



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 60 stp

Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Deteksjon og kvantifikasjon av HRV87 i A549 celler med og uten Neu5Ac *in vitro*

Detection and quantification of HRV87 in A549 cells
with and without Neu5Ac *in vitro*

Hanne Lillerovde Ørstenvik

Master i bioteknologi, Genetikk

Forord

Denne masteroppgaven er avslutningsvis en del av det toårige masterstudiet Bioteknologi ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø - og Biovitenskapelige universitet (NMBU) og tilsvarer 60 studiepoeng. Masteroppgaven er utført i Ålesund ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU), avdeling for biologiske fag i perioden august 2020 til juni 2021. Førsteamanuensis Ann-Kristin Tveten og førsteamanuensis Yanran Cao har vært fungerende veiledere ved NTNU, Ålesund. Samtidig har professor Gustav Vaaje-Kolstad vært intern veileder gjennom NMBU, KMB fakultetet. Under oppholdet ved NTNU har jeg utviklet meg faglig og personlig. Arbeidet har bydd på utfordringer, men man kommer ikke til topps ved å gå på flat vei, og det er jeg glad for.

Et år har gått og det er rart å sette et endelig punktum for det ferdige produktet. På den kronglete veien til en god magefølelse har det stått en gjeng med fine mennesker i hver sving og heiet på meg. Og disse fortjener alle en berettiget takk. Vil spesielt rette en stor takk til mine hovedveiledere ved NTNU Ålesund, Ann-Kristin Tveten og Yanran Cao for all hjelp, tålmodighet, tillit, konstruktiv tilbakemelding og samarbeid, ikke minst takk for den ekstra innsatsen for å løse plutselige omstillinger i forbindelse med SARS-Cov-2 pandemien som har gjort det spesielt utfordrende i perioder. Takk til alle ansatte ved NTNU, avdeling for biologiske fag for smil og en hjelpende hånd ved behov. Vil også rette en stor takk til veileder Gustav Vaaje-Kolstad ved NMBU for godt samarbeid og oppfølging. Veiledere med ulik faglig bakgrunn har vært viktig for å kunne drøfte aspektene ved arbeidet. Takk til familien og venner for støtte og oppløftende ord gjennom hele arbeidet. Og ikke minst takk til kjæresten som har holdt ut i krevende perioder. Avslutningsvis vil jeg også takke gode venner fra studiet som har vært nyttige sparringspartnere underveis i skriveprosessen.

Ålesund, juni 2021

Hanne Lillerovde Ørstenvik

Sammendrag

Forkjølelse er et dagligdags problem som forårsakes av ulike varianter av rhinovirus. Rhinovirus er en av de vanligste årsakene til luftveisinfeksjoner og står for omlag 50 % av tilfellene. Forskningslitteraturen viser til at flere luftveisvirus, inkludert noen varianter av rhinovirus, bruker sialinsyre på celleoverflaten som reseptor for å ta seg inn i epitelcellene i kroppen vår. Formålet med denne studien har vært å utarbeide RT-qPCR metode for deteksjon av HRV87 og undersøke om Neu5Ac påvirker virusets replikasjon.

HRV87 ble kultivert til virusstock i etablert A549 cellekultur. Virusstock ble brukt som utgangspunktet for valideringen av RT-qPCR metoden og i arbeid med *in vitro* celledyrkingsforsøkene. TCID₅₀ ble utført for å gi et mål på mengden virus som skaper effekt i cellene. *In vitro* celledyrkingsforsøkene har undersøkt HRV87 sin evne til å gjennomgå replikasjon ved tilstedeværelse av Neu5Ac. Utviklingen av HRV87 har blitt vurdert innenfor 0 til 96 timer med Neu5Ac konsentrasjon fra 0,1 mM til 2,0 mM tilsatt dyrkingsmediet. Parallelt har Neu5Ac sin påvirkning på levedyktighet til A549 celler blitt vurdert.

RT-qPCR metoden presenterer vellykket kvantifisering og deteksjon av HRV87. Metodens effektivitet, spesifisitet, sensitivitet og variasjon er vurdert. TCID₅₀ ble beregnet til 10⁶ konsentrasjonen av HRV87 som skaper CPE i 50 % av cellene. *In vitro* celledyrkingsforsøkene viser at Neu5Ac ikke har noen effekt på HRV87 utover 72 timer. Ved lavere virus konsentrasjoner, med forutsetningen om tilstrekkelig Neu5Ac til stede, ble det observert endring ved HRV87 tilsatt 0,1 mM og 1,0 mM Neu5Ac etter 24 timer og 48 timer. Relativ endring ble registrert ved HRV87 kultivert med 0,2 mM og 0,8 mM Neu5Ac etter 24 timer.

Denne studien er utarbeidet med forutsetning om at A549 cellene hadde gjennomgått en cellesyklus før prøvemateriale ble tatt ut, hvor det i løpet av syklusen har blitt x virspartikler tatt opp og reproduisert. Effekten av Neu5Ac vurderes på allerede etablert viruskultur. Alle resultatene tatt i betraktning, så konkluderte en med at denne studien presenterer en RT – qPCR metoden for deteksjon av HRV87 som også oppfattet variasjoner i mengde virus. 0,2 mM og 0,8 mM er de eneste Neu5Ac konsentrasjonene som viste effekt i form av relativ endring etter 24 timer. Indikasjonene som er gitt gjennom denne studien må videre følges opp med mer detaljerte undersøkelser.

Abstract

Colds are an everyday problem caused by different varieties of rhinovirus. Rhinovirus is one of the most common causes of respiratory infections and accounts for about 50% of cases. The research literature indicates that several respiratory viruses, including some variants of rhinovirus, use sialic acid on the cell surface as a receptor to enter the epithelial cells in our body. The purpose of this study has been to develop an RT-qPCR assay for detecting HRV87 and to investigate whether Neu5Ac affects the replication of the virus.

HRV87 was cultured for virus stock in established A549 cell culture. Virus stock was used as starting point for the validation of RT-qPCR and in work with *in vitro* cell culture experiments. TCID₅₀ was performed to give a measure of the amount of virus that creates an effect in the cells. *In vitro* cell experiments have examined HRV87's ability to replicate in the presence of Neu5Ac. The development of HRV87 has been rated within 0 to 96 hours with varying Neu5Ac concentration from 0.1 mM to 10 mM Neu5Ac added to the culture medium. In parallel, the effect of Neu5Ac on the viability of A549 cells has been assessed.

The RT-qPCR method presents successful quantification and detection of HRV87. The method's effectiveness, specificity, sensitivity, and variation have been assessed. TCID₅₀ was calculated to be 10⁻⁵ concentration of HRV87 that creates CPE in 50% of cells. *In vitro* cell culture experiments show that Neu5Ac does not affect virus beyond 72 hours. With the assumption of sufficient Neu5Ac present at lower virus concentrations, change in HRV87 was added with 0.1 mM and 1.0 mM Neu5Ac after 24 hours and 48 hours. Relative change was recorded in HRV87 cultured with 0.2 mM and 0.8 mM Neu5Ac after 24 hours.

This study has been prepared on the assumption that the A549 cells had undergone a cell cycle before sample material was taken out, where x virus particles have been taken up and reproduced during the cycle. The effect of Neu5Ac is assessed on already established virus culture. Taking all the results into account, one concluded that this study presents an RT - qPCR method for detecting HRV87, which also perceived variations in the amount of virus. 0.2 mM and 0.8 mM are the only Neu5Ac concentrations that showed an effect in terms of relative change after 24 hours. The indications given through this study must be further followed up with more detailed studies.

Forkortelser

AA	Antibiotic Antimycotic
CDHR3	Cadherin-related family member 3
cDNA	Komplementært DNA
CPE	Cytopatisk effekt
CMP	Cytidine monofosfat
C _t	Cycle threshold
CTP	Cytidine trifosfat
dH ₂ O	Mili-Q sterilt vann
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles of MEM
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Phosphate-buffered saline
EDTA	Etylen Diamin Tetra Acetat
ER	Endoplasmatisk Retikulum
FBS	Fetal bovint serum
FWD	Forward primer
HRV 87	Humant rhinovirus 87 (Enterovirus D68)
ICAM-1	Intracellulært Adhesjons molekyl 1
Intraassay	replikat av samme prøve i samme oppsett
Interassay	replikat av samme prøve i ulike oppsett
LAF-benk	Laminær luftstrøms benk
LDLR	low-density lipid reseptor
LOD	Deteksjonsgrense
Mean	Gjennomsnitt
MTT	Metyl Thiazolyl Difenyl-tetrazolium bromid
NaOH	Natriumhydroksid
Neu5Ac	N-acetylneuraminsyre
NCBI	Nasjonalt senter for bioteknologisk informasjon
NoRT	Ingen revers transkriptase kontroll
NMBU	Norges Miljø -og biovitenskapelige universitet
NTC	Ingen template kontroll
NTNU	Norges Tekniske og Naturvitenskapelige Universitet
OD	Optisk tetthet
PCR	Polymerase

qPCR	Kvalitativ / Kvantitativ polymerase kjedereaksjoner
RdRp	RNA avhengig RNA polymerase
rpm	Rotasjoner per minutt
RT	Revers Transkripsjon
RWD	Revers primer
SD	Standardavvik
SA	Sialinsyre
UV	Ultraviolet

Benevninger:

°C	Grader Celsius
g	Gram
mg	milligram
min	minutt
ml	milliliter (10^{-3})
nm	nanometer
nM	nanomol
mM	milimolar (10^{-3} M)
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious dose (gjennomsnittlig virus infeksjonsdose)
sek	Sekund
µg	mikrogram
µl	mikroliter (10^{-6})
µM	mikromol (10^{-6} M)
x g	akselerasjon (100g betyr kraft er lik 100 ganger dets tyngde)

INNHALDSFORTEGNELSE

1. INNLEDNING	1
1.1 Mål med oppgaven	2
2 TEORI	3
2.1 Luftveiene	3
2.2 Luftveisinfeksjon	4
2.3 Rhinovirus	6
2.3.1 Sialinsyre	7
2.4 Behandling med sialinsyre	9
2.5 Metodisk teori	10
2.5.1 Deteksjon av virus	10
2.5.2 Virustiter for infeksjonsdose.....	10
2.5.3 Polymerase kjedereaksjoner.....	10
2.5.4 MIQE retningslinjer og kvalitetssikring.....	14
2.5.5 Beregninger	15
2.5.6 In vitro celledyrking	16
2.5.7 Levedyktighetsassay	17
2.5.8 Flowcytometri.....	17
3 MATERIALER OG METODER	18
Eksperimentell design.....	18
3.1 Virus	18
3.2 Virusstock	19
3.3 TCID₅₀ for infeksjonsdose	20
3.4 Ekstrahering av viralt RNA	21
3.5 Kvalitetsmålinger	21
3.6 Etablering av RT-qPCR	21
3.6.1 Primer optimalisering	22
3.6.2 Probe optimalisering.....	23

3.6.3	<i>Assay validering</i>	24
3.7	<i>HRV87 RT-qPCR assay</i>	25
3.8	<i>Cellelinje</i>	26
3.9	<i>Celledyrking</i>	26
3.10	<i>Sialinsyre</i>	26
3.10.1	<i>pH måling</i>	27
3.10.2	<i>pH justering</i>	27
3.11	<i>Flowcytometri</i>	27
3.11.1	<i>Optimalisering</i>	27
3.11.2	<i>Proliferasjonstest</i>	28
3.12	<i>MTT assay</i>	29
3.13	<i>In vitro celledyrkingsforsøk</i>	30
3.13.1	<i>Innledende forsøk</i>	30
3.13.2	<i>Forsøk.1</i>	31
3.13.3	<i>Forsøk.2</i>	32
3.13.4	<i>Forsøk.3</i>	33
4	RESULTATER	34
4.1	<i>TCID₅₀ test</i>	35
4.2	<i>RT-qPCR</i>	36
4.2.1	<i>Primer og probe optimalisering</i>	36
4.2.2	<i>Standardkurve</i>	36
4.3	<i>Sialinsyre konsentrasjoner</i>	38
4.3.1	<i>Justeringer</i>	39
4.4	<i>Flowcytometri</i>	40
4.4.1	<i>Prosedyre optimalisering</i>	40
4.4.2	<i>A549 proliferasjon</i>	41
4.5	<i>MTT assay</i>	42
4.6	<i>In vitro celledyrkingsforsøk</i>	44
4.6.1	<i>Forsøk. 1</i>	44

4.6.2	<i>Forsøk.2</i>	48
4.6.3	<i>Forsøk.3</i>	55
5	DISKUSJON	58
5.1	<i>Veien videre</i>	70
6	KONKLUSJON	70
7.	VEDLEGG	71
8.	LITTERATURLISTE	72

1. INNLEDNING

Forkjølelse er den vanligste luftveisinfeksjonen og utgjør et dagligdags problem som kommer i ulike former. Forkjølelse rammer stort sett alle, og økt antall tilfeller periodevis gjennom et år, henger tett sammen med at noen av disse er mer sesongbaserte (Jacobs, Lamson, St George, & Walsh, 2013). Forkjølelse kommer med typiske symptomer som hoste, nysing og i noen tilfeller lett feber. Varighet og alvorlighetsgrad henger sammen med det spesifikke viruset og grad av infeksjon i luftveiene. Immunforsvaret til de enkelte personene som blir smittet har også en viktig rolle for hvordan sykdommen utvikler seg. Personer med svekket immunforsvar eller andre kroniske plager, vil være mer utsatt for sykdom og gjerne også få et mer alvorlig sykdomsforløp enn andre. Forkjølelse bidrar til at folk holder seg hjemme fra hverdagslige aktiviteter som blant annet jobb. Dette skaper sykefravær som samlet sett er en stor økonomisk utgiftspost for samfunnet (Hem, 2011).

De mange ulike symptomene av den «vanlige» forkjølelsen skyldes normalt sett ulike varianter av rhinovirus (Jacobs et al., 2013). Mens koronavirus og influensavirus ofte gir mer alvorlige symptom sammenlignet med det mer alminnelige rhinoviruset ((Paules, Marston, & Fauci, 2020), (Earn, Dushoff, & Levin, 2002)). Rhinovirus alene, står for bort imot 50 % av alle forkjølelsetilfellene hos mennesker. Dette viruset bruker mennesk som reservoar og smitter særdeles lett ved dråpe og kontaktsmitte (Jacobs et al., 2013). Rhinovirus tar seg inn i de øvre delene av respirasjonssystemet og videre til epitelcellene (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016). Felles for rhinovirus, koronavirus og influensavirus er at alle disse ulike typene bruker sialinsyre på celleoverflaten som reseptor for å kunne ta seg inn i cellen og gjennomgå replikasjon. Rhinovirus har over hundre ulike serotyper som alle er undersøkt og omtalt ((Jacobs et al., 2013), (Blaas & Fuchs, 2016)). Av disse er det kun humant rhinovirus 87 (HRV87) som bruker sialinsyre som reseptor og skiller seg ut fra de andre rhinovirus som er kartlagt. Analysering og diagnostisering av viruset gjøres ved en rekke ulike teknikker, deriblant polymerase kjedereaksjoner (PCR) metoder og immunoassay-teknikker som enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Denne studien tar for seg sialinsyre-avhengige virus i cellekultur hvor virusets reproduksjon måles med kvantitativ revers transkripsjon real time PCR (RT-qPCR). For en slik *in vitro* studie er HRV87 et godt alternativ ((Gambarino et al., 2009), (Alpana Waghmare, 2018)).

