | 0,00 | 24,97 |
| T ₀ | nrf2 | 26,06 | 0,23 | 78,5 | 0,00 | 26,06 |
| T ₂ | nrf2 | 26,70 | 0,14 | 78,5 | 0,00 | 26,70 |
| T ₄ | nrf2 | 26,62 | 0,35 | 78,25 | 0,35 | 26,62 |
| T ₆ | nrf2 | 26,42 | 0,17 | 78,5 | 0,00 | 26,42 |
| T ₈ | nrf2 | 26,36 | 0,11 | 78,5 | 0,00 | 26,36 |
| T ₁₂ | nrf2 | 26,44 | 0,06 | 78,5 | 0,00 | 26,44 |
| T ₂₄ | nrf2 | 26,46 | 0,02 | 78,5 | 0,00 | 26,46 |
| T ₀ | p38 | 27,09 | 0,15 | 77,375 | 0,25 | 27,09 |
| T ₂ | p38 | 27,39 | 0,06 | 77 | 0,00 | 27,39 |
| T ₄ | p38 | 27,79 | 0,19 | 77 | 0,00 | 27,79 |
| T ₆ | p38 | 27,78 | 0,07 | 77 | 0,00 | 27,78 |
| T ₈ | p38 | 27,33 | 0,18 | 77 | 0,00 | 27,33 |
| T ₁₂ | p38 | 27,73 | 0,06 | 77 | 0,00 | 27,73 |

| | | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|-------|------|--------|-------|-------|
| T ₂₄ | p38 | 27,64 | 0,05 | 77 | 0,00 | 27,64 |
| T ₀ | actb | 17,84 | 0,21 | 79,5 | 0,00 | 17,84 |
| T ₂ | actb | 17,94 | 0,04 | 79,25 | 0,35 | 17,94 |
| T ₄ | actb | 18,30 | 0,00 | 79,25 | 0,35 | 18,30 |
| T ₆ | actb | 18,58 | 0,13 | 79,5 | 0,00 | 18,58 |
| T ₈ | actb | 17,96 | 0,01 | 79,5 | 0,00 | 17,96 |
| T ₁₂ | actb | 18,47 | 0,11 | 79,5 | 0,00 | 18,47 |
| T ₂₄ | actb | 18,83 | 0,50 | 79,25 | 0,35 | 18,83 |
| T ₀ | <i>eflα</i> | 22,79 | 0,00 | 81,875 | 8,95 | 0,00 |
| T ₂ | <i>eflα</i> | No Ct | | 84 | 15,56 | |
| T ₄ | <i>eflα</i> | No Ct | | 79,25 | 0,35 | |
| T ₆ | <i>eflα</i> | No Ct | | 79,75 | 0,35 | |
| T ₈ | <i>eflα</i> | No Ct | | 75,25 | 6,01 | |
| T ₁₂ | <i>eflα</i> | No Ct | | 79 | 0,71 | |
| T ₂₄ | <i>eflα</i> | No Ct | | 79 | 0,71 | |

Vedlegg 3 – Resultater for ASK-celler med kobbersulfat

Tabell 10 viser gjennomsnittlige Ct-, Tm- og delta-Ct-verdier med tilhørende standardavvik for ASK-celleprøver med kobbersulfat.

Beregninger ble gjort i Microsoft excel versjon 16, og Δ Ct-verdiene ble brukt videre til å for å beregne $-\Delta\Delta$ Ct-verdier for å lage visuell framstilling av relativ genekspressjon.

| Tidsintervall | Gen | Gjennomsnitt Ct-verdi | SD Ct-verdi | Gjennomsnitt Tm-verdi | SD Tm-verdi | Gjennomsnitt delta Δ Ct-verdi |
|-----------------|-------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------------|
| T ₂ | cyp1a | 26,50 | 0,21 | 79,00 | 0,00 | 26,50 |
| T ₄ | cyp1a | 27,12 | 0,09 | 79,00 | 0,00 | 27,12 |
| T ₆ | cyp1a | 25,58 | 0,92 | 79,00 | 0,00 | 25,58 |
| T ₈ | cyp1a | 24,78 | 0,13 | 79,00 | 0,00 | 24,78 |
| T ₁₂ | cyp1a | 27,16 | 0,08 | 79,00 | 0,00 | 27,16 |
| T ₂₄ | cyp1a | 25,70 | 0,11 | 79,00 | 0,00 | 25,70 |
| T ₂ | hsp70 | 16,87 | 0,19 | 77,50 | 0,00 | 16,87 |
| T ₄ | hsp70 | 16,78 | 0,04 | 77,50 | 0,00 | 16,78 |
| T ₆ | hsp70 | 18,29 | 0,83 | 77,50 | 0,00 | 18,29 |
| T ₈ | hsp70 | 18,57 | 0,71 | 78,00 | 0,00 | 18,57 |
| T ₁₂ | hsp70 | 17,41 | 0,02 | 77,50 | 0,71 | 17,41 |
| T ₂₄ | hsp70 | 19,29 | 0,06 | 77,50 | 0,00 | 19,29 |
| T ₂ | nrf2 | 26,32 | 0,21 | 78,50 | 0,00 | 26,32 |
| T ₄ | nrf2 | 25,62 | 0,49 | 78,50 | 0,00 | 25,62 |
| T ₆ | nrf2 | 25,15 | 0,19 | 78,50 | 0,00 | 25,15 |
| T ₈ | nrf2 | 25,05 | 0,09 | 78,50 | 0,00 | 25,05 |
| T ₁₂ | nrf2 | 25,17 | 0,05 | 78,50 | 0,00 | 25,17 |
| T ₂₄ | nrf2 | 25,68 | 0,10 | 78,50 | 0,00 | 25,68 |
| T ₂ | p38 | 27,87 | 0,13 | 77,00 | 0,00 | 27,87 |
| T ₄ | p38 | 28,44 | 0,06 | 77,25 | 0,35 | 28,44 |
| T ₆ | p38 | 28,71 | 0,20 | 77,00 | 0,00 | 28,71 |
| T ₈ | p38 | 28,64 | 0,08 | 77,00 | 0,00 | 28,64 |
| T ₁₂ | p38 | 29,85 | 0,01 | 77,00 | 0,35 | 29,85 |
| T ₂₄ | p38 | 28,39 | 0,21 | 77,25 | 0,35 | 28,39 |
| T ₂ | actb | 18,22 | 18,22 | 79,25 | 0,00 | 18,22 |
| T ₄ | actb | 18,65 | 0,14 | 79,50 | 0,00 | 18,65 |
| T ₆ | actb | 18,51 | 0,24 | 79,50 | 0,00 | 18,51 |

| | | | | | | |
|-----------------|-------------|-------|------|-------|------|-------|
| T ₈ | actb | 19,00 | 0,09 | 79,50 | 0,00 | 17,95 |
| T ₁₂ | actb | 19,16 | 0,24 | 79,50 | 0,00 | 19,00 |
| T ₂₄ | actb | 22,77 | 0,18 | 79,50 | 0,00 | 19,16 |
| T ₂ | <i>eflα</i> | 22,77 | 0,06 | 77,00 | 0,00 | 22,77 |
| T ₄ | <i>eflα</i> | 22,77 | 0,16 | 77,00 | 0,35 | 22,77 |
| T ₆ | <i>eflα</i> | 22,59 | 0,03 | 76,75 | 0,00 | 22,59 |
| T ₈ | <i>eflα</i> | 22,61 | 0,50 | 77,00 | 0,00 | 22,61 |
| T ₁₂ | <i>eflα</i> | 22,77 | 0,11 | 77,00 | 0,00 | 22,77 |
| T ₂₄ | <i>eflα</i> | 22,97 | 0,10 | 77,00 | 0,00 | 22,97 |

Harvest cells to prepare for RNA isolation

KSH 001

1. Background

Animal cells are grown under different experimental conditions and are then harvested (at distinct timepoints) for RNA isolation and subsequent analyses.