Kommersielt tilgjengelige metoder for å analysere rhinovirus dekker normalt ikke HRV87 ettersom dette er et virus som er genomisk ulik de andre variantene ((Do et al., 2010), (Gambarino et al., 2009)). HRV87 har i senere tid blitt omklassifisert til enterovirus D68 og har derfor basert på ATCC-nummer to navn. I litteraturen omtales viruset ved begge navnene og for litteratursøk til denne studien har det vært nødvendig å bruke begge disse. Gjennom denne studien omtales viruset for ordens skyld konsekvent som HRV87.

En del av arbeidet har vært å utarbeide RT-qPCR for deteksjon av HRV87. Oppgavens struktur har dreid seg basert på arbeid med å kultivere virus for å få til PCR. Det har i tillegg blitt arbeidet med celler tilsatt sialinsyren Neu5Ac. En av utfordringene med å etablere RT- qPCR metode, og gjennomføre *in vitro* celle og virusforsøk i koronapandemien har vært tilgang til reagenser. Metodene gjennomført avhenger av samme reagenser som anvendes i analyser av SARS-Cov-2 på verdensbasis, og det har skapt noen uforutsette begrensninger for masteroppgaven. I dialog med veiledere ble det derfor valgt å bruke biologiske duplikat med tekniske duplikat for hvert analysepunkt. Det medfører at alle analysepunkt er representert med fire målte verdier, og ikke seks som i henhold til MIQE retningslinjene.

1.1 Mål med oppgaven

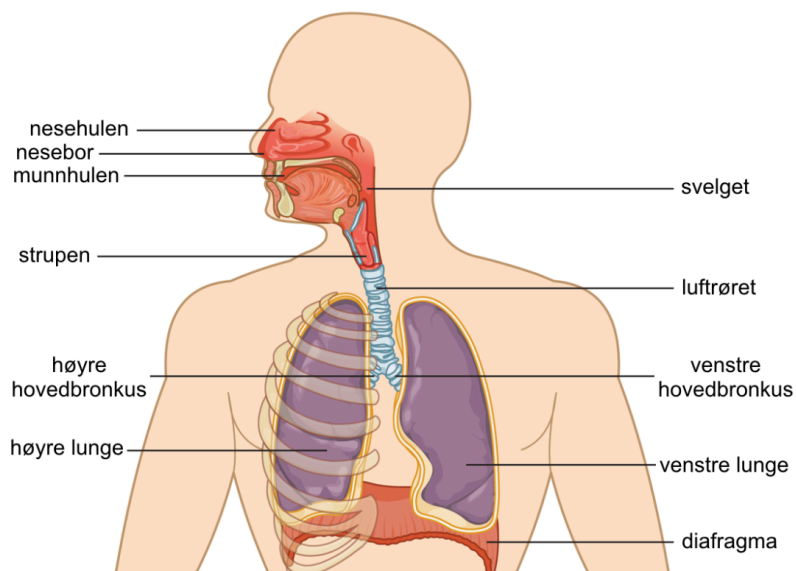
Masteroppgaven er en del av et prosjekt i regi av Norges Tekniske-Naturvitenskaplige Universitet (NTNU), campus Ålesund. Det praktiske arbeidet er utført i laboratorier ved Ålesund, institutt for biologiske fag. Oppgaven er en del av et større prosjekt hvor det overordnede målet er å studere virkemekanismen til sialinsyren Neu5Ac, i henhold til dets effekt på virus i humane neseepitelceller. Denne masteroppgaven utgjør en del av prosjektets hovedmål og er begrenset til å undersøke omfattende delmål:

- *Utarbeide prosedyre for RT-qPCR for deteksjon av HRV87*
- *Vurdere om RT-qPCR kan anvendes som metode for å måle HRV87 i in vitro cellekultur*
- *Undersøke innledende metoder som kan si noe om hvordan Neu5Ac påvirker in vitro cellekultur, med og uten HRV87 til stede.*
- *Undersøke om Neu5Ac tilsatt dyrkingsmedium påvirker replikasjon av HRV87 in vitro i neseepitelceller målt med RT-qPCR metode*

2 TEORI

2.1 Luftveiene

Respirasjonssystemet omfatter alle delene som bidrar i gassutveksling mellom kroppens celler og atmosfæren rundt oss og deles inn i øvre og nedre luftveier (**Figur1**). De øvre luftveiene består av nesen, munnhulen og svelget. Når kroppen er i ro så inhaleres luften via nesen som består av enlaget sylinderepitel med små hår kalt cilier. Dette fungerer filtrerende for mikroorganismer og andre partikler som kommer inn gjennom luften. Sylinderepitelet i nesehulen, også kalt respiratorisk epitel, har ikke bare cilier, men også slimproduserende celler. De slimproduserende begercellene utgjør kjertler som ligger inni mellom og delvis under sylindercellene i epitelet og gir en klisterfunksjon til ciliene. Disse mekanismene danner første forsvarsrekke tilhørende immunforsvaret ((Crystal, Randell, Engelhardt, Voynow, & Sunday, 2008),(Button et al., 2012), (Olav Sand, 2006)). Blodårer i nesehulen bidrar til at luften som inhaleres blir varm og fuktig noe som øker slimhinneoverflaten og bremser luften som gjør det enklere å filtrere uønskede partikler (Olav Sand, 2006). Nesehulen og munnhulen møtes i svelget som består av robust flerlaget plateepitel. Fra svelget går det videre over i spiserøret og luftrøret (Olav Sand, 2006).



Figur. 1 Oversiktsbilde av respirasjonssystemets overordnede anatomi og de ulike organene som inngår i både øvre og nedre del av luftveissystemet. Bildet er hentet fra (Miland, 2020)

Luftrøret representerer starten på det som defineres som de nedre luftveiene og er bygget opp av elastisk brusk som gjør det mulig å inhalere og ekstrahere luft uten problemer. Baksiden av

luftrøret består av glatt muskulatur som skaper avstivende effekt som gjør at respirasjonssystemet uten problemer kan regulere mengden luft som tas inn, alt etter behov. Luftrøret er dekket av respiratorisk epitel, hvor flere hundre celler er dekket med cilier ((Olav Sand, 2006), (Burdett & Mitchell, 2011)). Ciliene beveger seg slik at slim jobbes nedover i systemet til svelget ((Olav Sand, 2006), (Button et al., 2012)). Også her danner begercellene en slimet overflate som skaper hindring for uønskede partikler å skulle feste seg ((Olav Sand, 2006), (Furlow & Mathisen, 2018)). Luftrøret forgrener seg nedover i høyre og venstre hovedbronkus som går til henholdsvis høyre og venstre lunge. Bronkiene har forgreninger som et tre videre til bronkiolene. De respiratoriske bronkiolene forgrenes helt ut til utposninger i endene som kalles alveoler. Det respiratoriske epitelet dekker mesteparten av respirasjonssystemet; luftrøret, bronkus videre til bronkiene og deler av bronkiolene (Olav Sand, 2006). De viktigste cellene i bronkiene er celler med cilier, sekretoriske celler og basale celler. De minste bronkiolene før alveolene er ikke dekket med respiratorisk epitel som det overordnede, men er isteden kledd med enlaget kubisk epitel som mangler cilier og de slimproduserende evnene. Det kubiske epitelet består av et enkelt lag av clara-celler med mikrovilli og basallameller som er tykkere og har mindre overflate enn plateepitelcellene. Alveolene er det som skiller luften vi puster inn, fra blodet vårt. Alveolene er omgitt av et tett kapillærnett som består av endotelceller og en tynn basallamina. Veggen i alveolene består av enlaget plateepitel og spesialiserte epitelceller. Disse spesialiserte epitelcellene, også kalt type 2, danner surfaktant bestående av fosfolipider og proteiner som reguleres slik at alveolene skal tåle inspirasjon og ekspirasjon ((Olav Sand, 2006), (Crystal et al., 2008)).

2.2 Luftveisinfeksjon

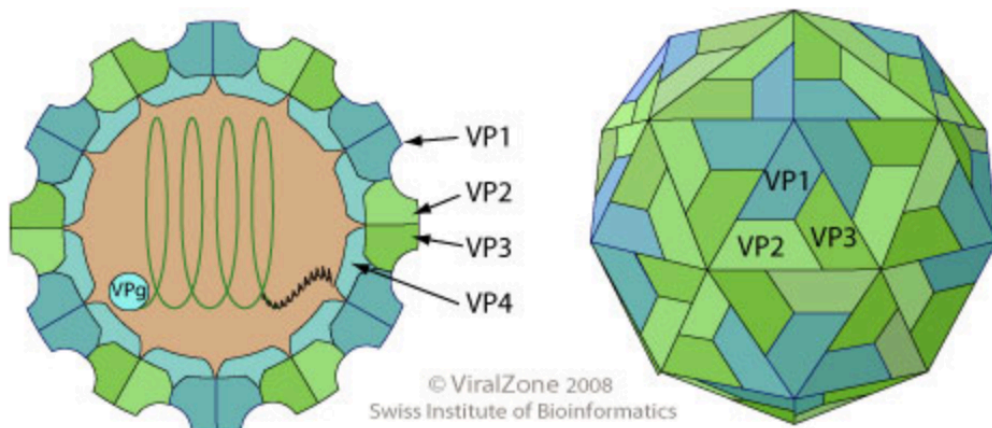
Influenzavirus, rhinovirus og koronavirus er de vanligste typene virus som gir luftveisinfeksjoner ((Heikkinen & Järvinen, 2003), (VanLeuven, Ridenhour, Gonzalez, Miller, & Miura, 2017), (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016)). Virus er avhengig av levende celler for å kunne formere seg og har spesielt to viktige livsoppgaver. Den første oppgaven er å ta seg inn i celler og lure kroppens egne mekanismer som er der til å beskytte oss. Sykdomsbildet virus skaper, henger sammen med evnen viruset har til å feste seg til cellereseptorer for så å komme seg gjennom cellemembranen og inn i cellenes cytoplasma (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016b). Den andre oppgaven er å gjennomgå replikasjon slik at de får kopiert arvematerialet sitt og produsert nødvendige proteiner som gir utgangspunkt for nye viruspartikler. proteinene som produseres under virusreplikasjon deles inn i strukturelle og funksjonelle proteiner. De strukturelle proteinene utgjør et kapsid som

omgir og beskytter viruset. Funksjonelle proteinene bidrar til næringsopptak og binding til nye celler (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016a). Forskjellige virusene tilhører ulike familier som har ulik fremgangsmåte for replikasjon. Avhengig av hvor og hvordan replikasjon til det enkelte viruset foregår, så trigges ulike deler av immunforsvaret (VanLeuven et al., 2017). Immunforsvaret og virus har ulike mekanismer som begge jobber mot hverandre (To, Yip, & Yuen, 2017). Virus med enkelttrådet RNA som arvemateriale kan unngå immunforsvaret ved å påvirke signaliseringen som styrer interferon produksjon, slik at den reguleres i favør av viruset. RNA virus koder ofte for molekyler som er dedikert til å hemme vertens naturlige forsvar (To et al., 2017). Immunforsvaret har en rekke mekanismer som iverksettes når den oppdager ukjente inntrengere. Celler som okkuperes av virus vil regulere seg selv og gjennomgå apoptose som fører til at cellen lyserer. Dette er for å regulere at virus ikke skal kunne gjennomgå reproduksjon og dermed hindre videre spredning, men denne cellelyseringen kan også føre til at virus spres lettere dersom de allerede har fullført replikasjonsyklus ((To et al., 2017), (Warner, Wiehler, Michi, & Proud, 2019)).

Replikasjonen starter ved at viruset fester seg til sialinsyre på celleoverflaten som fungerer som reseptor for opptak inn i cellen (Stencel-Baerenwald, Reiss, Reiter, Stehle, & Dermody, 2014), (Matrosovich, Herrler, & Klenk, 2015). Fra viruset tas inn i cellen, starter en avkledningsprosess hvor virus gjennomgår konformasjonsendringer slik at arvematerialet fristilles i cellens cytoplasma. Når arvematerialet er frigjort, så starter replikasjonsmaskineriet hvor polymerase leser og syntetiserer nytt RNA. I denne prosessen dannes også de strukturelle og funksjonelle proteinene ((Jacobs et al., 2013), (Fuchs & Blaas, 2010), (To et al., 2017)). Noen av de viktigste funksjonelle proteinene er 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C og 3D som alle har individuelle og avgjørende roller. Proteasene 2A og 3C dissosierer virale polyproteiner, mens 3D er den RNA avhengige RNA polymerasen (RdRp) som er avgjørende for selve oppkopieringen av genomet (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016c). 2B, 2C og 3A er forankringsproteiner mellom replikasjonskomplekser og membranstrukturen til vertscellen. 2B er i tillegg det proteinet som gjør det mulig at nye viruspartikler å bli frigitt fra vertscellen og spres (To et al., 2017). Humant rhinovirus kan gjennomgå replikasjon i epitelcellene i både øvre og nedre luftveier, men forekommer oftere i øvre del av respirasjonssystemet ((Jacobs et al., 2013), (Fuchs & Blaas, 2010)).

2.3 Rhinovirus

Slekten rhinovirus er en del av familien picornaviridae sammen med enterovirus og koronavirus, og klassifiseres innenfor genuset enterovirus. Rhinovirus er et nakent virus som har et positivt enkelttrådet RNA (ssRNA) som består av omtrent 7200 baser (Basnet, Palmenberg, & Gern, 2019). Det anses som et av de minste virusene med en diameter på cirka 30 nm ((Jacobs et al., 2013), (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016c), (Fuchs & Blaas, 2010)). Når rhinovirus beskrives som et nakent virus, betyr det at det ikke er omsluttet av en membrankappe, men at det likevel har et kapsid som utgjør en beskyttende icosahedral struktur. Kapsidet er satt sammen av de strukturelle proteiner VP1, VP2, og VP3 som danner såkalte groper med overflateegenskaper ((Jacobs et al., 2013), (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016c)). VP4 finnes under selve kapsid strukturen som vist i **Figur. 2** ((A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016c), (Silva et al., 2012), (Fuchs & Blaas, 2010)). Strukturen til disse proteinene og oppbyggingen til kapsidet gjør at disse gropene som befinner seg innad i strukturen, omgir en femfoldig symmetriakse hvor VP1 danner en ringformasjon. Hos rhinovirus så er disse gropene spesielt dype og utgjør stedet for cellereseptorfeste ((A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016c), (Fuchs & Blaas, 2010)).



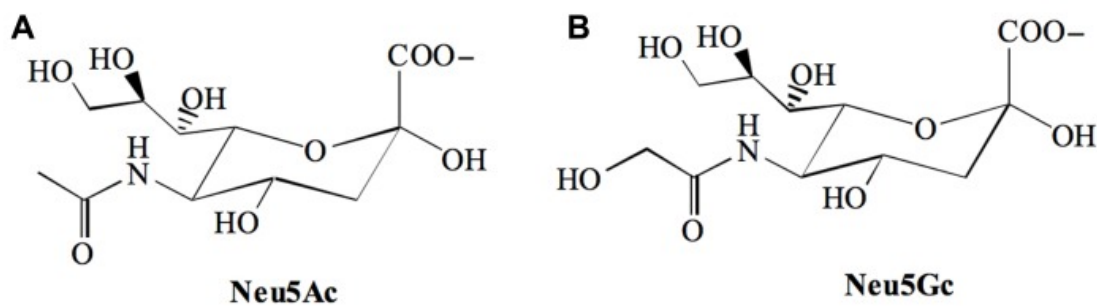
Figur.2 viser kapsid strukturen til rhinovirus. Illustrasjonen til venstre viser hvordan de strukturelle proteinene VP1, VP2, og VP3 sammen gir en grop dannelse på utsiden, mens VP4 ligger på undersiden av kapsidet. Illustrasjonen til høyre viser kapsidet sett ovenfra og hvordan strukturen gir VP1 ringformasjon vist som blå felt. Bildet er hentet fra (Viralzone, 2008).