2. Materials and equipment

Falcon tubes (15 ml, 50 ml)

Rack for tubes

Trypsin-EDTA (0.25%)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

Cell medium (NB: dependent on cell type)

Sterile graded pipettes (5, 10, or 25 ml, depending on cell flask size)

Pipette pistol

Permanent marker

Eppendorf tubes (C420)

RLT buffer (from RNeasy mini kit, C420)

DTT (2 M, C420 freezer)

Eppendorf tube rack (C420)

Pipette (100-1000 µl, C420)

Pipette tips (100-1000 µl, C420)

Centrifuge (3rd floor)

(-80°C freezer (3rd floor))

3. Work description

In K-lab: Prepare Eppendorf tubes and RLT+DTT(10%) by adding 20 µl og 2M DTT per 1 ml RLT buffer.

In cell lab: Work aseptic in LAF-bench. Sterilize LAF-bench and prepare workspace with the necessary materials.

1. Move cell flask(s) from incubator into LAF-bench.
2. Remove cell medium.
3. Wash cells carefully with PBS.
4. Add trypsin-EDTA (0.25%). Incubate in room temperature for a few minutes, check in microscope to confirm dissociation of cells from flask.
5. Add a few ml medium to “wash down” all cells, and then move all cells in trypsin+medium into a falcon tube.
6. Centrifuge cells at 1300 rpm, 5 min.
7. Remove medium, discard.

Move into K-lab for remaining steps.

8. Add 350 μ l RLT+DTT(10%), pipet a few times up and down, and move contents to pre-labeled Eppendorf tubes.
9. Place tubes in -80°C freezer for later use, or proceed directly to isolation of RNA using RNeasy mini kit.
10. Clean up all work spaces after use (cell lab and C420).

Vedlegg 5 – Prosedyre for lysis av cellene

START:

(cells harvested according to procedure KSH 001)

2. Disrupt the cells by adding Buffer RLT + DTT (10%).

For pelleted cells, loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 5). Vortex or pipet to mix, and proceed to step 3.

Note: Incomplete loosening of the cell pellet may lead to inefficient lysis and reduced RNA yields.

Table 5. Volumes of Buffer RLT for lysing pelleted cells

| Number of pelleted cells | Volume of Buffer RLT (μ l) |
|---------------------------------|---------------------------------|
| $<5 \times 10^6$ | 350 |
| $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ | 600 |

For direct lysis of cells grown in a monolayer, add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 6) to the cell-culture dish. Collect the lysate with a rubber policeman. Pipet the lysate into a microcentrifuge tube (not supplied). Vortex or pipet to mix, and ensure that no cell clumps are visible before proceeding to step 3.

Table 6. Volumes of Buffer RLT for direct cell lysis

| Dish diameter (cm) | Volume of Buffer RLT (μ l)* |
|--------------------|----------------------------------|
| <6 | 350 |
| 6–10 | 600 |

* Regardless of the cell number, use the buffer volumes indicated to completely cover the surface of the dish.

3. Homogenize the lysate according to step 3a, 3b, or 3c.

See "Disrupting and homogenizing starting material", page 22, for more details on homogenization. If processing $\leq 1 \times 10^5$ cells, homogenize by vortexing for 1 min. After homogenization, proceed to step 4.

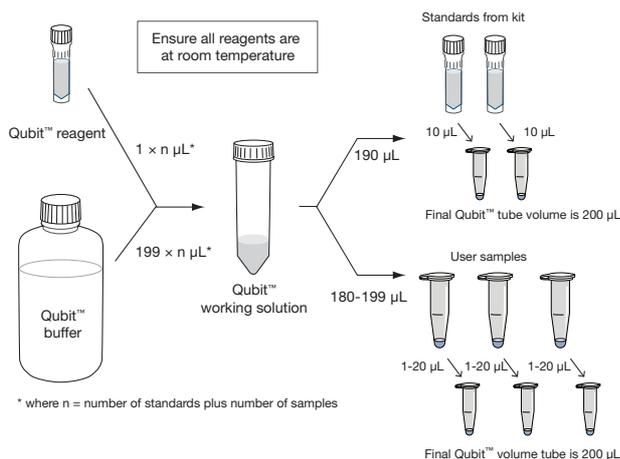
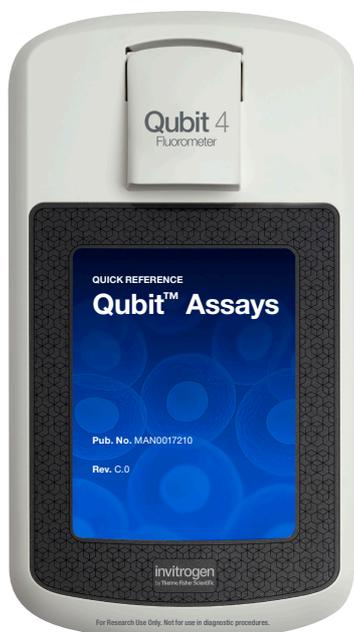
Optional:
Place in
 -80°C
or proceed
directly
to RNA
isolation
(step 3a)

Vedlegg 6 – Prosedyre for bruk av Qubit

invitrogen

QUICK REFERENCE

Qubit™ Assays



General Qubit Assay Protocol

1. Set up two assay tubes for the standards (three for the protein or RNA IQ assay) and one assay tube for each sample.
2. Prepare the Qubit™ working solution by diluting the Qubit™ reagent 1:200 in Qubit™ buffer. Prepare 200 µL of working solution for each standard and sample.[†]
3. Prepare the assay tubes* according to the table below.
4. Vortex all tubes for 2–3 seconds.
5. Incubate the tubes for 2 minutes at room temperature (15 minutes for the Qubit™ protein assay).
6. Insert the tubes in the Qubit™ Fluorometer and take readings. For detailed instructions, refer to the Qubit™ Fluorometer manual.

| | Standard assay tubes | User sample assay tubes |
|---|----------------------|-------------------------|
| Working solution [†] (from step 2) | 190 µL | 180–199 µL |
| Standard (from kit) | 10 µL | — |
| User sample | — | 1–20 µL |
| Total Volume in each assay tube | 200 µL | 200 µL |

[†] Qubit 1X dsDNA assays (Cat. Nos. Q33230, Q33231, Q33265, Q33266) are supplied with a ready-to-use working solution, and do not require preparation.

* Use only thin-wall, clear 0.5 mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit™ assay tubes (set of 500, Cat. No. Q32856).