Rhinoviruset har over hundre ulike serotyper som alle er undersøkt og omtalt. Disse serotypene deles inn, på bakgrunn av fylogenetiske kriterier, i rhinovirus A (HRV-A) og rhinovirus B (HRV-B) (Jacobs et al., 2013). De ulike serotypene deles også inn i ulike grupper på bakgrunn av spesifisiteten til ulike cellulære reseptoregenskapene. I tillegg finnes det enda en

gruppeinndeling som har likheter med både HRV-A og HRV-B, men som fristilles og karakteriseres som HRV-C ((FHI, 2010), (Jacobs et al., 2013), (Blaas & Fuchs, 2016), (To et al., 2017)). Alle de tre gruppene med rhinovirus bruker ulike glykoproteiner som reseptorer. HRV-A og HRV-B bruker intracellulære adhesjons molekyl 1 (ICAM-1), med unntak av utvalgte HRV-A. Noen av HRV-A typene bruker i stedet LDL (low-density lipid) som reseptor. HRV-C bruker CDHR3 (Cadherin-related family member 3) reseptor (Basnet et al., 2019). Av over 100 ulike typer rhinovirus skiller HRV87 seg ut fra de andre variantene ved at viruset verken bruker LDLR, ICAM-1 eller CDHR3 som reseptor. HRV87 bruker isteden sialinsyre som overflatereseptor på cellene ((Uncapher, Dewitt, & Colonno, 1991), (Liu et al., 2015), (Blomqvist, Savolainen, Råman, Roivainen, & Hovi, 2002)). Virusvarianten har vist stor diversitet som ikke er forenlig med andre humane rhinovirus. HRV87 har optimal vekst temperatur ved 33°C, men vokser også ved temperaturer opp mot 38 °C. Viruset er sensitiv til sure omgivelser og trives innenfor pH 6,0 – 8,0 ((Savolainen-Kopra, 2006), (To et al., 2017) , (Sun, Hu, & Yu, 2019)). På bakgrunn av dette viser HRV87 store ulikheter med andre rhinovirus, men flere likheter med enterovirus 68 (EVD68) og enterovirus 70. Som et resultat av dette er HRV87 omklassifisert til EVD68 ((Blomqvist et al., 2002), (Savolainen-Kopra, 2006), (To et al., 2017), (Liu et al., 2015), (FHI, 2015)).

2.3.1 Sialinsyre

Alle celler er omsluttet av en dobbel plasmamembran som beskytter mot påvirkninge fra ytre omgivelser. Denne cellemembranen består av fosfolipider, membranproteiner, glykolipider og glykoproteiner. Glykolipidene spiller en viktig rolle for interaksjoner mellom naboceller (Traving & Schauer, 1998). Glykolipidet gangliosid, består av oligosakkarider med en eller flere sialinsyrer festet til. Sialinsyre er en type negativt ladd sukkerart som finnes naturlig i membran til alle celler og er en viktig komponent som bidrar til slimdannelse i det respiratoriske epitelet i luftveiene ((Samraj, Läubli, Varki, & Varki, 2014), (Varki A, 2017), (Bruce Alberts, 2008c), (Varki, 2008)). Sialinsyre har en ryggrad bestående av ni karboner som presenteres som terminale monosakkarider i karbohydratdelen i glykolipider og glykoproteiner ((Varki, 2008) (Hegner, 2009), (Kooner, Yu, & Chen, 2019), (Bruce Alberts, 2008c)). Blant de vanligste molekylære artene av sialinsyre finner vi N-acetylneuraminsyre (Neu5Ac, også kalt NANA) og N-glykolylnuraminsyre (Neu5Gc) (Varki A, 2017). Det som skiller disse fra hverandre er at Neu5Gc har et ekstra oksygen i form av hydroksyl som befinner seg i N-glykolyl gruppen ved C-5 (**Figur.3**) og at denne varianten ikke finnes naturlig i mennesker ((Varki, 2008), (Takahashi et al., 2014), (Kooner et al., 2019)).



Figur. 3 Viser strukturene de to vanligste sialinsyren *N*-acetylneuraminic acid (*Neu5Ac*) og *N*-Glycolylneuraminic acid (*Neu5Gc*). Bildet er hentet fra (Freire-de-Lima et al., 2012)

Neu5Ac syntetiseres i cellers cytosol fra *N*-acetylmannosamine-6-fosfat og fosfoenolpyruvat til *Neu5Ac*-9-fosfat. Gjennom *CMP-Neu5Ac* syntase overføres cytidine monofosfat (*CMP*) fra cytidine trifosfat (*CTP*) som aktiverer *Neu5Ac*-9-fosfat til *CMP-Neu5Ac* i kjernen. Molekylet translokteres derifra til golgi eller ER ((Samraj et al., 2014), (Traving & Schauer, 1998), (Varki.A, 2009)). Herfra overfører enzymet silyltransferase *Neu5Ac* til et glykokonjugat. Sialinsyren gjennomgår modifikasjoner enten ved *O*-acetylering eller *N*-metylering før glykokonjugatet transporteres til celleoverflaten. Sialidase er et av de viktigste enzymene som kan fjerne og resirkulere sialinsyre rester som finnes i cytosol til nye glykokonjugater ved hjelp av lysosom ((Haines-Menges, Whitaker, Lubin, & Boyd, 2015), (Traving & Schauer, 1998), (Varki.A, 2009)). *N*-acylneuraminatlyase kan bryte ned sialinsyre til acylmannosamin og pyruvat ((Samraj et al., 2014), (Liu et al., 2015), (Traving & Schauer, 1998)). Syntese av *Neu5Ac* skjer gjennom det som kalles sialyltransferase-katalyserte reaksjoner ((Kooner et al., 2019), (Traving & Schauer, 1998)). Hvert trinn i denne prosessen krever forskjellige enzymer som gjør det til en kompleks prosess som også sier noe om viktigheten til glykokonjugatene ((Bruce Alberts, 2008a), (Varki.A, 2009)).

Gangliosidene som sialinsyre er festet til har negativ ladning som er en fordelaktig egenskap som bidrar til å beskytte mot lav pH og degraderende enzymer (Ghosh, 2020). Det er viktig at cellene gjennom celleadhesjon samhandler på en effektiv og rask måte for å kunne stå imot uønskede partikler som prøver å ta seg inn gjennom cellemembranen. Her har sialinsyre en viktig biologisk oppgave fordi proteinet lektin, som spiller en viktig rolle for celleadhesjon, gjenkjenner sialinsyre som sukkerart hos de enkelte cellene som er en fungerende korrespondanse for kommunikasjon mellom cellene ((Bruce Alberts, 2008c), (Bruce Alberts,

2008a)). Dette bidrar til bedre immunrespons og forhindrer forstyrrelser av viktige oppgaver i cellen. Noen ganger skaper glykolipider og glykoproteiner muligheter for uønskede partikler som virus ved at disse skaper binding for opptak til cellene ((Varki, 2008), (Bruce Alberts, 2008c)).

2.4 Behandling med sialinsyre

Det har de siste årene blitt gjort studier for å forstå mekanismene knyttet til sialinsyrens rolle for virusbinding til celler. Studier har blant annet undersøkt ulike aspekter ved virusopptak, med mål om å kunne hindre opptak og dermed unngå infeksjon. En studie har undersøkt påvirkning av vertens naturlige sialinsyre og påvirkning av reseptorbindingen til virus (Heida et al., 2021). Andre studier har sett på over-uttrykkelse av glykoproteiner på celleoverflaten som kan nedregulere infeksjonsforløpet (McAuley et al., 2017). I studien gjort av *Heida et al (2021)*, ble det undersøkt om inhalerende antivirale molekyler bestående av sialinsyre kunne hindre virus i å binde seg. Studien viste positive resultater, men var mangelfull rundt informasjon om hvilke konsekvenser endring av naturlig sialinsyren ville ha for andre biologiske funksjoner. Den samme studien undersøkte muligheten for å utarbeide molekyler som kunne binde seg til virus på samme måte som sialinsyren på cellene. Ved å skape en binding på denne måten kan virusreplikasjon og sykdomsforløp muligens hindres. Også dette aspektet virker oppløftende, men har ingen sikker eller fullstendig effekt så langt (Heida et al., 2021).

2.5 Metodisk teori

2.5.1 Deteksjon av virus

Virus kan detekteres direkte eller indirekte ved bruk av ulike analyse teknikker. De vanligste metodene for deteksjon av rhinovirus er bruk av plakkanalyser, ELISA og ulike PCR metoder. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) er en immunologisk metode som baseres på binding av proteiner. Metoden måler absorbans basert på binding mellom antistoffer og proteiner som avgir farge og anvendes ofte for å undersøke antistoff etter infeksjon (A. J. Easton & K. N. Leppard N. J. Dimmock, 2016a). Polymerase kjedereaksjoner (PCR) er den mest brukte metoden for virusdeteksjon (Do et al., 2010). Teknikken baseres på deteksjon av arvestoffet som viruset bærer med seg. De vanligste PCR metodene er RT-qPCR, multipleks PCR og nested PCR hvor RT-qPCR er metoden som brukes for deteksjon av virus med RNA som arvemateriale ((Xiaoyan Lu et al., 2008), (Dominguez et al., 2008), (Silva et al., 2012), (Gambarino et al., 2009)). Tidligere studier som har undersøkt mekanismene mellom virusopptak og sialinsyre har også benyttet RT-qPCR som metode for å kunne måle virus (Leung et al., 2012).

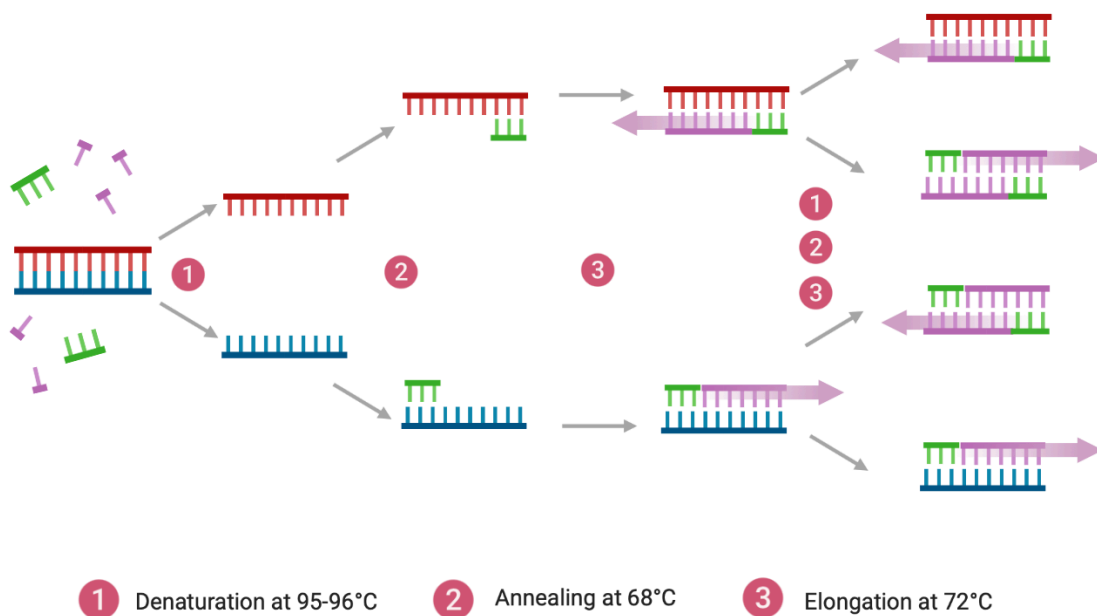
2.5.2 Virustiter for infeksjonsdose

TCID₅₀ (gjennomsnittlig virus infeksjonsdose) er en metode som angir mengde virus i en løsning som skaper 50 % CPE og brukes som en verdi som angir den mengden virus som har en gitt effekt på cellen. For å få denne verdien gjennomføres en test som baseres på å lage virusfortynninger fra virusstock som vurderes ved å se på endring i form av cytopatisk effekt (CPE). Et bestemt antall celler tilsettes brønner i en 96-brønn-plate (Corning®, Sigma Aldrich) sammen med dyrkingsmedium. Cellene inkuberes i ett døgn for å sikre at monolag med celler skal festes til underlaget før virusfortynninger tilsettes. Etter tilsatt virusfortynninger undersøkes cellene over en fire dagers periode for CPE, før testen avsluttes. Før cellene avleses fjernes medium fra brønnene, cellelaget vaskes og fargeløsning tilsettes. Avslutningsvis måles CPE basert på mengden fargeløsning som klarer å inkorporere cellene. målingen gjøres med en mikropateleser (Lei, Yang, Hu, & Sun, 2021).

2.5.3 Polymerase kjedereaksjoner

Polymerase kjedereaksjoner (PCR) er en *in vitro*, termosyklisk, teknologisk metode som har gjort banebrytende forskjeller innenfor bioteknologiske og molekylær biologiske områder. PCR er en sensitiv metode som hurtig og effektivt amplifiserer mengden nukleinsyre. Metoden

baseres på polymerase som naturlig kopierer selektive DNA sekvenser eksponentielt gjennom ulike temperaturregulerte trinn (**Figur.4**) ((Michael Madigan, 2015), (Lesk, 2017)). Det er flere komponenter som må optimaliseres for å kunne gjennomføre PCR, som valg av reagensmiks (mastermiks), primere og probe. Både design og konsentrasjon påvirker spesifisiteten til den analytiske metodikken (McKee, 2013). Også temperatur og andre tilsetningsstoffer som salter er avgjørende for gjennomførelse av PCR analyser ((Sambrook, 2019), (Lesk, 2017)).



Figur.4 Viser selve reaksjonsforløpet for PCR som deles inn i tre ulike trinn; annealing, elongering og denaturering. Et typisk PCR program gjennomføres i rundt 30-40 sykluser (Michael Madigan, 2015). Denne enzymatiske prosessen krever presisjon og effektivitet. Prosessen som skjer i en PCR-reaksjon gir en eksponentiell økning av DNA templatet, også kalt amplikon ((McKee, 2013), (Lesk, 2017)). Bildet er hentet fra Biorender.

2.5.3.1 Revers transkripsjon og kvantitativ PCR

For deteksjon og kvantifikasjon av RNA så må revers transkripsjons PCR gjøre RNA om til cDNA før kvantitativ PCR gjennomføres. Kvantitativ PCR gjennomføres med DNA, derfor må studier med RNA templat som utgangspunkt først gjennomgå revers transkripsjon. For genekspresjonstudier gjennomføres revers transkripsjons PCR (RT-PCR) før kvantitativ PCR (qPCR) som to individuelle metoder. For virusdeteksjon er det vanligere å kombinere disse metodene ((Adams, 2020), (X. Lu et al., 2008))

Revers transkripsjons PCR

For å kunne gjennomføre qPCR for et enkeltrådet virus må RNA gjøres om til stabilt DNA. Revers transkripsjons PCR med enzymet revers transkriptase (RT) brukes for å lage komplementær DNA (cDNA) fra RNA, og løser denne begrensningen til qPCR metodikken. cDNA syntese resulterer i at de to enkeltrådene separeres og danner en midlertidig RNA/DNA hybrid. For rent DNA tilsettes RNase H som hydrolyserer fosfodiesterbindinger (SigmaAldrich, 2016).