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Vedlegg 7 – Prosedyre for cDNA-syntese



qScript® cDNA Synthesis Kit

| | | | | | |
|----------|-------------------------------------|-------|--|----------|----------------|
| Cat. No. | 95047-025 95047-100 95047-500 | Size: | 25 x 20- μ L reactions 100 x 20- μ L reactions 500 x 20- μ L 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 \leq 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 μ L | 1 x 400 μ L | 2 x 1 mL |
| qScript Reverse Transcriptase, 20X concentration | 1 x 25 μ L | 1 x 100 μ L | 1 x 500 μ L |
| 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

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

| | | |
|---|-----------|--------------|
| RNA (1 μ g to 10 μ g total RNA) | -variable | 10 μ L |
| Nuclease-free water | -variable | 5 μ L |
| qScript Reaction Mix (5X) | | 4.0 μ L |
| qScript RT | | 1.0 μ L |
| final volume | | 20.0 μ L |

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 μ L | 250 μ L | 1000 μ L |
| qScript Reaction Mix (5X) | 4 μ L | 100 μ L | 400 μ L |
| qScript RT | 1 μ L | 25 μ L | 100 μ L |
| total volume | 15 μ L | 375 μ L | 1500 μ L |

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

3. Vortex gently, and then centrifuge 10s to collect contents.
4. 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
5. Initiate run.
6. After completion of cDNA synthesis, use 1/5th to 1/10th of the first-strand reaction (2-4 μ L) 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.

Vedlegg 8 – Prosedyre for qPCR

PROSEDYRE:

qPCR

KSH 004

1 Background

cDNA has been prepped from RNA (according to protocol for qScript cDNA synthesis kit from Quantabio), and its concentration has been measured by Qubit 4.0 (according to Qubit manual). Calculate how to accordingly dilute cDNA to a concentration of 400 pg/7,34 µl H₂O and prepare diluted cDNA in Eppendorf tubes ready for qPCR, let sit on ice. Primers have been diluted to stocks of 500 nM. (A 100 µl stock of 500 nM can be made by adding 7.5 µl from a 100 µM stock to 92.5 µl autoclaved H₂O.) All work takes place in the K-lab.

2 Materials and equipment

Ice

Forward primers (stock of 500 nM)

Reverse primers (stock of 500 nM)

SYBR Green Low Rox

cDNA (diluted to a concentration of 400 pg/7,34 µl H₂O)

DNase/RNase free H₂O or autoclaved H₂O

Rack for Eppendorf tubes

Eppendorf tubes

Pipettes and pipette tips (0-1000 µl)

Multichannel pipette (0-10 µl)

Permanent marker

96 well plate for qPCR and a rack/plate to hold it in place during pipetting

Plate sealing/adhesive film

Adhesive film rubber applicator

Vortex mixer

Table centrifuge

Plate centrifuge

AriaMX instrument and software

3 Work description

Keep cDNA, primers and SYBR green on ice after thawing. All pre-PCR work must be performed in “clean zone”. NB: cDNA must be added in the final step, in the “unclean zone”.

Each qPCR reaction/well must contain the following:

- 10 µl SYBR Green Low Rox
- 1,33 µl primer Forward (fra 500 nM stock)
- 1,33 µl primer Reverse (fra 500 nM stock)
- 7,34 µl H₂O+cDNA (400 pg cDNA per 7,34 µl)

= Totalt 20 µl per reaction

Depending on plate layout, use pipette or multichannel pipette to pipette primers and SYBR green (mixed or separately) to the respective wells in the 96 plate (it is useful to draw a template before starting). Remember that all samples should be in duplicates and to include no template controls (NTCs) without cDNA to verify that primers, SYBR green and water are not contaminated by DNA.

cDNA is added in the final step, 7.34 µl to each well.

Seal the plate with film and use rubber applicator to ensure that the film is sufficiently adhered around the edges. Vortex plate to mix well, and spin down in plate centrifuge. Ensure that there are no bubbles in any wells, if there is, flick the wells to remove bubbles and spin again in plate centrifuge.

Let plate sit on ice while setting up the run in AriaMX in PC:

Control “Instrument explorer” to see that instrument AriaMX is connected. Then:

1. Choose “Quantitative PCR”
2. For all wells, select FAM→SYBR. Reference dye = ROX
3. Create the following 3-step cycling profile:

3 min 95°C

15 s 95°C



20s 58°C 38 cycles

30s 72°C

4. Remember to check that magnifying glass is active/blue at 72°C.
5. Melt curve profile does not need to be changed.
6. Select NTCs for the respective NTC wells, blank for the empty wells, and give names to the other wells (unknown).
7. Run → Send configuration.
8. Save: Give name of run. NB: do not use $\text{Æ}\text{Ø}\text{Å}$ in name.
9. NB! Remember to insert plate into instrument if you have not done it yet.

In AriaMX:

10. Click on arrow-symbol from PC to retrieve configuration. Double check that everything is OK. “Run experiment” on Aria. Run will take approximately 2h.

In the meantime: clean the workplace in the lab, or start new round of measuring cDNA and prepping for new round of qPCR. After finished run: Export results to excel and retrieve with a memory USB stick.

Vedlegg 9 – RT-qPCR resultater for prøve 1-6 i D-gruppen

| Well | Well Type | Well Name | Dye | Cq (ΔR_n) | Tm Product 1 (-Rn'(T)) |
|------|-----------|-----------|------|---------------------|------------------------|
| A1 | Unknown | CYP1A 1 | SYBR | 23,57 | 79 |
| A2 | Unknown | CYP1A 1 | SYBR | 23,75 | 79 |
| A3 | Unknown | CYP1A 2 | SYBR | 23,33 | 79 |
| A4 | Unknown | CYP1A 2 | SYBR | 23,52 | 79 |
| A5 | Unknown | CYP1A 3 | SYBR | 24,02 | 79 |
| A6 | Unknown | CYP1A 3 | SYBR | 24,07 | 79 |
| A7 | Unknown | CYP1A 4 | SYBR | 23,59 | 79 |
| A8 | Unknown | CYP1A 4 | SYBR | 23,59 | 79 |
| A9 | Unknown | CYP1A 5 | SYBR | 24,07 | 79 |
| A10 | Unknown | CYP1A 5 | SYBR | 24,04 | 79 |
| A11 | Unknown | CYP1A 6 | SYBR | 23,31 | 79 |
| A12 | Unknown | CYP1A 6 | SYBR | 23,35 | 79 |
| B1 | Unknown | HSP70 1 | SYBR | 26,61 | 77,5 |
| B2 | Unknown | HSP70 1 | SYBR | 26,65 | 77,5 |
| B3 | Unknown | HSP70 2 | SYBR | 26,33 | 77,5 |
| B4 | Unknown | HSP70 2 | SYBR | 26,46 | 77,5 |
| B5 | Unknown | HSP70 3 | SYBR | 27,95 | 77,5 |
| B6 | Unknown | HSP70 3 | SYBR | 27,96 | 77,5 |
| B7 | Unknown | HSP70 4 | SYBR | 27,69 | 77,5 |
| B8 | Unknown | HSP70 4 | SYBR | 27,73 | 77,5 |
| B9 | Unknown | HSP70 5 | SYBR | 27,47 | 77,5 |
| B10 | Unknown | HSP70 5 | SYBR | 27,41 | 77,5 |
| B11 | Unknown | HSP70 6 | SYBR | 27,2 | 77,5 |
| B12 | Unknown | HSP70 6 | SYBR | 27,2 | 77,5 |
| C1 | Unknown | NRF2 1 | SYBR | 24,95 | 78,5 |
| C2 | Unknown | NRF2 1 | SYBR | 24,86 | 78,5 |
| C3 | Unknown | NRF2 2 | SYBR | 24,59 | 78,5 |
| C4 | Unknown | NRF2 2 | SYBR | 24,62 | 78,5 |
| C5 | Unknown | NRF2 3 | SYBR | 24,62 | 78,5 |
| C6 | Unknown | NRF2 3 | SYBR | 24,68 | 78,5 |
| C7 | Unknown | NRF2 4 | SYBR | 24,47 | 78,5 |
| C8 | Unknown | NRF2 4 | SYBR | 24,59 | 78,5 |