Kvantitativ PCR

qPCR er en kvalitativ / kvantitativ metode hvor små mengder nukleinsyre kan kvantifiseres direkte. qPCR måler DNA optisk ved bruk av et fluorescerende signalnivå som representerer mengde templat som amplifiseres (Baker, 2012). Denne typen analyse forbedrer den dynamiske rekkevidden ved deteksjon, sammenlignet med tradisjonell PCR siden avlesningen gjøres direkte (real-time) (Chauhan, 2020). Metoden brukes for å vurdere resultater som absolutte eller relative verdier. For absolutte verdier lages en standardkurve basert på templatet som brukes for å lese av mengde templat i videre prøver. For relativ kvantifisering gjøres en sammenligning mellom målte prøve mot en referanseprøve (Yuan, Reed, Chen, & Stewart, 2006).

2.5.3.2 RT- qPCR

Kvantitativ revers transkripsjon real time PCR (RT-qPCR) er en amplifiseringsmetode utarbeidet for å kombinere RT-PCR og qPCR. Metodikken er ofte brukt for å undersøke genekspressjon, patogendeteksjon og sykdomsforskning. Denne analysemetoden gjør deteksjon og kvantifisering enkelt og effektivt ((Gambarino et al., 2009), (McMeen et al., 2008), (Adams, 2020)). RT – qPCR kan gjennomføres som en to stegs analyse hvor RT – PCR gjennomføres først for å sikre korrekt templet før qPCR. Dette er den mest brukte metoden ved genekspressjons analyser (Larionov, Krause, & Miller, 2005). For virusdeteksjon gjennomføres analysen i et enkelt steg hvor alle reagensene tilsettes samme brønn og omgjørelsen fra RNA til DNA skjer internt ((Sedlak, Nguyen, Palileo, Jerome, & Kuypers, 2017), (Adams, 2020), (Wacker & Godard, 2005)).

Mastermiks

I mastemiksen til ett-stegs analyser finnes alle reagenser nødvendig, utenom primere og probe som må tilsettes eksternt. For å forbedre analysens presisjon kan referanse dye tilsettes

mastermiksen. ROX er et eksempel på en slik referanse dye som fungerer som en intern kontroll. Ved bruk av ROX vil analysen bedres ved å redusere forskjellen mellom brønnene i plate oppsettet. På denne måten reguleres variasjoner mellom relikater som potensielt kan påvirke fluorescens avlesningen (Signagen, 2019).

Primer design

Primere er små nukleotidsekvenser, også kalt oligonukleotider som binder seg til DNA. PCR reaksjonsvolumet tilsettes både forward primer (FWD) og revers primer (RWD) som hybridiserer målsekvensen. Med andre ord definerer sekvensen som skal amplifiseres. Ofte så er forholdet mellom disse primerne ulikt for å unngå bakgrunnsstøy og hindre dannelse av primer-dimer (SenGupta & Cookson, 2010).

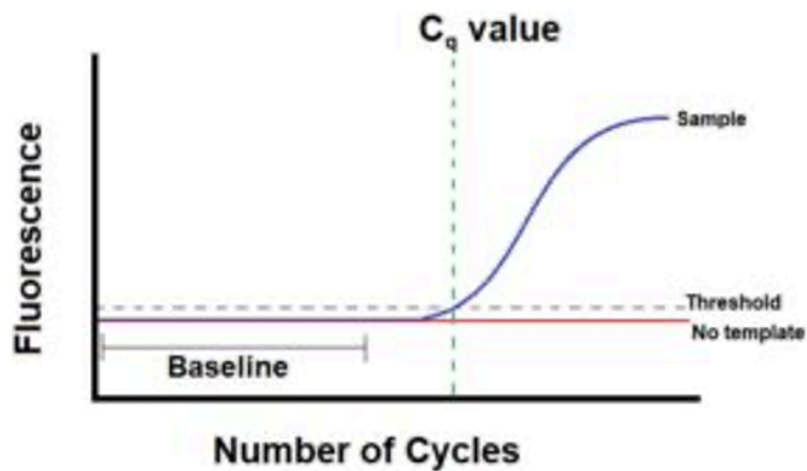
Hydrolyse probe

Hydrolyse probe er en primer sekvens som har to lyssignaler festet til seg, en lysquencher og en fluoreserende dye kalt reporter. Proben kan også ha minor groove binding (MGB) som sammen med quencheren bidrar til å øke spesifisiteten til analysen ved å redusere sannsynligheten for uspesifikk binding. MGB er festet i 5'enden sammen med reporteren, mens quencheren er festet i 3'enden på proben ((Afonina, Reed, Lusby, Shishkina, & Belousov, 2002), (Kutyavin et al., 2000)). Proben fester seg sammen med nukleotidprimerne og amplifiserer begge DNA trådene i 5'til 3'retning for den avslutningsvis spaltes av ved fullført syntetisering. Når polymerase transkriberer så vil nukleaseaktiviteten spalte proben som fører til energioverføring i form av fluorescerende lyssignaler. Det fluorescerende signalet vil øke eksponentiell med mengden templat som amplifiseres ((Didenko, 2001), (Kutyavin et al., 2000), (Afonina et al., 2002), (Christian A.Heid, 1996)).

Dataanalyse

Selve analysen deles inn i tre faser som starter med initieringsfasen, eksponentiell fase og platåfase. I den eksponentielle fasen avgis økende mengde fluorescens i takt med amplifiseringen av templatet. For deteksjon ved RT – qPCR settes terskelverdi til en gitt mengde DNA. Så fort signalnivået fra amplifiseringen overstiger terskelverdi, så registreres C_t -verdi for en prøve (**Figur.5**)(Adams, 2020). C_t -verdi angir antall sykluser før den aktuelle målsekvensen registreres. Det betyr at høy C_t -verdi reflekterer mindre mengde av målgenet,

mens lavere C_t -verdier indikerer stor mengde målgen. Det er vanlig å vurdere C_t -verdier over 30 som negative verdier (Tom & Mina, 2020).



Figur. 5 Forklarer C_t -verdi som registreres som signalnivå høyere enn terskelverdi. X-aksen representerer tid i form av antall sykluser før verdi registreres og y-aksen representerer det fluorescerende lyssignalet som blir økende i den eksponentielle fasen hvor proben spaltes. Baseline representerer initieringsfasen, etterfulgt av eksponentiell fase som starter ved C_q registret og avslutningsvis platåfase som vises som flat kurve ved slutten av analysen. Bildet er hentet fra (BiteSizeBio, 2020).

2.5.4 MIQE retningslinjer og kvalitetssikring

MIQE retningslinjer henviser til en felles standard som benyttes i arbeid med å etablere nye PCR metoder. For utarbeidelse av RT-qPCR er det avgjørende at metoden valideres basert på sensitivitet, spesifisitet, presisjon og effektivitet. Sensitivitet beskriver evnen metoden har til å kunne identifisere virus selv ved lave konsentrasjoner. Det er også avgjørende at metoden kan gi nøyaktige svar ved repeterende analyser gjort fra samme prøve. Når replikater fra samme prøve får tilnærmet like verdier, sier dette noe om den analytiske følsomheten. Spesifisitet reduserer falske positive svar ved å begrense deteksjon utover målsekvensen og her proben spiller en avgjørende rolle. Probens evne til å amplifisere målsekvensen og ikke andre sekvenser er avgjørende for å kunne utelukke prøver som er falske negative. Mens presisjon vurderes ved å gjennomføre samme analyse i en kjøring for å se på variasjonen mellom prøvepunktene. Variasjon mellom samme prøve vurdert over flere kjøringer kalles interassay variasjon, mens samme prøve satt opp som med flere replikater i samme kjøring kalles intraassay variasjon. Valideringsparameterne evalueres med utgangspunkt i valg av reagenser, optimalisering av primer og probe, og etablering av standardkurve. Standardkurvens R-verdi og slope gir informasjon om metodens robusthet og effektivitet. For å vurdere effektiviteten til

RT – qPCR ser man på amplifiseringen av målgenet. For hver syklus (n) skjer en oppkopiering. For 100 % effektivitet er det ønskelig at for hver syklus skal amplifiseringen gi (2n) kopier. Ideell kopiering, altså 100 % effektivitet, i RT – qPCR gir slope mellom -3,3 og -3,8. Samtidig er det avgjørende at $R^2 > 0,99$ for god effektivitet. Standardkurve gjør det mulig å kunne kvantifisere ukjente mengder prøve ved å lese av kurven direkte. Ved denne typen metode blir standardkurven brukt for å sette deteksjonsgrense for den analytiske sensitiviteten (Bustin et al., 2009).

Qubit 4.0 brukes som et verktøy for å måle RNA konsentrasjon. Instrumentet har et deteksjonsområde på mellom 12,5 µg/ml til 5 mg/ml (Scientific). Qubit brukes i dette arbeidet som et trinn mellom RNA ekstraksjon og PCR (data ikke vist). Ved å gjøre dette kontrolleres tilstedeværelsen av RNA etter gjennomført ekstraksjon som er viktig før man starter på jobben med å sette opp PCR.

2.5.5 Beregninger

TCID₅₀ tar utgangspunkt i virusstock og utarbeidelse av fortynningsrekke fra denne. For hver fortytning så beregnes prosent antall infiserte brønner. Beregningen av denne testen tar utgangspunkt i formelen;

$$\frac{A-50\%}{A-B} = PD$$

A = fortytningen med rett over 50% infiserte brønner.

B = den neste fortytningen fra A

PD står for den proporsjonale distansen.

Ved å slå sammen verdiene fra laveste fortynningsverdi over 50 % og PD verdien får man den faktiske TCID₅₀ verdien hvor mer enn 50 % har CPE.

TCID₅₀ = (log10 verdi for siste over 50 % i fortynningsrekken) + (PD x (- log av fortynningsfaktoren)).

Fra RT – qPCR avleses C_t-verdi. For å se på relativ endring målt med RT-qPCR brukes C_t-verdiene fra analysetidpunktene.

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ formelen.

Alle prøver er gjennomført i biologiske paralleller med tekniske replikater og må derfor regnes om til gjennomsnittlig C_t-verdi (C_t mean) (Livak & Schmittgen, 2001).

Gjennomsnittlig C_t-verdier beregnes:

$$\mu = \frac{\sum x}{n}$$

$$\Delta C_t \text{ 10fold} = \mu_1 (C_{t1}) - \mu_2 (C_{t2})$$

$$\Delta C_t \text{ mean} = \frac{x * \Delta C_t \text{ 10fold}}{x}$$

Metodens effektivitet beregnes: (Qiagen, 2010):

$$\% \text{ effektivitet} = (10^{(-1/S)} - 1) * 100.$$

Standardavvik sier noe om forskjellen mellom gjennomsnittlig verdi og opprinnelig verdi.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \mu)^2}{n - 1}}$$

Variasjonskoeffisient for de enkelte prøvene (CV) beregnes:

$$CV = \frac{s}{x} * 100 \%$$

Mens for en større gruppe prøver brukes formelen:

$$C = \frac{\sigma}{\mu} * 100 \%$$

For å undersøke om det er signifikant forskjell mellom prøver beregnes:

$$T_{\text{obs}} = (|x^A - x^B|) / \sqrt{(1/n_A + 1/n_B)}$$

$$s = \sqrt{(((n_A - 1) * s_A^2)) + (((n_B - 1) * s_B^2)) / (n_A + n_B - 2)}$$

2.5.6 *In vitro* celledyrking

In vitro celledyrking gir utgangspunkt for å kunne studere normal vekst i cellekultur og for virus kultivering. For å undersøke effekten av Neu5Ac på epitelceller, med og uten virus til stede så gjennomføres *in vitro* celledyrking. Arbeid med rene cellekulturer gjennomføres i eget sterilisert, avgrenset område for å oppnå stabile mengder med prøvemateriale. Arbeide forekommer alltid i LAF-benk (SAFE 2020, Thermo Scientific) med laminær luftstrøm. Den laminære luftstrømmen sammen med UV-behandling og desinfisering hindrer kontaminering fra ytre omgivelser. Celler fra ulike organismer isoleres og dyrkes videre i cellekultur. For *in*

in vitro celledyrking brukes et bufret dyrkingsmedium hvor pH verdien er kritisk for at cellene skal kunne vokse og dele seg.

Ulike cellelinjer har ulikt antall cellesplittings, også kalt passasjer. Cellelinjer kan enten vokse adherent hvor de fester seg til underlaget de vokser på eller i flytende kultur. Ved arbeid med cellelinjer som vokser adherent kreves splittings ved konfluens > 80 %. Konfluens vurderes ved å studere cellekultur i mikroskop for å vurdere mengde og morfologi. Dersom konfluensnivået overstiges vil ikke cellene ha tilstrekkelig tilgang til næring fra kulturmediet, som krever at kulturen må gjennomgå cellesplitting. Uavhengig om man arbeider med adherent eller flytende cellekultur så krever cellesplitting at man arbeider effektivt og sterilt (SigmaAldrich, 2021a). I utvalgte situasjoner velger man å telle antall celler ved hjelp av tellekammer. Dette gir en oversikt på fordelingen av levende og døde celler i en kultur. Arbeid med celler forbeholder at de naturlige egenskapene til cellene opprettholdes gjennom korrekt bruk av vekstmedium og vekstbetingelser som temperatur og gassblanding. Kun på denne måten kan *in vitro* celledyrking bidra innen forskningsprosjekter ((Britannica, 2019, February 18), (Sauer et al., 2014), (Karen N. Barnarda, 2019)).

2.5.7 Levedyktighetsassay

Metyl Thiazolyl Difenyl-tetrazolium bromid (MTT) assay brukes for å bedre forstå levedyktigheten og proliferasjon til cellene. Testen baseres på farging med MTT som spaltes til formazan av levende celler. Mengden formazan er proporsjonal med mengde levende celler som måles med mikroplateleser. Celler fordeles i brønner i et 96--oppsett og inkuberes i 24 timer før MTT reagens tilsettes. Dette gjøres for å sikre tilstedeværelse av celler for å kunne gjennomføre testen (Terry L Riss, 2013).

2.5.8 Flowcytometri

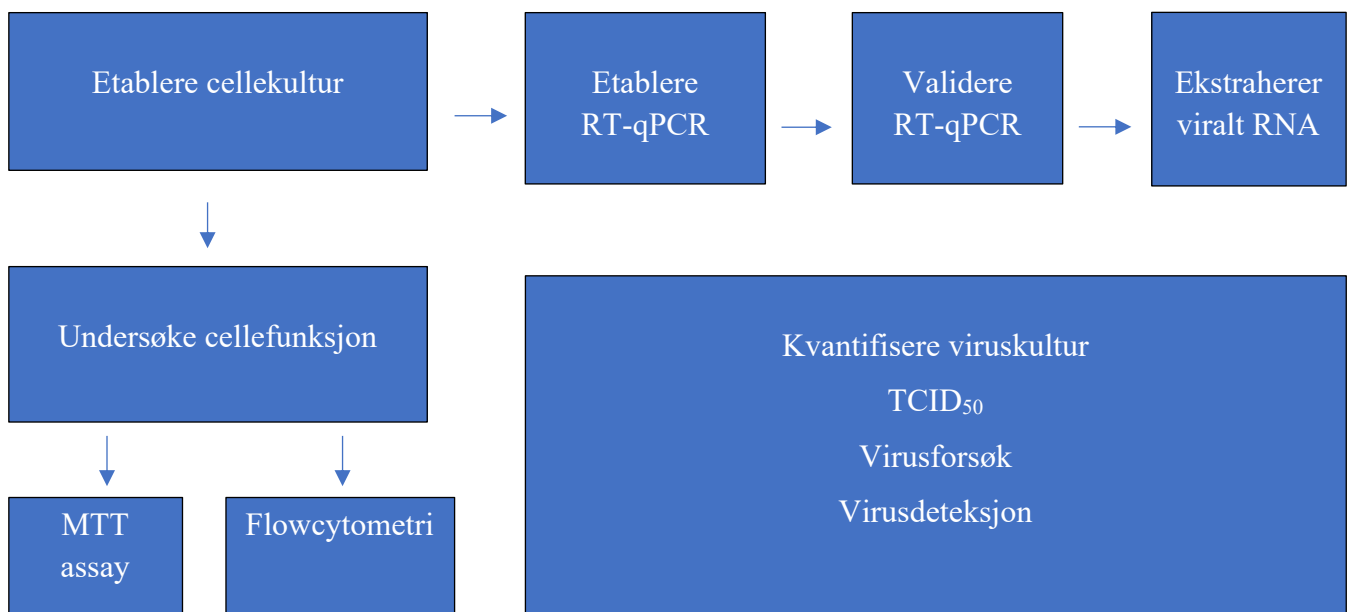
Flowcytometri er en kvantitativ metode som baseres på et instrument som kan telle enkeltceller. Denne metodikken er et godt verktøy for å vurdere cellers proliferasjon. Flowcytometri måler fluorescens merkede celler i en suspensjon ved hjelp av en illuminator med lysstråler. Celler som undersøkes på denne måten sorteres og registreres som enkelte celler, som videre emitteres som lys ved ulike bølgelengder og fanges opp av en detektor (Bruce Alberts, 2008b), (Bruce Alberts, 2008e)). Ved hjelp av flowcytometri kan man undersøke cellers proliferasjon (mitose) *in vitro*. På denne måten kan man bedre forstå cellers evne til å gjennomgå celledeling, som

sier noe om cellenes kapabilitet (Bruce Alberts, 2008d). I denne sammenhengen brukes flowcytometri for å undersøke cellenes proliferasjon ved tilstedeværelse av sialinsyre (Müller & Nebe-von-Caron, 2010).

3 MATERIALER OG METODER

Eksperimentell design

Figur.6 er en skjematisk oversikt over laboratoriearbeidet relatert til oppgaven.



Figur6 Illustrerer arbeidsflyten som prosjektet er bygd opp rundt.

Den eksperimentelle delen av dette arbeidet inkluderer en rekke metoder med tilhørende reagenser og instrumentbeskrivelse. For informasjon om komplett utstyrliste, se **Vedlegg.1**. MIQE retningslinjer (**Vedlegg.2**) henviser til en felles standard for PCR metoder, som også benyttes i dette arbeidet for utarbeidelse av RT-qPCR for HRV87 deteksjon.

3.1 Virus

Humant rhinovirus 87 (Enterovirus D68, F02-3607 Corn (Corn-1963) (ATCC® VR-1197™)/ Human Rhinovirus 87) kommersielt tilgjengelig gjennom ATCC kultursamling ble benyttet i alle forsøk inkludert i denne studien. Forseglet vial med 1 ml HRV87 (ATCC® No VR-1197™) ble kultivert i A549 celler *in vitro* (**Vedlegg.3**). Etter mottak av virusvial, ble 800 µl overført fra vial til et 15 ml sentrifugerør (falcon) med 2,0 ml dyrkingsmedium Dulbecco's modified

Eagle's minimal essential medium F-12 nutrient Mixure (Ham) ((DMEM/F-12) Gibco) tilsatt 10 % fetal bovint serum (FBS) og 1 % Antibiotic Antimycotic (AA (Gibco)). Virussuspensjon ble homogenisert med medium ved hjelp av rolig pipettering. 9 ml kulturmedium ble overført til to 15 ml sentrifugerør (falcon). 1 ml virusblanding ble tilsatt hvert sitt 15 ml sentrifugerør som ga et sluttvolum på 10 ml. To 25 cm² celleflasker (VWR®) ble gjort klar til viruskultivering ved å fjerne gammelt medium, vaske monolaget med 5 ml romtemperert 1x DPBS, og deretter tilsette 10 ml virusblanding til begge celleflaskene. Celleflaskene ble plassert i inkubasjonsskap (BINDER) ved 33 ° for kultivering av HRV87 kulturen, etter anbefaling fra leverandør (ATCC/ Germany).

Alt arbeid med virus har foregått i LAF-benk (SAFE 2020, Thermo Sientific), et område adskilt fra alle andre utførelser, for å minimere risikoen for krysskontaminering. Innarbeidede rutiner på transport av prøver med virus inn og ut av laboratoriet for gjennomførelse av sentrifugering og isolering av RNA, har vist seg å være svært effektivt. Retningslinjene som har blitt fulgt har vært i direkte tråd med retningslinjene som helsedirektoratet jobber under. For dekontaminering av overflate og komponenter ut og inn av benken har det blitt brukt 85 % etanol. Samtidig har arbeidsområde, brukt utstyr og avfall i kontakt med virus blitt behandlet med UV-lys og deretter autoklavert i 15 minutter ved 121 °C for å være sikker på at alle kontaminanter ble destruert før det har blitt kastet i risikoavfall.

3.2 Virusstock

HRV87 ble anvendt for etablering av RT-qPCR med utgangspunkt i virusstock som ble laget ved å kultivere HRV87 *in vitro* beskrevet i avsnitt 3.1 *Virus*. 1 ml HRV87 ble kultivert i A549 celler (90 % konfluens) i 25 cm² celleflaske (VWR®) med 10 ml DMEM/F12 cellemedium tilsatt 10 % FBS og 1 % AA. Etter 72 timer ble tilnærmet 100 % CPE og celleflaskens innhold ble overført til et 15ml sentrifugerør, sentrifugert i 10 minutter ved 2500 x g (SL 40 Centrifuge, Thermo Scientific™) og 1 ml supernatanten ble fordelt i 2,0 ml kryorør (Corning®, Sigma Aldrich) med glyserol som utgjorde 20%. Alikvotene med virusstock ble lagret ved -80°C inntil videre bruk.

3.3 TCID₅₀ for infeksjonsdose

To vialer med virusstock (1,0 ml) ble tatt ut fra -80 °C og tint. Innholdet fra begge de to vialene ble overført til et 4,0 ml rør (VWR®) (10⁰). Åtte 4,0 ml rør med 3,6 ml dyrkingsmedium ble klargjort og merket henholdsvis etter fortynningsrekken fra 10⁻¹ og til og med 10⁻⁸. Fra virusstock ble 400 µl virus overført til første fortynning. Løsningen ble blandet ved pipettering for å sikre homogenisering før 400 µl fra 10⁻¹ ble overført til neste rør (10⁻²). Denne fremgangsmåten ble anvendt for de videre fortynningene. Når fortynningsrekken var klar, ble 96-brønn-plate (Corning®, Sigma Aldrich) tatt ut fra inkubasjonsskapet og rad 3 til og med 11 ble pipettert av brettet (200 µl) (**Figur.7**). Deretter ble de ulike fortynningene tilsatt de ulike radene i brettet. 200 µl av hver fortynning ble tilsatt i brønner før platen ble plassert ved 33 °C for inkubasjon. Resterende mengde fra de ulike fortynningene av virusstock ble plassert i -80 °C for bevaring. Etter fire døgn ble medium i brønnene fjernet, og cellene ble vasket ved å tilsette 100 µl 1x DPBS og fiksert ved å tilsette 50 µl metanol som fikk virke i ett minutt. Metanol ble pipettert av før 0,1 % fargeløsning (crystal violet, Sigma Aldrich) ble blandet med destillert vann til 100 µl. Løsningen fikk virke i 20 minutter før cellene ble vasket og målt med en mikroplateleser (Multiskan® GO, Thermo Scientific, 570 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kontroll		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Blank
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Figur.7 viser plateoppsett for TCID₅₀ test i et 96-plate-oppsett hvor de enkelte fortynningene er representert som kolonnene. Kolonne 1 og 2 inneholdt ren cellekultur som vekstkontroll og kolonne 12 beskrevet som blank inneholdt rent medium.

3.4 Ekstrahering av viralt RNA

Viralt RNA ble ekstrahert ved bruk av RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN/ Germany) i henhold til produsentens prosedyre, se **Vedlegg.4**. 70 % etanol ble laget fersk til hver ekstraksjon. 100 µl virusløsning ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør og tilsatt 350 µl RLT buffer for lysering. Løsningen ble homogenisert ved hjelp av vortexmikser og tilsatt likt volum 70 % etanol (450 µl). Løsningen ble overført til steril RNeasy spin-kolonne og sentrifugert i 15 sekunder ved 8000 x g. RW1 buffer og RPE buffer ble tilsatt i henhold til prosedyre. Etter vasketrinn ble kolonnen overført til nytt 1,5 ml rør før 40 µl RNasefritt vann ble tilsatt for å eluere RNA ved å sentrifugere 1 min ved 8000 x g. Prøvene ble lagret ved -80 °C for å bevare kvaliteten til RNA.

3.5 Kvalitetsmålinger

Qubit 4.0 (Invitrogen) ble anvendt til å måle tilstedeværelse av RNA etter ekstraksjon. Qubit fluorometeret ble kalibrert med to punkts- kalibrering i henhold til prosedyre, se **Vedlegg.5**. 10 µl RNA ble blandet med 190 µl working solution og målt i ng/ ml.

3.6 Etablering av RT-qPCR

Ett-steps RT-qPCR ble gjennomført i 15 µl reaksjonsvolum med mastermiksen 2X qScript XLT one-step RT-qPCR ToughMix, low ROX (Quantabio), 200-600 nM FWD og RWD primer, 200-600 nM hydrolyse MGB probe og nukleasefritt vann til å justere volum. Primerne og probe er spesifikke for denne analysen (**Tabell.1**). Første analysetest for å vurdere RT-qPCR assayets funksjonalitet ble gjennomført med RNA ekstrahert direkte fra virusstock med primer og probe konsentrasjon satt til 10µM. Analysen ble gjennomført med åtte tekniske replikater og to kontrollprøver uten templat (NTC) (**Tabell.2**). Primer og probe hadde konsentrasjon 10 µM.

Tabell.1 Oversikt over primersekvensene (5'-3') og probe sekvens som har blitt brukt spesifikt for deteksjon av HRV87 i utarbeidet RT-qPCR assay.

Type	Sekvens 5'-3'	Modifikasjoner	Forhandler
MGB probe	TCC AAA TCT CGC ATT GAA CCG GT	6-FAM MGBNFQ	Applied Biosystems UK
HRV87 (RWD)	TCC TGG GGA GCC GTG TAT TA	-	Invitrogen
HRV87 (FWD)	TAC GCA CCA CTT TAC GCA GT	-	Invitrogen

Tabell.2 Viser de enkelte komponentene som ble pipettert i brønner ved etableringen av RT-qPCR hvor funksjonaliteten til reagensene ble testet.

Komponenter	Mengde per reaksjon (µl)
Mastermiks	7,5
FWD primer	0,4
RWD primer	0,4
Probe	0,2
RNA	1,0
RNase fritt vann	5,5

3.6.1 Primer optimalisering

Primerne er designet gjennom primer design programmet i NCBI, se **Vedlegg.6**. Dette programmet er tilgjengelig via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Stockløsninger av primere ble fortynnet fra 100 µM til 10 µM med nukleasefritt vann. Alikvoter med 100 µl forward primer (FWD) og 100 µl revers primer (RWD) ble fordelt på separate 200 µl rør, og fryst ved -20°C. Optimalisering av primer konsentrasjon ble gjennomført i henhold til **Tabell.3**. Både symmetriske og asymmetriske primerkonsentrasjoner ble testet. 400 nM hydrolyse MGB probe ble brukt som standard konsentrasjon for alle oppsettene med primer konsentrasjoner. Reagensene ved primeroptimalisering er presentert i **Tabell.4**.

Tabell.3 Viser oppsettet for optimalisering av primer konsentrasjon hvor FWD konsentrasjoner er presentert på raden øverst og RWD nedover langs kolonnen. De ulike fargegraderingene representerer de ulike konsentrasjonene som ble undersøkt.

	200 nM		300 nM		400 nM		500 nM	
200 nM	200/200	200/200	300/200	300/200	400/200	400/200	500/200	500/200
300 nM	200/300	200/300	300/300	300/300	400/300	400/300	500/300	500/300
400 nM	200/400	200/400	300/400	300/400	400/400	400/400	500/400	500/400
500 nM	200/500	200/500	300/500	300/500	400/500	400/500	500/500	500/500
600 nM	200/600	200/600	300/600	300/600	400/600	400/600	500/600	500/600
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	
	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC			

Tabell.4 Viser sammensetningen av mengde reagenser som ble pipetters i de enkelte brønnene for primer optimalisering.

Komponenter	Mengde per reaksjon (μ l)
Mastermiks	7,5
FWD primer	200 – 600 nM
RWD primer	200 – 600 nM
Probe	400 nM
RNA	1,0
RNase fritt vann	varierende

3.6.2 Probe optimalisering

Hydrolyse proben ble fortynnet fra 100 μ M til 10 μ M på samme måte som primerne. Alikvoter med 50 μ l probe ble fordelt i 200 μ l rør for oppbevaring i -20°C. Basert på optimalisering av primer konsentrasjoner ble to asymmetriske kombinasjoner av primer til videre optimalisering av probe konsentrasjon vist i **Tabell 5**. Reagensene som ble testet for denne optimaliseringen er vist i **Tabell.6**.

Tabell.5 Viser optimaliseringen av probe konsentrasjon, et utvalg probe presenteres øverst i tabellen. De enkelte konsentrasjonene er satt opp sammen med de utvalgte primer konsentrasjonene.

100 nM		200 nM		300 nM		400 nM		500 nM	
200/300	200/300	200/300	200/300	200/300	200/300	200/300	200/300	200/300	200/300
300/400	300/400	300/400	300/400	300/400	300/400	300/400	300/400	300/400	300/400
NTC		NTC		NTC		NTC		NTC	
NTC		NTC		NTC		NTC		NTC	

Tabell.6 Viser sammensetningen av mengde reagenser som ble pipetters i de enkelte brønnene ved optimalisering av probe konsentrasjon.

Komponenter	Mengde per reaksjon (µl)
Mastermiks	7,5
FWD primer	200 – 300 nM
RWD primer	300 – 400 nM
Probe	200 – 500 nM
RNA	1,0
RNase fritt vann	varierende

3.6.3 Assay validering

For å validere metoden ble standardkurve med utgangspunkt i fortynningsrekke fra ufortynnet virusstock (10^0) laget. Virusstock ble fortennet i en 10-fold-fortynning til 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} og 10^{-5} . Fortynningene ble pipetert i duplikater på to ulike analysebrett for PCR. Standardkurven ble utarbeidet ved å sette opp C_t -verdier mot konsentrasjon for de enkelte fortynningene. På denne måten ble en lineær kurve generert hvor laveste konsentrasjon ble satt som deteksjonsgrense (LOD) for denne studien. **Tabell.7** viser sammensetningen av reagenser tilsatt i brønner på 96-plate oppsett for de enkelte fortynningene.