| | | | | | |
|-----|---------|--------|------|-------|------|
| C9 | Unknown | NRF2 5 | SYBR | 24,55 | 78 |
| C10 | Unknown | NRF2 5 | SYBR | 24,7 | 78,5 |
| C11 | Unknown | NRF2 6 | SYBR | 24,4 | 78,5 |
| C12 | Unknown | NRF2 6 | SYBR | 24,43 | 78,5 |
| D1 | Unknown | P38 1 | SYBR | 26,25 | 77,5 |
| D2 | Unknown | P38 1 | SYBR | 26,25 | 77 |
| D3 | Unknown | P38 2 | SYBR | 25,92 | 77 |
| D4 | Unknown | P38 2 | SYBR | 26,06 | 77 |
| D5 | Unknown | P38 3 | SYBR | 26,48 | 77,5 |
| D6 | Unknown | P38 3 | SYBR | 26,57 | 77 |
| D7 | Unknown | P38 4 | SYBR | 26,29 | 77 |
| D8 | Unknown | P38 4 | SYBR | 26,3 | 77 |
| D9 | Unknown | P38 5 | SYBR | 26,57 | 77 |
| D10 | Unknown | P38 5 | SYBR | 26,51 | 77 |
| D11 | Unknown | P38 6 | SYBR | 25,82 | 77 |
| D12 | Unknown | P38 6 | SYBR | 25,91 | 77 |
| E1 | Unknown | ACTB 1 | SYBR | 18,14 | 79,5 |
| E2 | Unknown | ACTB 1 | SYBR | 18,1 | 79,5 |
| E3 | Unknown | ACTB 2 | SYBR | 17,7 | 79,5 |
| E4 | Unknown | ACTB 2 | SYBR | 17,71 | 79,5 |
| E5 | Unknown | ACTB 3 | SYBR | 18,65 | 79,5 |
| E6 | Unknown | ACTB 3 | SYBR | 18,78 | 79,5 |
| E7 | Unknown | ACTB 4 | SYBR | 18,31 | 79,5 |
| E8 | Unknown | ACTB 4 | SYBR | 18,38 | 79,5 |
| E9 | Unknown | ACTB 5 | SYBR | 18,56 | 79,5 |
| E10 | Unknown | ACTB 5 | SYBR | 18,65 | 79,5 |
| E11 | Unknown | ACTB 6 | SYBR | 17,72 | 79,5 |
| E12 | Unknown | ACTB 6 | SYBR | 17,79 | 79,5 |
| F1 | Unknown | EF1A 1 | SYBR | 20,71 | 77 |
| F2 | Unknown | EF1A 1 | SYBR | 20,75 | 77 |
| F3 | Unknown | EF1A 2 | SYBR | 20,34 | 77 |
| F4 | Unknown | EF1A 2 | SYBR | 20,42 | 77 |
| F5 | Unknown | EF1A 3 | SYBR | 20,9 | 77 |
| F6 | Unknown | EF1A 3 | SYBR | 21,1 | 77 |
| F7 | Unknown | EF1A 4 | SYBR | 20,66 | 77 |

| | | | | | |
|-----|---------|--------|------|-------|------|
| F8 | Unknown | EF1A 4 | SYBR | 20,6 | 77 |
| F9 | Unknown | EF1A 5 | SYBR | 20,82 | 77 |
| F10 | Unknown | EF1A 5 | SYBR | 21,01 | 77 |
| F11 | Unknown | EF1A 6 | SYBR | 20,05 | 77 |
| F12 | Unknown | EF1A 6 | SYBR | 20,09 | 77 |
| G1 | NTC | CYP1A | SYBR | 34,55 | 72 |
| G2 | NTC | HSP70 | SYBR | No Cq | 95 |
| G3 | NTC | NRF2 | SYBR | No Cq | 77 |
| G4 | NTC | P38 | SYBR | No Cq | 77,5 |
| G5 | NTC | ACTB | SYBR | No Cq | 77 |
| G6 | NTC | EF1A | SYBR | No Cq | 76,5 |

Vedlegg 10 – RT-qPCR resultater for prøve 7-12 i D-gruppen

| Well | Well Type | Well Name | Dye | Cq (ΔR_n) | Tm Product 1 (-Rn'(T)) |
|------|-----------|-----------|------|---------------------|------------------------|
| A1 | Unknown | CYP1A 7 | SYBR | 19,87 | 79 |
| A2 | Unknown | CYP1A 7 | SYBR | 20,12 | 79 |
| A3 | Unknown | CYP1A 8 | SYBR | 22,41 | 79 |
| A4 | Unknown | CYP1A 8 | SYBR | 23,6 | 79 |
| A5 | Unknown | CYP1A 9 | SYBR | 21,16 | 79 |
| A6 | Unknown | CYP1A 9 | SYBR | 21,19 | 79 |
| A7 | Unknown | CYP1A 10 | SYBR | 21,21 | 79 |
| A8 | Unknown | CYP1A 10 | SYBR | 21,19 | 79 |
| A9 | Unknown | CYP1A 11 | SYBR | 20,68 | 79 |
| A10 | Unknown | CYP1A 11 | SYBR | 20,8 | 79 |
| A11 | Unknown | CYP1A 12 | SYBR | 20,51 | 79 |
| A12 | Unknown | CYP1A 12 | SYBR | 20,74 | 79 |
| B1 | Unknown | HSP70 7 | SYBR | 23,88 | 77,5 |
| B2 | Unknown | HSP70 7 | SYBR | 25,13 | 77,5 |
| B3 | Unknown | HSP70 8 | SYBR | 26,85 | 77,5 |
| B4 | Unknown | HSP70 8 | SYBR | 28,24 | 77,5 |
| B5 | Unknown | HSP70 9 | SYBR | 24,73 | 77,5 |
| B6 | Unknown | HSP70 9 | SYBR | 24,74 | 77,5 |
| B7 | Unknown | HSP70 10 | SYBR | 24,67 | 77,5 |
| B8 | Unknown | HSP70 10 | SYBR | 24,67 | 77,5 |
| B9 | Unknown | HSP70 11 | SYBR | 24,82 | 77,5 |
| B10 | Unknown | HSP70 11 | SYBR | 24,68 | 77,5 |
| B11 | Unknown | HSP70 12 | SYBR | 24,1 | 77,5 |
| B12 | Unknown | HSP70 12 | SYBR | 23,91 | 77,5 |
| C1 | Unknown | NRF2 7 | SYBR | 22,68 | 78,5 |
| C2 | Unknown | NRF2 7 | SYBR | 23,24 | 78,5 |
| C3 | Unknown | NRF2 8 | SYBR | 24,74 | 78,5 |
| C4 | Unknown | NRF2 8 | SYBR | 24,73 | 78,5 |
| C5 | Unknown | NRF2 9 | SYBR | 21,77 | 78,5 |
| C6 | Unknown | NRF2 9 | SYBR | 21,81 | 78,5 |
| C7 | Unknown | NRF2 10 | SYBR | 21,5 | 78,5 |
| C8 | Unknown | NRF2 10 | SYBR | 21,59 | 78,5 |

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|-------|------|
| C9 | Unknown | NRF2 11 | SYBR | 21,66 | 78 |
| C10 | Unknown | NRF2 11 | SYBR | 21,82 | 78,5 |
| C11 | Unknown | NRF2 12 | SYBR | 21,37 | 78,5 |
| C12 | Unknown | NRF2 12 | SYBR | 21,5 | 78,5 |
| D1 | Unknown | P38 7 | SYBR | 24,75 | 77,5 |
| D2 | Unknown | P38 7 | SYBR | 25,13 | 77,5 |
| D3 | Unknown | P38 8 | SYBR | 27,33 | 77 |
| D4 | Unknown | P38 8 | SYBR | 27,04 | 77,5 |
| D5 | Unknown | P38 9 | SYBR | 23,67 | 77,5 |
| D6 | Unknown | P38 9 | SYBR | 23,69 | 77,5 |
| D7 | Unknown | P38 10 | SYBR | 23,61 | 77,5 |
| D8 | Unknown | P38 10 | SYBR | 23,63 | 77 |
| D9 | Unknown | P38 11 | SYBR | 23,14 | 76,5 |
| D10 | Unknown | P38 11 | SYBR | 23,21 | 77 |
| D11 | Unknown | P38 12 | SYBR | 22,89 | 77 |
| D12 | Unknown | P38 12 | SYBR | 23,06 | 77 |
| E1 | Unknown | ACTB 7 | SYBR | 17,15 | 79 |
| E2 | Unknown | ACTB 7 | SYBR | 16,91 | 79,5 |
| E3 | Unknown | ACTB 8 | SYBR | 18,46 | 79,5 |
| E4 | Unknown | ACTB 8 | SYBR | 18,44 | 79,5 |
| E5 | Unknown | ACTB 9 | SYBR | 15,42 | 79,5 |
| E6 | Unknown | ACTB 9 | SYBR | 15,46 | 79,5 |
| E7 | Unknown | ACTB 10 | SYBR | 15,37 | 79,5 |
| E8 | Unknown | ACTB 10 | SYBR | 15,41 | 79,5 |
| E9 | Unknown | ACTB 11 | SYBR | 15,04 | 79,5 |
| E10 | Unknown | ACTB 11 | SYBR | 15,24 | 79,5 |
| E11 | Unknown | ACTB 12 | SYBR | 14,78 | 79,5 |
| E12 | Unknown | ACTB 12 | SYBR | 14,17 | 80,5 |
| F1 | Unknown | EF1A 7 | SYBR | 19,5 | 77 |
| F2 | Unknown | EF1A 7 | SYBR | 19,47 | 77 |
| F3 | Unknown | EF1A 8 | SYBR | 19,9 | 77 |
| F4 | Unknown | EF1A 8 | SYBR | 21,69 | 76,5 |
| F5 | Unknown | EF1A 9 | SYBR | 17,51 | 77,5 |
| F6 | Unknown | EF1A 9 | SYBR | 17,65 | 77 |
| F7 | Unknown | EF1A 10 | SYBR | 17,4 | 77 |

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|-------|------|
| F8 | Unknown | EF1A 10 | SYBR | 17,28 | 77 |
| F9 | Unknown | EF1A 11 | SYBR | 17,3 | 77 |
| F10 | Unknown | EF1A 11 | SYBR | 17,15 | 77 |
| F11 | Unknown | EF1A 12 | SYBR | 17,14 | 77 |
| F12 | Unknown | EF1A 12 | SYBR | 17,33 | 77 |
| G1 | NTC | CYP1A | SYBR | No Cq | 75 |
| G2 | NTC | HSP70 | SYBR | No Cq | 95 |
| G3 | NTC | NRF2 | SYBR | No Cq | 76,5 |
| G4 | NTC | P38 | SYBR | No Cq | 76,5 |
| G5 | NTC | ACTB | SYBR | No Cq | 67 |
| G6 | NTC | EF1A | SYBR | No Cq | 78,5 |

Vedlegg 11 – RT-qPCR resultater for prøve 1-6 i S6-gruppen

| Well | Well Type | Well Name | Cq (ΔR_n) | Tm Product 1 (-Rn'(T)) |
|------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|
| A1 | Unknown | cyp1a 1 | 27,14 | 79 |
| A2 | Unknown | cyp1a 1 | 26,92 | 79 |
| A3 | Unknown | cyp1a 2 | 27,64 | 78,5 |
| A4 | Unknown | cyp1a 2 | 27,72 | 78,5 |
| A5 | Unknown | cyp1a 3 | 28,48 | 79 |
| A6 | Unknown | cyp1a 3 | 29,23 | 79 |
| A7 | Unknown | cyp1a 4 | 28,03 | 78 |
| A8 | Unknown | cyp1a 4 | 27,49 | 78,5 |
| A9 | Unknown | cyp1a 5 | 27,78 | 78 |
| A10 | Unknown | cyp1a 5 | 27,78 | 78,5 |
| A11 | Unknown | cyp1a 6 | 24,55 | 78,5 |
| A12 | Unknown | cyp1a 6 | 24,66 | 79 |
| B1 | Unknown | hsp70 1 | 28,82 | 77,5 |
| B2 | Unknown | hsp70 1 | 28,34 | 77,5 |
| B3 | Unknown | hsp70 2 | 31,5 | 77,5 |
| B4 | Unknown | hsp70 2 | No Cq | 95 |
| B5 | Unknown | hsp70 3 | 28,53 | 77 |
| B6 | Unknown | hsp70 3 | 28,45 | 77,5 |
| B7 | Unknown | hsp70 4 | 33,69 | 78 |
| B8 | Unknown | hsp70 4 | 33,11 | 78 |
| B9 | Unknown | hsp70 5 | No Cq | 78 |
| B10 | Unknown | hsp70 5 | No Cq | 78 |
| B11 | Unknown | hsp70 6 | 24,27 | 77 |
| B12 | Unknown | hsp70 6 | 24,43 | 77,5 |
| C1 | Unknown | nrf2 1 | 26,92 | 78,5 |
| C2 | Unknown | nrf2 1 | 27 | 78,5 |
| C3 | Unknown | nrf2 2 | 26,79 | 78,5 |
| C4 | Unknown | nrf2 2 | 26,66 | 78,5 |
| C5 | Unknown | nrf2 3 | 26,65 | 78,5 |
| C6 | Unknown | nrf2 3 | 26,84 | 78,5 |
| C7 | Unknown | nrf2 4 | 28,09 | 78,5 |
| C8 | Unknown | nrf2 4 | 28,09 | 78,5 |

| | | | | |
|-----|---------|--------|-------|------|
| C9 | Unknown | nrf2 5 | 29,13 | 78,5 |
| C10 | Unknown | nrf2 5 | 29,07 | 78,5 |
| C11 | Unknown | nrf2 6 | 25,78 | 78,5 |
| C12 | Unknown | nrf2 6 | 25,64 | 78,5 |
| D1 | Unknown | p38 1 | 29,32 | 77 |
| D2 | Unknown | p38 1 | 29,4 | 77 |
| D3 | Unknown | p38 2 | 27,78 | 77 |
| D4 | Unknown | p38 2 | 28,1 | 77 |
| D5 | Unknown | p38 3 | 28,98 | 77 |
| D6 | Unknown | p38 3 | 28,86 | 77 |
| D7 | Unknown | p38 4 | 28,24 | 77,5 |
| D8 | Unknown | p38 4 | 28,26 | 77,5 |
| D9 | Unknown | p38 5 | 28,96 | 77,5 |
| D10 | Unknown | p38 5 | 28,9 | 77,5 |
| D11 | Unknown | p38 6 | 27,01 | 77,5 |
| D12 | Unknown | p38 6 | 27 | 77 |
| E1 | Unknown | actb 1 | 21,06 | 79,5 |
| E2 | Unknown | actb 1 | No Cq | 91 |
| E3 | Unknown | actb 2 | 25,18 | 79 |
| E4 | Unknown | actb 2 | No Cq | 65 |
| E5 | Unknown | actb 3 | 24,22 | 78,5 |
| E6 | Unknown | actb 3 | 24,18 | 79,5 |
| E7 | Unknown | actb 4 | 26,89 | 79 |
| E8 | Unknown | actb 4 | 27,08 | 79 |
| E9 | Unknown | actb 5 | 27,84 | 79 |
| E10 | Unknown | actb 5 | 27,66 | 79 |
| E11 | Unknown | actb 6 | 18,81 | 79 |
| E12 | Unknown | actb 6 | 18,52 | 79,5 |
| F1 | Unknown | efla 1 | 22,33 | 77 |
| F2 | Unknown | efla 1 | 22,57 | 77 |
| F3 | Unknown | efla 2 | 25,32 | 77 |
| F4 | Unknown | efla 2 | 25,31 | 77 |
| F5 | Unknown | efla 3 | 23,63 | 77 |
| F6 | Unknown | efla 3 | 23,72 | 76,5 |
| F7 | Unknown | efla 4 | 28,29 | 78,5 |