Tabell.7 viser sammensetningen av mengde reagenser som ble pipetters i de enkelte brønnene på PCR plate oppsett for standardkurvene

Komponenter	Mengde per reaksjon (µl)
Mastermiks	7,5
FWD primer	300 nM
RWD primer	400 nM
Probe	300 nM
RNA	1,0 (1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000)
RNase fritt vann	2,6

3.7 HRV87 RT-qPCR assay

RT q-PCR reaksjonene ble utarbeidet i samsvar med anbefalt prosedyre fra produsent av reaksjonsmiksen fra Quantabio. Noen endringer ble gjort i forhold til prosedyrens anbefalte totalt volum for PCR reaksjonene, og det ble gjennomført optimaliseringsforsøk for å undersøke hvorvidt mengde primer og probe var nødvendig for tilstrekkelig amplifisering av RNA. **Tabell.8** viser innholdet i PCR reaksjonene etter optimaliserte forsøk.

Tabell.8 Viser sammensetningen av mengde reagenser som ble pipetters i de enkelte PCR reaksjonene.

Komponenter	Mengde per reaksjon (µl)
Mastermiks	7,5
FWD primer	0,9
RWD primer	1,2
Probe	1,8
RNA	1,0
RNase fritt vann	2,6

Mastermiksen one-step RT-qPCR ToughMix® med low ROX™ (95134-500, Quantabio, Beverly, USA) ble brukt kontinuerlig gjennom studien. Reagensene ble pipettert i MicroAmp Fast 96-brønn reaksjons plate (0,1 ml, Applied Biosystems). Platene ble forseglet med adherent film (MicroAmp optical Adhesive Film, Applied Biosystems) for å sikre at reaksjonsvolumet ikke fordampet i instrumentet. Brettene ble plassert i en plate spin 2 sentrifuge fra (Thermo Fisher Scientific), og ble kjørt ved 34 x 100 rmp i 40 sekunder for å sikre homogenisert blanding. RT-qPCR ble gjennomført på en 7500 Real Time PCR system fra Applied Biosystems med tilhørende 7500 Software v2.3. For fullstendig utarbeidet prosedyre se **Vedlegg.7**. Alle prøvene satt opp på PCR ble laget i biologiske duplikater, som også fremstilles med teknisk replikat. I tillegg ble det også satt opp NTC for alle de biologiske prøvene. C_t-verdier fra RT-qPCR ble eksportert og analysert ved hjelp av 2^{-ΔΔC_t} metoden (Livak & Schmittgen, 2001).

3.8 Cellelinje

A549 (ATCC® CCL-185™) og Calu-3 (ATCC® HTB-55™) cellelinjer er begge kommersielt tilgjengelig gjennom Sigma Aldrich og ATCC kultursamling, og ble benyttet i denne studien.

3.9 Celledyrking

To lungeepitel cellelinjer, Calu-3 og A549 celler, ble etablert og kultivert ved de samme forholdene. Cellelinjene ble dyrket i BioLite 25 cm² flasker med ventilering (Thermo Scientific), tilsatt dyrkingsmediet DMEM/F12 medium (+ 10 % serum + 1 % AA (Gibco™, ThermoFisher). For kultivering ble kulturene plassert i inkubasjonsskap ved 37 °C og 5 % CO₂ med en mettet luftfuktighet. For å opprettholde kontinuerlig og stabil vekst ble både konfluensnivå hos cellene og dyrkingsmedium vurdert kontinuerlig. Utviklingen i celleflaskene ble kontinuerlig kontrollert ved å bruke okularmikroskop (Motic® AE31) med forstørrelsene 10x og 40x. A549 cellene vist rask vekst hvor mediet ble byttet rundt hver fjerde dag. Dyrkingsmediet til Calu-3 cellene ble byttet omtrent hver andre dag. For vasking ble cellene tilsatt 1x DPBS som fikk virke et par minutter før det ble pipettert av og nytt medium ble tilsatt. Alt arbeid ble utført i LAF-benk (SAFE 2020, Thermo Scientific) ved en atmosfære på 100 % luft og temperatur satt til 37 °C.

Cellesplitting

Når cellekultur hadde nådd > 70 % konfluens, ble splitting gjennomført. Dyrkingsmediet ble fjernet før 0,25 % trypsin-EDTA ble tilsatt for å løsne cellelaget som vokste i celleflasken. Mens trypsin virket på cellene, ble celleflaskene plassert i inkubasjonsskap under samme forhold som for vekst. Dyrkingsmedium ble tilsatt som nøytraliserende faktor mot trypsin for å hindre degradering av cellene utover at de separeres og løsnes fra underlaget. Cellesuspensjon ble overført til ny celleflaske og etterfylt med vekstmedium for videre kultivering.

3.10 Sialinsyre

Sialinsyren, N-Acetylneuraminic Acid (batch: 20200712), ble levert i pulverform fra industripartner Viiral AS. Pulverisert form av N-acetylneuraminic acid ble veid (0,309 g, precisa 205 A SCS, Nerliens) og overført til eppendorfrør (Corning®, Sigma Aldrich) som videre ble tilsatt (10 ml) dyrkingsmedium. Løsningen ble blandet manuelt for homogenisering før volumet ble tatt opp med en steril sprøyte (B. Braun). Sprøytens innhold ble overført til et

nytt 50 ml falconrør (Corning®, Sigma Aldrich) gjennom et 32 mm filter med 0.2 µm membran (Acrodisc, Life Science).

3.10.1 pH måling

Det ble gjennomført pH måling av Neu5Ac tilsatt dyrkingsmediet før og etter inkubasjon med sialinsyre og viruskultur for å vurdere dyrkingsbetingelsene. Dette var avgjørende for å kunne vurdere om sialinsyren som tilsetningsstoff, vil påvirke bufferkapasiteten til dyrkingsmediet og degradere utviklingen av vekst. Dette gjøres for å sikre at dyrkingsforsøkene i seg selv ikke skal påvirke prøveresultatene fra forsøkene som er basert på celledyrkingen. Laget 0,01 mM, 0,1 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 10mM og 100mM sialinsyre konsentrasjoner som ble overførte til små begerglass. Deretter ble pH meter (Fisherbrand™ accumet™ AB150) benyttet for gjennomføring av målingene. Mellom hver måling ble elektroden på pH meter skylt med destillert vann.

3.10.2 pH justering

Ved å dråpevis tilsette NaOH kan pH til de ulike sialinsyre konsentrasjonene reguleres. Ved å gjøre dette kunne vekstvilkårene for celledyrking forbedres. 0,309 g sialinsyre ble veid og blandet med 10 ml DMEM/F-12. Dråpevis ble NaOH tilsatt løsningen og pH målt (Fisherbrand™ accumet™ AB150) kontinuerlig stabil pH.

3.11 Flowcytometri

BD BrdU Flow-kit fra BD Pharming som er en semi steril prosedyre, ble benyttet for å vurdere cellenes proliferasjon. Bromodeoxyuridine (BrdU) er et syntetisk nukleotid som tilsettes cellene under replikasjon. Senere i prosedyren blir det fluorescerende antistoffet anti-BrdU tilsatt for å binde seg til BrdU. Fluorescerende anti-BrdU fester seg til BrdU som sammen danner et målbart kompleks. 7-AAD som også er en fluorescerende komponent, ble tilsatt og inkorporert i de cellene, som ved dette stadiet, hadde gått i apoptose. Altså 7-AAD og BrdU registrerer henholdsvis celler som ikke har proliferert, sammenlignet med celler som har proliferert.

3.11.1 Optimalisering

Reagenser benyttet utenom BD BrdU Flow-kit fra BD Pharming var 1x DPBS (Sigma Aldrich) og FBS (Gibco™). Prosedyren ble gjennomført etter instruksene, se **Vedlegg.8**, hvor inkubasjonstrinn med Bromodeoxyuridine (BrdU) og DNase (BD Pharming) ble optimalisert ved å sammenligne to ulike tidsintervaller for inkubasjon. Prosedyren ble gjennomført etter

instruksjonen med en time inkubasjon for både Brdu og DNase, men også ved å undersøke utvidet inkubasjon til to timer.

3.11.2 Proliferasjonstest

For proliferasjon av A549 celler ble prosedyren gjennomført etter instruksene (**Vedlegg.8**) hvor inkubasjon med Brdu og DNase ble utvidet til to timer fra optimaliseringen. Ved start ble 0,309 g sialinsyre blandet med 10 ml dyrkingsmedium (pH 2,49) i et 50 ml eppendorfrør. NaOH ble tilsatt til pH og justert til pH 7,4 ble målt. To 6-brønn-plater ble tilsatt medium og sialinsyre som vist i **Tabell.9**, i samme trinn ble også Brdu tilsatt. Etter inkubasjon i to timer ble supernatanten fjernet og trypsin tilsatt. Cellesuspensjon ble til 15 ml eppendorfør før de enkelte konsentrasjonene gjennomgikk celledelling. For celledelling ble 10 µl cellesuspensjon blandet med 10 µl fargeløsning (trypan blue, Sigma Aldrich) i brønn på 96-brønn-plate. Dekkglass ble plassert over fuchs-rosenthal tellekammeret før 10 µl homogenisert suspensjon ble pipettert forsiktig ned i både øvre og nedre kamrene. Celledellingen ble utført ved å bruke okularmikroskop (Motic® AE31) med forstørrelsen 10x og 40x for å vurdere fordelingen av levende celler. Fra fullført prosedyre ble rørene med prøve plassert på is i påvente av analyse. Proliferasjonstesting ble utført ved bruk av instrumenttypen BD Accuri C6 flowcytometer.

Tabell. 9 Viser oppsett hvor A549 celler og ulike konsentrasjoner med Neu5Ac ble tilsatt brønner i 6-brønn-plate oppsett * indikerer volum basert på 10 mM Neu5Ac, og ** indikerer volum basert på 10 0mM Neu5Ac.

Brønn	Medium (ml)	Neu5Ac (ml)	Neu5Ac (mM)
1	4,0	0 (1)	0,0
2	4,0	0 (2)	0,0
3	3,996	0,004 (1) *	0,01
4	3,996	0,004 (2) *	0,01
5	3,96	0,04 (1) *	0,1
6	3,96	0,04 (2) *	0,1
7	3,6	0,4 (1) *	1,0
8	3,6	0,4 (2) *	1,0
9	3,6	0,4 (1) **	10
10	3,6	0,4 (2) **	10
11	0,0	4,0 (1) **	100
12	0,0	4,0 (2) **	100

Kvalitetsanalyse for flowcytometri

Før prøver kunne analyseres måtte det gjennomføres en kalibrering av instrumentet. Glassrør med rensende løsning (clean), dekontaminerende løsning (decont), dH₂O, 8peak bead løsning og 6peak beads løsning ble forberedt. Gangen i kalibreringen vises i **Tabell. 10**. Alle prøvene i denne studien ble kjørt på 10.000 events og hurtig. Events beskriver antall celler som instrumentet skal telle og farten for aspireringen av cellesuspensjonen ble satt til hurtig. Mellom alle prøvene ble to ganger backflush gjennomført for å sikre at prøver allerede analysert ikke skulle kontaminere avlesningen av videre prøver. Samme fremgangsmåten ble gjennomført ved slutten av en analysekjøring for å sikre at prøver ikke skulle påvirke neste analysekjøring.

Tabell.10 Viser gangen i de ulike løsningene og ved hvilken hastighet de ble gjennomføres for kalibrering og rensing av flowcytometeret.

Parameter	Kjøring
Clean	5 min på hurtig
Decont	5 min på hurtig
dH₂O vann	5 min på hurtig
8peak beads	Sakte på 10.000 events
Backflush	x2
6peak beads	Sakte på 10.000 events
Backflush	x2
dH₂O	5 min på hurtig

3.12 MTT assay

For MTT assay vokste celler til konfluens mellom 50-60 % med en seriefortynning av pH justerte sialinsyre konsentrasjoner i rent DMEM medium. En 96-brønn-plate ble inkubert i en time ved 37 °C og 5 % CO₂. Cellene ble vasket og deretter inkubert med 10 µl MTT i fem timer under de samme forholdene. Avslutningsvis ble det tilsatt 100 µl oppløsningsvæske før platen ble inkubert over natten. Dagen etter ble platen undersøkt for å se på fargeendring i de enkelte brønnene. Optisk tetthet ble målt ved 577 nm i en mikroplate leser (Multiskan® GO, Thermo Scientific).

3.13 *In vitro* celledyrkingsforsøk

For alle *in vitro* celledyrkingsforsøkene som har blitt gjennomført, har det blitt inkludert vekstkontroller, negativ kontroll og positiv kontroll som representerer normal celleutvikling og viruskultivering. Kontrollene brukes som kvalitetsanalyse for C_t-verdiene RT-qPCR registrerer fra isolerte prøver. Neu5Ac konsentrasjonene har blitt utarbeidet på samme måte for alle forsøkene ved å veie inn 0,1545 g løst i 5 ml dyrkingsmediet, som ga en konsentrasjon på 100 mM. Løsningen ble filtrert over i nytt 50 ml falconrør og har vært utgangspunktet for fortyninger til lavere konsentrasjoner Neu5Ac. I forkant av forsøkene ble cellenes konfluens kontrollert ved å gjøre undersøkelser i okularmikroskop (Motic® AE31). Alle prøver i forsøkene ble plassert i inkubasjonsskapet ved 33 °C i påvente av isoleringer. For alle isoleringstidspunktene i de enkelte forsøkene ble prøve isolert for videre RNA ekstraksjon. Ekstraksjon ble gjennomført som beskrevet i avsnitt 3.4 *Ekstraksjon av viralt RNA*.

3.13.1 Innledende forsøk

Forsøket ble satt opp for å se på utviklingen i epitelcellekultur tilsatt sialinsyre. Fra 100 mM løsningen ble 3 ml Neu5Ac overført til et 50 ml falconrør med 27 ml dyrkingsmedium som ga en 10 mM løsning. Løsningen ble blandet ved pipettering før 3 ml ble overført til et annet rør, også med 27 ml dyrkingsmedium. Sluttkonsentrasjonen ble dermed 1.0 mM. 6-brønn-plate tilsatt Calu-3 celler ble preparert ved å fjerne gammelt medium. 1,5 ml med romtemperert 1 x DPBS ble tilsatt alle brønnene for å vaske monolaget med celler og videre pipetter av. Deretter ble de ulike brønnene tilsatt nytt dyrkingsmedium, viruskultur og Neu5Ac som vist i **Tabell. 11** og **Tabell.12**. Celledrettene ble satt til inkubasjon i to døgn, tre døgn og fire døgn, før prøve ble isolert.

Tabell. 11 Viser fordelingen av mengde sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet i de enkelte brønnene i et 96-plate-oppsett.

	Medium (ml)	Neu5Ac (100 mM)	Brønn
Negativ kontroll	2,0		A1 – A2
1,0 mM	1,98	0,02 ml	B1 – B2
10,0 mM	1,80	0,20 ml	C1 – C2

Tabell. 12 Viser fordelingen av viruskultur og mengde sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet i de enkelte brønnene i et 96-plate-oppsett.