| | | | | |
|-----|---------|--------|-------|------|
| F8 | Unknown | efla 4 | 28,17 | 79 |
| F9 | Unknown | efla 5 | 28,8 | 79,5 |
| F10 | Unknown | efla 5 | 28,5 | 79 |
| F11 | Unknown | efla 6 | 20,53 | 77 |
| F12 | Unknown | efla 6 | 20,49 | 77 |
| G1 | NTC | cyp1a | No Cq | 95 |
| G2 | NTC | hsp70 | No Cq | 77 |
| G3 | NTC | nrf2 | No Cq | 78 |
| G4 | NTC | p38 | No Cq | 70,5 |
| G5 | NTC | actb | No Cq | 75 |
| G6 | NTC | efla | No Cq | 75,5 |

Vedlegg 12 – RT-qPCR resultater for prøve 8-13 i S6-gruppen

| Well | Well Type | Well Name | Dye | Cq (ΔR_n) | Tm Product 1 (-Rn'(T)) |
|------|-----------|-----------|------|---------------------|------------------------|
| A1 | Unknown | CYP1A 8 | SYBR | 21,73 | 79 |
| A2 | Unknown | CYP1A 8 | SYBR | 21,63 | 79 |
| A3 | Unknown | CYP1A 9 | SYBR | 22,61 | 79 |
| A4 | Unknown | CYP1A 9 | SYBR | 22,59 | 79 |
| A5 | Unknown | CYP1A 11 | SYBR | 21,72 | 79 |
| A6 | Unknown | CYP1A 11 | SYBR | 21,74 | 79 |
| A7 | Unknown | CYP1A 12 | SYBR | 23,44 | 79 |
| A8 | Unknown | CYP1A 12 | SYBR | 23,58 | 79 |
| A9 | Unknown | CYP1A 13 | SYBR | 22,47 | 79 |
| A10 | Unknown | CYP1A 13 | SYBR | 22,28 | 79 |
| B1 | Unknown | HSP70 8 | SYBR | 24,96 | 77,5 |
| B2 | Unknown | HSP70 8 | SYBR | 24,82 | 77,5 |
| B3 | Unknown | HSP70 9 | SYBR | 21,26 | 77,5 |
| B4 | Unknown | HSP70 9 | SYBR | 21,26 | 77,5 |
| B5 | Unknown | HSP70 11 | SYBR | 21,56 | 77,5 |
| B6 | Unknown | HSP70 11 | SYBR | 21,91 | 77,5 |
| B7 | Unknown | HSP70 12 | SYBR | 23,67 | 77,5 |
| B8 | Unknown | HSP70 12 | SYBR | 23,73 | 77,5 |
| B9 | Unknown | HSP70 13 | SYBR | 20,77 | 77,5 |
| B10 | Unknown | HSP70 13 | SYBR | 20,8 | 77,5 |
| C1 | Unknown | NRF2 8 | SYBR | 22,68 | 78,5 |
| C2 | Unknown | NRF2 8 | SYBR | 22,62 | 78,5 |
| C3 | Unknown | NRF2 9 | SYBR | 23,57 | 78,5 |
| C4 | Unknown | NRF2 9 | SYBR | 23,62 | 78,5 |
| C5 | Unknown | NRF2 11 | SYBR | 22,84 | 78,5 |
| C6 | Unknown | NRF2 11 | SYBR | 22,85 | 78,5 |
| C7 | Unknown | NRF2 12 | SYBR | 23,94 | 78,5 |
| C8 | Unknown | NRF2 12 | SYBR | 24,05 | 78,5 |
| C9 | Unknown | NRF2 13 | SYBR | 22,96 | 78,5 |
| C10 | Unknown | NRF2 13 | SYBR | 23,13 | 78,5 |
| D1 | Unknown | P38 8 | SYBR | 24,12 | 77 |
| D2 | Unknown | P38 8 | SYBR | 24,2 | 77 |

| | | | | | |
|-----|---------|---------|------|-------|------|
| D3 | Unknown | P38 9 | SYBR | 25,11 | 77 |
| D4 | Unknown | P38 9 | SYBR | 24,95 | 77,5 |
| D5 | Unknown | P38 11 | SYBR | 24,49 | 77 |
| D6 | Unknown | P38 11 | SYBR | 24,53 | 77 |
| D7 | Unknown | P38 12 | SYBR | 25,44 | 77 |
| D8 | Unknown | P38 12 | SYBR | 25,54 | 77 |
| D9 | Unknown | P38 13 | SYBR | 24,96 | 77 |
| D10 | Unknown | P38 13 | SYBR | 24,9 | 77 |
| E1 | Unknown | ACTB 8 | SYBR | 16,83 | 79,5 |
| E2 | Unknown | ACTB 8 | SYBR | 15,9 | 79,5 |
| E3 | Unknown | ACTB 9 | SYBR | 16,5 | 79,5 |
| E4 | Unknown | ACTB 9 | SYBR | 16,45 | 79,5 |
| E5 | Unknown | ACTB 11 | SYBR | 15,82 | 79,5 |
| E6 | Unknown | ACTB 11 | SYBR | 15,87 | 79,5 |
| E7 | Unknown | ACTB 12 | SYBR | 17,55 | 79,5 |
| E8 | Unknown | ACTB 12 | SYBR | 17,6 | 79,5 |
| E9 | Unknown | ACTB 13 | SYBR | 15,87 | 79,5 |
| E10 | Unknown | ACTB 13 | SYBR | 15,81 | 79,5 |
| F1 | Unknown | EF1A 8 | SYBR | 16,92 | 77 |
| F2 | Unknown | EF1A 8 | SYBR | 16,97 | 77 |
| F3 | Unknown | EF1A 9 | SYBR | 17,99 | 76,5 |
| F4 | Unknown | EF1A 9 | SYBR | 17,98 | 77 |
| F5 | Unknown | EF1A 11 | SYBR | 17,38 | 76,5 |
| F6 | Unknown | EF1A 11 | SYBR | 17,7 | 77 |
| F7 | Unknown | EF1A 12 | SYBR | 18,96 | 77 |
| F8 | Unknown | EF1A 12 | SYBR | 19,02 | 77 |
| F9 | Unknown | EF1A 13 | SYBR | 17,18 | 77 |
| F10 | Unknown | EF1A 13 | SYBR | 17,24 | 77 |
| G1 | NTC | CYP1A | SYBR | 34,6 | 74 |
| G2 | NTC | HSP70 | SYBR | No Cq | 77,5 |
| G3 | NTC | NRF2 | SYBR | No Cq | 77 |
| G4 | NTC | P38 | SYBR | No Cq | 77,5 |
| G5 | NTC | ACTB | SYBR | No Cq | 76,5 |
| G6 | NTC | EF1A | SYBR | 34,82 | 77 |