	Medium (ml)	Neu5Ac (100 mM)	HRV87	Brønn
Positiv kontroll	1,70		TCID ₅₀ 10 ⁵	A1 – A2
1,0 mM	1,68	0,02 ml	TCID ₅₀ 10 ⁵	B1 – B2
10,0 mM	1,50	0,20 ml	TCID ₅₀ 10 ⁵	C1 – C2

3.13.2 Forsøk.1

Forsøket ble satt opp med A549 celler som utgangspunkt for kultivering av HRV87. HRV87 og normal cellekultur ble tilsatt Neu5Ac for å undersøke påvirkningen av tilsetningsstoffet. RT-qPCR metoden ble vurdert om deteksjon av HRV87 kultivert med Neu5Ac til stede ble kvantifisert på lik linje som deteksjon av rendyrket HRV87. Fra startkonsentrasjonen med 100 mM Neu5Ac ble 4 ml (100 mM) tilsatt til 36 ml med dyrkingsmedium for sluttkonsentrasjon på 10 mM. Små celleflasker (25 cm², VWR®) med A549 celler ble klargjort og tilsatt nytt medium som vist i **Tabell.13** og **Tabell.14**. Celleflaskene ble plassert til inkubasjon i påvente av prøve isoleringer etter to, tre og fire døgn.

Tabell. 13 Viser fordelingen av mengde sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet for vekst av cellekultur i 25cm² celleflasker.

	Medium (ml)	Neu5Ac (10 mM)	Flaske
Negativ kontroll	10		E1 – E2
0,1 mM	9,9	0,1 ml	F1 – F2
1,0mM	9,0	1,0 ml	G1 – G2
2,0mM	8,0	2,0 ml	H1 – H2

Tabell.14 Viser fordelingen av mengde sialinsyre og viruskultur tilsatt dyrkingsmediet for vekst av cellekultur i 25cm² celleflasker.

	Medium (ml)	Neu5Ac (10 mM)	Flaske	HRV87 (kons)
Positiv kontroll	9,0		A1 – A2	TCID ₅₀ 10 ⁴
0,1 mM	8,9	0,1ml	B1 – B2	TCID ₅₀ 10 ⁴
1,0 mM	8,0	1,0 ml	C1 – C2	TCID ₅₀ 10 ⁴
2,0 mM	7,0	2,0 ml	D1 – D2	TCID ₅₀ 10 ⁴

3.13.3 Forsøk.2

Forsøket ble utarbeidet for å se om sialinsyre tilsatt HRV87 hadde en effekt på virusets reproduksjon. Effekt ble vurdert basert på relativ endring over tid. 18 ml med dyrkingsmedium ble overført til et 50 ml eppendorfrør før 2 ml 100 mM Neu5Ac ble tilsatt det samme røret, som resulterte i 20 ml med 10mM Neu5Ac. Celleflasker (25 cm², VWR®) med A549 celler ble klargjort og tilsatt nytt dyrkingsmedium med ulike sialinsyre konsentrasjoner (10 mM) som vist i **Tabell.15** og **Tabell.16**, deretter ble celleflaskene plassert i inkubasjonsskap ved 37 °C og 5 % CO₂ i to timer. To timer etter tilsatt sialinsyre, ble HRV87 tilsatt for inkubasjon i ytterligere to timer. Supernatant ble pipettert av og monolaget med celler ble vasket med 2,5 ml 1 x DPBS før celleflaskene ble tilsatt nytt medium med like Neu5Ac konsentrasjoner som ved start. Cellene ble satt til inkubasjon før prøve ble isolert etter et, to og tre døgn.

Tabell. 15 Viser fordelingen av mengde sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet for vekst av cellekultur i 25cm² celleflasker. Celleflaskene ble tilsatt TCID₅₀ 10² = 10 µl viruskultur to timer etter inkubasjon med sialinsyre.

	Medium (ml)	Neu5Ac (10 mM)	Flaske	HRV87 (kons)
Negativ kontroll	10		A1 – A2	
Positiv kontroll	10		B1 – B2	TCID ₅₀ 10 ²
0,1 mM	9,9	0,1 ml	C1 – C2	TCID ₅₀ 10 ²
1,0 mM	9,0	1,0 ml	D1 – D2	TCID ₅₀ 10 ²
2,0 mM	8,0	2,0 ml	E1 – E2	TCID ₅₀ 10 ²

Tabell. 16 Viser fordelingen av mengde sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet for vekst av cellekultur i 25cm² celleflasker. Celleflaskene ble tilsatt TCID₅₀ 10³ = 100 µl viruskultur etter to timer inkubasjon med sialinsyre.

	Medium (ml)	Neu5Ac (10 mM)	Flaske	HRV87 (kons)
Positiv kontroll	10		F1 – F2	TCID ₅₀ 10 ³
0,1mM	9,9	0,1 ml	G1 – G2	TCID ₅₀ 10 ³
1,0mM	9,0	1,0 ml	H1 – H2	TCID ₅₀ 10 ³
2,0mM	8,0	2,0 ml	I1 – I2	TCID ₅₀ 10 ³

3.13.4 Forsøk.3

Forsøket ble utarbeidet for å se på utviklingen av HRV87 på et tidlig stadium med lavere konsentrasjoner Neu5Ac tilsatt dyrkingsmediet. Konfluensnivået i celleflaskene ble vurdert til > 75%. 9 ml dyrkingsmedium ble overført til et 15 ml eppendorfrør, hvor 1 ml (100 mM) Neu5Ac ble tilsatt. Celleflasker (25 cm², VWR®) med A549 celler ble forbehandlet med 2,5 ml 1x DPBS. Sialinsyre og dyrkingsmedium ble tilsatt som vist i **Tabell. 17**. Celleflaskene ble plasseres til inkubasjon i et døgn før isolering av prøve.

Tabell. 17 Viser fordelingen av sialinsyre konsentrasjoner tilsatt dyrkingsmediet for de ulike flaskene med viruskultur. Her ble alle reagensene tilsatt samtidig.

	Medium (ml)	Neu5Ac (10 mM)	Flaske	HRV87 (kons)
Negativ kontroll	10		A1 – A2	
Positiv kontroll	10		B1 – B2	TCID ₅₀ 10 ⁴
0,2 mM	9,8	0,2 ml	C1 – C2	TCID ₅₀ 10 ⁴
0,4 mM	9,6	0,4 ml	D1 – D2	TCID ₅₀ 10 ⁴
0,6 mM	9,4	0,6 ml	E1 – E2	TCID ₅₀ 10 ⁴
0,8 mM	9,2	0,8 ml	F1 – F2	TCID ₅₀ 10 ⁴
1,0 mM	9,0	1,0 ml	G1 – G2	TCID ₅₀ 10 ⁴

4 RESULTATER

For *in vitro* celleforsøkene ble det gjort et innledende forsøk avsnitt 3.12.1 *Innledende forsøk*. Dette ble gjort for å vurdere hvilken av de to epitelcellelinjene som viste seg å være best tilpasset forutsetningene i denne studien. Begge cellelinjene ble etablert og dyrket ved de samme forholdene. Calu-3 cellene ble brukt som cellelinje i det innledende forsøket. Forsøket måtte avbrytes underveis fordi dyrkingsforholdene ikke gjorde det mulig å gjøre prøveuttak for PCR. Basert på karakteristik, konfluens og tiden det tok å dyrke Calu-3 cellene, og avvikene ved det innledende forsøket så ble det besluttet å avslutte videre dyrking av cellelinjen. Utover det innledende forsøket ble A549 celler brukt kontinuerlig gjennom arbeidet. HRV87 ble dyrket i etablert A549 cellekultur, kultivert og fryst i mindre alikvoter som virusstock. Virusstock har vært utgangspunktet for utarbeidelsen av RT-qPCR metoden og brukt i *in vitro* celleforsøkene. Parallelt med utarbeidelsen av PCR metoden har påvirkningen av sialinsyren Neu5Ac på A549 cellenes levedyktighet og proliferasjon blitt evaluert. HRV87 har vist rask utvikling i form av tydelig utfelling i celleflaskene (CPE). 100 % CPE ble observert i overgangen mellom tre til fire døgn etter kultivering.

4.1 TCID₅₀ test

Fra virusstock (10^0) ble det laget fortynninger for å beregne TCID₅₀. For å bestemme TCID₅₀ ble Reed and Muench (Ramakrishnan, 2016) metoden benyttet til å kalkulere CPE fra de enkelte fortynningene (**Tabell.18**) Resultatene fra forsøket viser at HRV87 infeksjon observeres i omlag 50 % av cellene (TCID₅₀) ved virusstock (1 TCID₅₀) fortynnet til 10^{-5} . Kontrollene viste normal cellevekst, med andre ord 0 % CPE.

Tabell. 18 CPE effekt beregnet med seriefortynning i brønner på et 96-plate-oppsett tilsatt virus fortynninger. De enkelte fortynningene er presentert øverst på platen, hvor hver fortynning er tilsatt i rad A-H. Verdien 100 = 100 % CPE, verdien 50 = delvis CPE og 0 = ingen CPE.

	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
A	100	100	100	100	100	100	50	0	0
B	100	100	100	100	100	100	100	50	0
C	100	100	100	100	100	100	100	0	0
D	100	100	100	100	100	100	100	0	0
E	100	100	100	100	100	100	100	0	0
F	100	100	100	100	100	100	50	0	0
G	100	100	100	100	100	100	100	50	0
H	100	100	100	100	100	100	100	0	0

$$(10^0) \frac{8 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 100 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-1}) \frac{8 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 100 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-2}) \frac{8 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 100 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-3}) \frac{8 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 100 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-4}) \frac{8 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 100 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-5}) \frac{8 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 100 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-6}) \frac{7 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 87.5 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-7}) \frac{1 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 12.5 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

$$(10^{-8}) \frac{0 \text{ infiserte brønner}}{8 \text{ brønner totalt}} * 100 = 0 \% \text{ av brønnene er infiserte.}$$

Ut ifra tallene blir

$$A = 87.5 \%$$

$$B = 12.5 \%$$

Formelen som brukes for å beregne TCID₅₀ virus er presenter i avsnitt 2.5.5 *Beregninger*.

$$\frac{A-50\%}{A-B} = PD \rightarrow \frac{87.5-50}{87.5-12.5} = 0.5$$

$$(10^{-6}) - (0.5 * 10) = - 4.999999$$

$$TCID_{50} = 10^{-5}$$

4.2 RT-qPCR

4.2.1 Primer og probe optimalisering

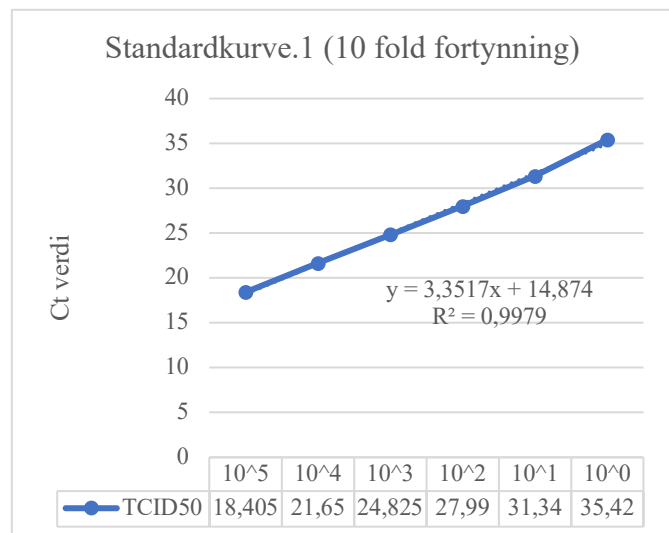
For å kunne gjennomføre en pålitelig RT-qPCR ble optimalisering av både primerne og proben gjort. Forward (FWD) og revers (RWD) primer ble satt opp som duplikater. Primer konsentrasjoner fra 200 – 600 nM ble testet med probe satt til standard konsentrasjon lik 400 nM. Resultatene fra analysen viste at 200 nM forward primer sammen med 300 nM revers primer og 300 nM forward primer med 400 nM revers primer ga bedre resultater enn de andre konsentrasjon sammensetningene (**Vedlegg.9**). Minimale forskjeller i Ct-verdi for replikate konsentrasjoner var ønskelig når det beste forholdet mellom forward primer og revers primer ble evaluert. Probe optimalisering ble gjennomført med både 200 nM FWD / 300 nM RWD og 300 nM FWD / 400 nM RWD primer som ble vurdert på samme grunnlag som ved primer optimaliseringen. For deteksjon av HRV87 ble det klart at optimal sammensetning av primer og probe konsentrasjon var 0,9 µl 300 nM forward primer, 1,2 µl 400 nM revers primer og 1,8 µl 300nM probe, for rådata se **Vedlegg. 9**.

4.2.2 Standardkurve

Standardkurver ble generert for to forskjellige analysetidspunkt. Gjennomsnittsverdiene for alle standardene, se **Vedlegg.10**, for begge preparatene var lineære for hele fortynningsrekken med korrelasjonskoeffisient (R²) -verdier på 0,9966 for standardkurve.2 (**Figur.8**) og 0,9979 for standardkurve.1 (**Figur.9**). Fra disse verdiene ble effektiviteten regnet til 98,77 % for kurve.1 og 94,18 % for kurve.2 fra formelen i 2.5.5 *Beregninger*. Alle avvik er innenfor en standardfeil på den beste minste kvadratiske regresjonslinjen. Resultatene viser endring i C_t for hver tiende fortynning (10x) med gjennomsnitt (ΔC_tmean) 3,4 for begge standardkurvene som viser tilnærmet 100 % transkripsjonseffektivitet.

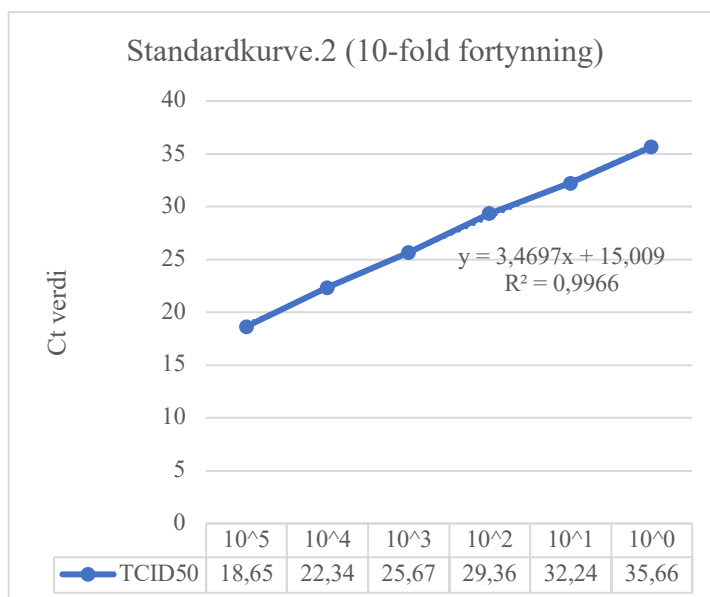
Variasjon øker betydelig for den laveste RNA konsentrasjonen som ble benyttet, med C_t -verdi lik 35, 66. Verdiene viser liten variasjon i C_t -verdi for samme konsentrasjon (interassay variasjon) som gjenspeiler den analytiske sensitiviteten. For hvert replikat innenfor begge standardkurvene ble standardavvik og variasjonskoeffisient (CV) beregnet, se **Vedlegg.10**. Intraassay variasjoner ble vurdert for begge analysetidspunktene. Replikatene for samme analysetidspunkt viser stabile C_t -verdier som beskriver metodens reproduserbarhet. Avvik innenfor $C_t \pm 0,5$ ble akseptert. Alle fortyngninger var innenfor det aksepterte standardavviket selv om 10^1 - standarden for standardkurve.2 med C_t lik 0,42 hadde et høyere standardavvik enn resten av standardene. Variasjonskoeffisienten var 0,01 eller mindre for alle standarder i fortyngningsrekkene. For denne studien ble laveste konsentrasjon i standardkurven satt som deteksjonsgrense.