Vedlegg 13 – RT-qPCR resultater for ASK-celler uten CuSO₄

| Well | Well Type | Well Name | Cq (ΔR_n) | Tm Product 1 (-Rn'(T)) |
|------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|
| A1 | Unknown | CYP1A 0A1 | 24,34 | 79 |
| A2 | Unknown | CYP1A 0A2 | 24,4 | 79 |
| A3 | Unknown | CYP1A 0B1 | 23,79 | 79 |
| A4 | Unknown | CYP1A 0B2 | 23,63 | 79 |
| A5 | Unknown | CYP1A 0C1 | 23,13 | 79,5 |
| A6 | Unknown | CYP1A 0C2 | 23,23 | 79,5 |
| A7 | Unknown | CYP1A 0D1 | 22,87 | 79 |
| A8 | Unknown | CYP1A 0D2 | 22,68 | 79 |
| A9 | Unknown | CYP1A 0E1 | 23,36 | 79 |
| A10 | Unknown | CYP1A 0E2 | 23,12 | 79 |
| A11 | Unknown | CYP1A 0F2 | 24,32 | 79 |
| A12 | Unknown | CYP1A 0F1 | 24,29 | 79,5 |
| B1 | Unknown | HSP70 0A1 | 23,92 | 77 |
| B2 | Unknown | HSP70 0A2 | 24,04 | 77 |
| B3 | Unknown | HSP70 0B1 | 24,92 | 77 |
| B4 | Unknown | HSP70 0B2 | 24,75 | 77 |
| B5 | Unknown | HSP70 0C1 | 22,68 | 77 |
| B6 | Unknown | HSP70 0C2 | 22,82 | 77 |
| B7 | Unknown | HSP70 0D1 | 24,42 | 77 |
| B8 | Unknown | HSP70 0D2 | 24,44 | 77 |
| B9 | Unknown | HSP70 0E1 | 21,45 | 77 |
| B10 | Unknown | HSP70 0E2 | 21,47 | 77 |
| B11 | Unknown | HSP70 0F2 | 24,73 | 77 |
| B12 | Unknown | HSP70 0F1 | 25,2 | 77 |
| C1 | Unknown | NRF2 0A1 | 26,8 | 78,5 |
| C2 | Unknown | NRF2 0A2 | 26,6 | 78,5 |
| C3 | Unknown | NRF2 0B1 | 26,87 | 78 |
| C4 | Unknown | NRF2 0B2 | 26,37 | 78,5 |
| C5 | Unknown | NRF2 0C1 | 26,3 | 78,5 |
| C6 | Unknown | NRF2 0C2 | 26,54 | 78,5 |
| C7 | Unknown | NRF2 0D1 | 26,44 | 78,5 |

| | | | | |
|-----|---------|----------|-------|------|
| C8 | Unknown | NRF2 0D2 | 26,28 | 78,5 |
| C9 | Unknown | NRF2 0E1 | 26,48 | 78,5 |
| C10 | Unknown | NRF2 0E2 | 26,39 | 78,5 |
| C11 | Unknown | NRF2 0F2 | 26,44 | 78,5 |
| C12 | Unknown | NRF2 0F1 | 26,47 | 78,5 |
| D1 | Unknown | P38 0A1 | 27,34 | 77 |
| D2 | Unknown | P38 0A2 | 27,43 | 77 |
| D3 | Unknown | P38 0B1 | 27,92 | 77 |
| D4 | Unknown | P38 0B2 | 27,65 | 77 |
| D5 | Unknown | P38 0C1 | 27,73 | 77 |
| D6 | Unknown | P38 0C2 | 27,83 | 77 |
| D7 | Unknown | P38 0D1 | 27,45 | 77 |
| D8 | Unknown | P38 0D2 | 27,2 | 77 |
| D9 | Unknown | P38 0E1 | 27,77 | 77 |
| D10 | Unknown | P38 0E2 | 27,68 | 77 |
| D11 | Unknown | P38 0F2 | 27,6 | 77 |
| D12 | Unknown | P38 0F1 | 27,67 | 77 |
| E1 | Unknown | ACTB 0A1 | 17,91 | 79 |
| E2 | Unknown | ACTB 0A2 | 17,97 | 79,5 |
| E3 | Unknown | ACTB 0B1 | No Cq | 79 |
| E4 | Unknown | ACTB 0B2 | 18,3 | 79,5 |
| E5 | Unknown | ACTB 0C1 | 18,48 | 79,5 |
| E6 | Unknown | ACTB 0C2 | 18,67 | 79,5 |
| E7 | Unknown | ACTB 0D1 | 17,96 | 79,5 |
| E8 | Unknown | ACTB 0D2 | 17,95 | 79,5 |
| E9 | Unknown | ACTB 0E1 | 18,55 | 79,5 |
| E10 | Unknown | ACTB 0E2 | 18,39 | 79,5 |
| E11 | Unknown | ACTB 0F2 | 19,18 | 79 |
| E12 | Unknown | ACTB 0F1 | 18,47 | 79,5 |
| F1 | Unknown | EF1A 0A1 | No Cq | 95 |
| F2 | Unknown | EF1A 0A2 | No Cq | 73 |
| F3 | Unknown | EF1A 0B1 | No Cq | 79 |
| F4 | Unknown | EF1A 0B2 | No Cq | 79,5 |
| F5 | Unknown | EF1A 0C1 | No Cq | 80 |
| F6 | Unknown | EF1A 0C2 | No Cq | 79,5 |

| | | | | |
|-----|---------|----------|-------|------|
| F7 | Unknown | EF1A 0D1 | No Cq | 79,5 |
| F8 | Unknown | EF1A 0D2 | No Cq | 71 |
| F9 | Unknown | EF1A 0E1 | No Cq | 78,5 |
| F10 | Unknown | EF1A 0E2 | No Cq | 79,5 |
| F11 | Unknown | EF1A 0F2 | No Cq | 78,5 |
| F12 | Unknown | EF1A 0F1 | No Cq | 79,5 |
| G1 | NTC | CYP1A | No Cq | 72 |
| G2 | NTC | HSP70 | No Cq | 79,5 |
| G3 | NTC | NRF2 | No Cq | 77,5 |
| G4 | NTC | P38 | No Cq | 77 |
| G5 | NTC | ACTB | No Cq | 77 |
| G6 | NTC | EF1A | No Cq | 79,5 |
| H1 | Unknown | CYP1A T2 | 24,69 | 79,5 |
| H2 | Unknown | CYP1A T2 | 24,8 | 79,5 |
| H3 | Unknown | HSP70 T2 | 23,26 | 77 |
| H4 | Unknown | HSP70 T2 | 23,31 | 77,5 |
| H5 | Unknown | NRF2 T2 | 25,85 | 78,5 |
| H6 | Unknown | NRF2 T2 | 25,88 | 78,5 |
| H7 | Unknown | P38 T2 | 26,91 | 77,5 |
| H8 | Unknown | P38 T2 | 27,03 | 77 |
| H9 | Unknown | ACTB T2 | 17,68 | 79,5 |
| H10 | Unknown | ACTB T2 | 17,65 | 79,5 |
| H11 | Unknown | EF1A T2 | No Cq | 95 |
| H12 | Unknown | EF1A T2 | No Cq | 80 |

Vedlegg 14 – RT-qPCR resultater for ASK-celler med CuSO₄

| Well | Well Type | Well Name | Cq (ΔR_n) | Tm Product 1 (-R _n '(T)) |
|------|-----------|------------|------------------------|-------------------------------------|
| A1 | Unknown | CYP1A CuA1 | 26,65 | 79 |
| A2 | Unknown | CYP1A CuA2 | 26,35 | 79 |
| A3 | Unknown | CYP1A CuB1 | 27,05 | 79 |
| A4 | Unknown | CYP1A CuB2 | 27,18 | 79 |
| A5 | Unknown | CYP1A CuC1 | 26,23 | 79 |
| A6 | Unknown | CYP1A CuC2 | 24,93 | 79 |
| A7 | Unknown | CYP1A CuD1 | 24,68 | 79 |
| A8 | Unknown | CYP1A CuD2 | 24,87 | 79 |
| A9 | Unknown | CYP1A CuE1 | 27,1 | 79 |
| A10 | Unknown | CYP1A CuE2 | 27,21 | 79 |
| A11 | Unknown | CYP1A CuF1 | 25,62 | 79 |
| A12 | Unknown | CYP1A CuF2 | 25,77 | 79 |
| B1 | Unknown | HSP70 CuA1 | 17 | 77,5 |
| B2 | Unknown | HSP70 CuA2 | 16,73 | 77,5 |
| B3 | Unknown | HSP70 CuB1 | 16,75 | 77,5 |
| B4 | Unknown | HSP702 | 16,81 | 77,5 |
| B5 | Unknown | HSP70 CuC1 | 17,7 | 77,5 |
| B6 | Unknown | HSP70 CuC2 | 18,87 | 77,5 |
| B7 | Unknown | HSP70 CuD1 | 18,07 | 78,5 |
| B8 | Unknown | HSP70 CuD2 | 19,07 | 77,5 |
| B9 | Unknown | HSP70 CuE1 | 17,39 | 77,5 |
| B10 | Unknown | HSP70 CuE2 | 17,42 | 77,5 |
| B11 | Unknown | HSP70 CuF1 | 19,33 | 77,5 |
| B12 | Unknown | HSP70 CuF2 | 19,25 | 77,5 |
| C1 | Unknown | NRF2 CuA1 | 26,46 | 78,5 |
| C2 | Unknown | NRF2 CuA2 | 26,17 | 78,5 |
| C3 | Unknown | NRF2 CuB1 | 25,27 | 78,5 |
| C4 | Unknown | NRF2 CuB2 | 25,97 | 78,5 |
| C5 | Unknown | NRF2 CuC1 | 25,01 | 78,5 |
| C6 | Unknown | NRF2 CuC2 | 25,28 | 78,5 |
| C7 | Unknown | NRF2 CuD1 | 24,98 | 78,5 |

| | | | | |
|-----|---------|-----------|-------|------|
| C8 | Unknown | NRF2 CuD2 | 25,11 | 78,5 |
| C9 | Unknown | NRF2 CuE1 | 25,13 | 78,5 |
| C10 | Unknown | NRF2 CuE2 | 25,2 | 78,5 |
| C11 | Unknown | NRF2 CuF1 | 25,75 | 78,5 |
| C12 | Unknown | NRF2 CuF2 | 25,61 | 78,5 |
| D1 | Unknown | P38 CuA1 | 27,96 | 77 |
| D2 | Unknown | P38 CuA2 | 27,77 | 77 |
| D3 | Unknown | P38 CuB1 | 28,48 | 77 |
| D4 | Unknown | P38 CuB2 | 28,4 | 77,5 |
| D5 | Unknown | P38 CuC1 | 28,85 | 77 |
| D6 | Unknown | P38 CuC2 | 28,57 | 77 |
| D7 | Unknown | P38 CuD1 | 28,58 | 77 |
| D8 | Unknown | P38 CuD2 | 28,69 | 77 |
| D9 | Unknown | P38 CuE1 | 29,84 | 77 |
| D10 | Unknown | P38 CuE2 | 29,85 | 77 |
| D11 | Unknown | P38 CuF1 | 28,54 | 77 |
| D12 | Unknown | P38 CuF2 | 28,24 | 77,5 |
| E1 | Unknown | ACTB CuA1 | No Cq | 79 |
| E2 | Unknown | ACTB CuA2 | 18,22 | 79,5 |
| E3 | Unknown | ACTB CuB1 | 18,55 | 79,5 |
| E4 | Unknown | ACTB CuB2 | 18,75 | 79,5 |
| E5 | Unknown | ACTB CuC1 | 18,68 | 79,5 |
| E6 | Unknown | ACTB CuC2 | 18,34 | 79,5 |
| E7 | Unknown | ACTB CuD1 | 17,88 | 79,5 |
| E8 | Unknown | ACTB CuD2 | 18,01 | 79,5 |
| E9 | Unknown | ACTB CuE1 | 18,83 | 79,5 |
| E10 | Unknown | ACTB CuE2 | 19,17 | 79,5 |
| E11 | Unknown | ACTB CuF1 | 19,29 | 79,5 |
| E12 | Unknown | ACTB CuF2 | 19,03 | 79,5 |
| F1 | Unknown | EF1A CuA1 | 22,81 | 77 |
| F2 | Unknown | EF1A CuA2 | 22,72 | 77 |
| F3 | Unknown | EF1A CuB1 | 22,65 | 77 |
| F4 | Unknown | EF1A CuB2 | 22,88 | 77 |
| F5 | Unknown | EF1A CuC1 | 22,57 | 77 |
| F6 | Unknown | EF1A CuC2 | 22,61 | 76,5 |

| | | | | |
|-----|---------|-----------|-------|------|
| F7 | Unknown | EF1A CuD1 | 22,96 | 77 |
| F8 | Unknown | EF1A CuD2 | 22,25 | 77 |
| F9 | Unknown | EF1A CuE1 | 22,69 | 77 |
| F10 | Unknown | EF1A CuE2 | 22,85 | 77 |
| F11 | Unknown | EF1A CuF1 | 22,9 | 77 |
| F12 | Unknown | EF1A CuF2 | 23,04 | 77 |
| G1 | NTC | CYP1A | No Cq | 75,5 |
| G2 | NTC | HSP70 | No Cq | 79,5 |
| G3 | NTC | NRF2 | No Cq | 78 |
| G4 | NTC | P38 | No Cq | 77 |
| G5 | NTC | ACTB | No Cq | 78,5 |
| G6 | NTC | EF1A | No Cq | 75 |
| H1 | Unknown | CYP1A T1 | 24,94 | 79,5 |
| H2 | Unknown | CYP1A T1 | 25 | 79,5 |
| H3 | Unknown | HSP70 T1 | 22,57 | 78 |
| H4 | Unknown | HSP70 T1 | 23,31 | 77,5 |
| H5 | Unknown | NRF2 T1 | 26,26 | 78,5 |
| H6 | Unknown | NRF2 T1 | 26,26 | 78,5 |
| H7 | Unknown | P38 T1 | 27,24 | 77,5 |
| H8 | Unknown | P38 T1 | 27,19 | 77,5 |
| H9 | Unknown | ACTB T1 | 18,08 | 79,5 |
| H10 | Unknown | ACTB T1 | 17,94 | 79,5 |
| H11 | Unknown | EF1A T1 | 22,79 | 77 |
| H12 | Unknown | EF1A T1 | No Cq | 75,5 |