Standard	TCID ₅₀	TCID ₅₀ eq	Brønn	C_t	C_t mean
Standard1	100000	10^5	B7	18,38	18,405
			B8	18,43	
Standard2	10000	10^4	C7	21,83	21,65
			C8	21,47	
Standard3	1000	10^3	D7	24,89	24,825
			D8	24,76	
Standard4	100	10^2	E7	28,01	27,99
			E8	27,97	
Standard5	10	10^1	F7	31,22	31,34
			F8	31,46	
Standard6	1	10^0	G7	35,34	35,42
			G8	35,5	



Figur. 8 Viser til venstre en tabelloversikt over fortyngningene som ga utgangspunkt for standardkurve.1 Oversikten presenterer fortyngningene satt opp som replikater vist som de enkelte brønnene i et 96-plate-oppsett (Applied Biosystems). Gjennomsnittsverdien av disse vises i siste kolonne. Verdiene fra tabelloversikten gir utgangspunktet for standardkurven som presenteres til høyre i figuren. Grafen illustrerer lineariteten til kurven sammen med de samme verdiene.

Standard	TCID ₅₀	TCID ₅₀ eq	Brønn	C _t	C _t mean
Standard1	100000	10 ⁵	B7	18,87	18,65
			B8	18,43	
Standard2	10000	10 ⁴	C7	22,4	22,34
			C8	22,28	
Standard3	1000	10 ³	D7	25,83	25,67
			D8	25,51	
Standard4	100	10 ²	E7	29,67	29,36
			E8	29,05	
Standard5	10	10 ¹	F7	32,66	32,24
			F8	31,82	
Standard6	1	10 ⁰	G7	35,63	35,66
			G8	35,69	



Figur. 9 Viser til venstre en tabelloversikt over fortynningene som ga utgangspunkt for standardkurve.2. Oversikten presenterer fortynningene satt opp som replikater vist som de enkelte brønnene i et 96-plate-oppsett (Applied Biosystems). Gjennomsnittsverdien av disse vises i siste kolonne. Verdiene fra tabelloversikten gir utgangspunktet for standardkurven som presenteres til høyre i figuren. Grafen illustrerer lineariteten til kurven sammen med de samme verdiene

4.3 Sialinsyre konsentrasjoner

For å vurdere påvirkningen av sialinsyre som tilsetningsstoff i dyrkingsmediet ble pH målt i en rekke Neu5Ac konsentrasjoner med pH-meter (Fisherbrand™ accumet™ AB150). Resultatene fra målingene er vist i **Tabell.19**. Her kommer det tydelig frem at 100 mM Neu5Ac er svært sur sammenlignet med de andre konsentrasjonene. Som tilsetningsstoff vil Neu5Ac kunne påvirke cellevekst og kultivering av HRV87 som begge har stabile vekstvilkår ved pH rundt 7. Påvirkningen av 0,1 mM til og med 1,0 mM Neu5Ac trenger ikke ha en betydelig påvirkning med pH målt til omtrent 7.

Tabell.19 Viser pH målt av en rekke ulike sialinsyre konsentrasjoner som har blitt benyttet gjennom denne studien.

Sialinsyre konsentrasjon (mM)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0	10	100
Målt pH	7,67	6,94	6,99	6,87	6,73	7,17	6,63	6,91	2,49

Samme type måling av dyrkingsmediet tilsatt Neu5Ac ble gjort før og etter inkubasjon i celleflasker med HRV87 og A549 celler (**Tabell.20**). Målingene viser ingen spesiell endring i bufferkapasiteten. Dersom bufferen hadde endret pH drastisk, så ville dette også endret dyrkingsvilkårene.

Tabell.20 Viser forskjell i pH målt dyrkingsmediet til A549 celler før og etter inkubasjon med Neu5Ac og viruskultur.

Sialinsyre konsentrasjon (mM)	Målt pH	
	Før inkubasjon	Etter inkubasjon
0	x	7,76
0,01	7,59	7,77
0,1	7,56	7,81
1	7,58	7,77
2	7,55	x
10	7,55	7,78
100	7,65	7,14

4.3.1 Justeringer

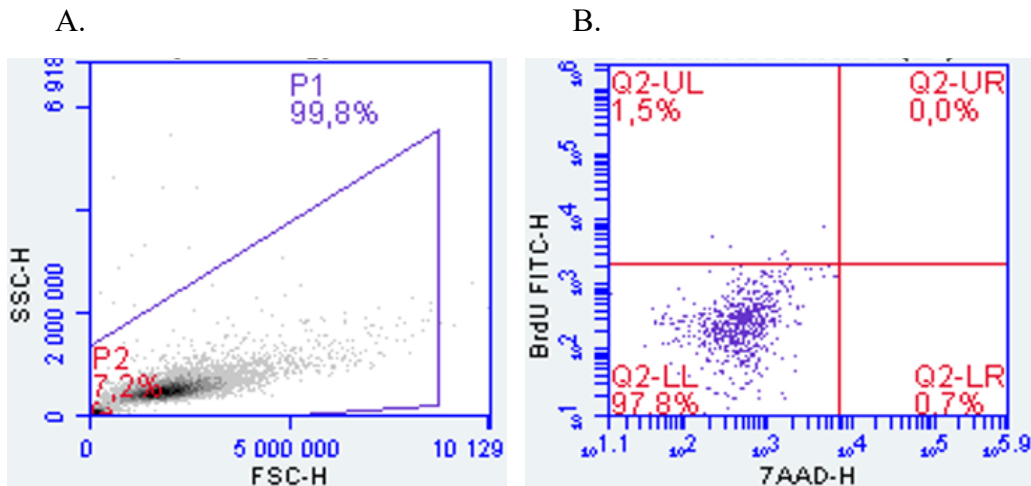
100 mM sialinsyre ble målt til pH 2,49. Dråpevis ble NaOH tilsatt løsningen og målt (Fisherbrand™ accumet™ AB150) som vist i **Tabell.21**. Etter 20 dråper med NaOH var pH målt til 7,51, tilpasset for videre undersøkelser av effekten til høye Neu5Ac konsentrasjoner.

Tabell. 21 Viser dråpevis regulering med NaOH for stabilisering av pH målt i sialinsyren.

Dråper	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Målt pH	2,50	2,55	2,60	2,65	2,70	2,75	2,82	2,90	2,96	3,03	3,11	3,19	3,31	3,45	3,62	3,83	4,32	6,02	6,60	7,51

4.4 Flowcytometri

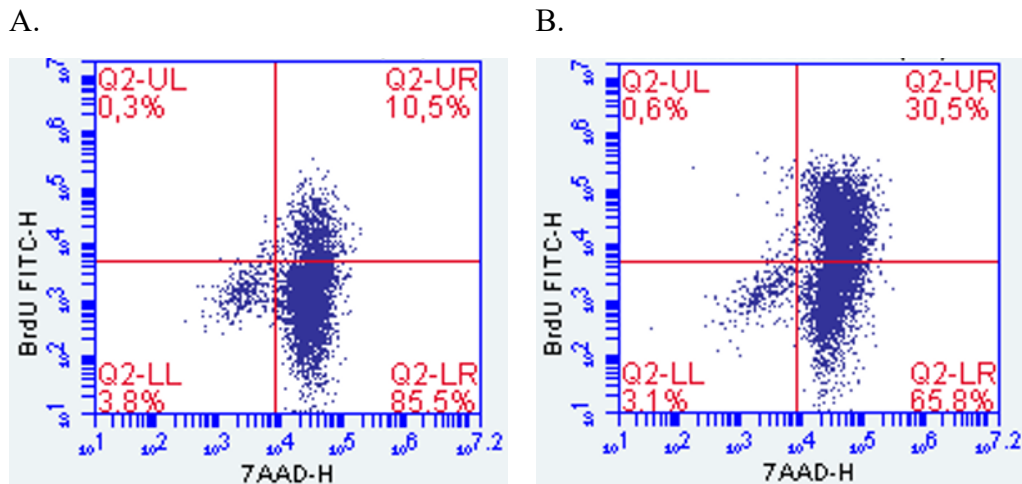
Resultatene fra flowcytometri ble vurdert ved å sette forutsetninger for hva som skulle undersøkes. Validering av resultatene ble gjort ved å bestemme gate for hele populasjonen, se **Figur.10**, illustrert som P1. Samtidig ble gate, P2 satt som negativ intern kontroll.



Figur.10 Viser forutsetningene for validering av flowcytometri resultatene. Bilde. A viser gate satt, hvor gate P1 definerer cellekulturen i sin helhet. Gate P2 viser intern negativ kontroll satt for alle prøvene. Bilde. B viser fordelingen av celler i den negative interne kontrollen, P2. P2 defineres som rusk.

4.4.1 Prosedyre optimalisering

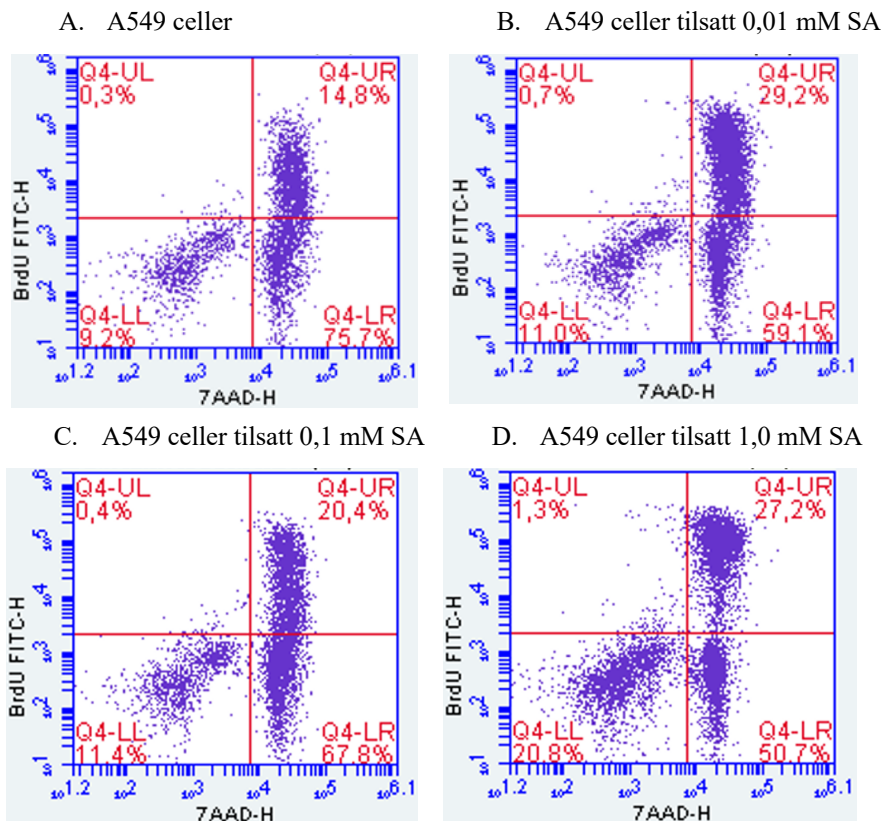
Grunnen til at det ble gjennomført optimalisering av prosedyren var ønske om å forbedre betingelsene for å få større prosentandel celler til å proliferere. Inkubasjonstrinnene for BrdU og DNase ble justert fra en time til to. Ved inkubasjon av BrdU i to timer og deretter to timer inkubasjon med BD DNase ga bedre resultat for proliferasjon av A549 celler. **Figur.11** viser tydelig forskjell mellom prosentandel celler som har proliferert ved de ulike forutsetningene. Ved utvidet inkubasjonsintervall viser prolifererte celler en økning på 20 % (**Figur.11**, bilde B).



Figur.11 Viser resultatene fra gjennomført proliferasjonstest med to ulike inkubasjonsintervaller for Brdu og DNase. Bilde. A viser Brdu og DNase, begge inkubert i en time. Bilde. B viser de samme reagensene inkubert i to timer.

4.4.2 A549 proliferasjon

For gjennomføring av proliferasjonstest med varierende Neu5Ac konsentrasjoner tilsatt A549 cellene ble pH justeringer gjort i forkant. Resultatene fra måling av cellene ved flowcytometri ble vurdert ved å se på prosentandelen celler som proliferert, vist som Q4-UR i dotplott (**Figur.12**). Dotplottene viser at cellene inkubert med sialinsyre har høyere prosentandel celler som har proliferert, se **Vedlegg.11**. Prøvene fremvist i **Figur.12**, Bilde. C med 0,1 mM sialinsyre tilsatt har ikke vist lik evne til proliferasjon som Bilde. D med 1,0 mM sialinsyre (27,2 %). **Figur.12**, Bilde. B viser betydelig bedre proliferasjon ved tilsatt 0,01 mM sialinsyre (29,2 %) sammenlignet med vanlig A549 celleproliferasjon (14,8 %) (Bilde. A, **Figur.12**), hvilket betyr at sialinsyren som tilsetningsstoff ikke har noen negativ effekt på celledelingen.



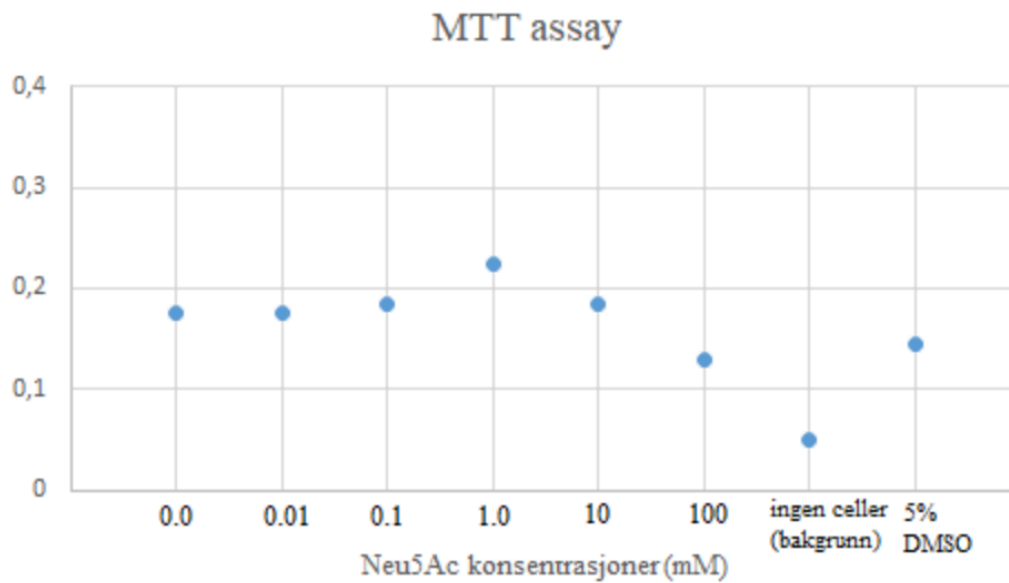
Figur.12 Viser ulike forutsetninger for proliferasjon av A549 celler. Bilde.A viser andel prolifererte celler ved ordinær A549 cellevekst. Bilde.B viser prolifererte celler dyrket i mediet tilsatt 0,01 mM SA. Bilde.C viser cellekultur dyrket med 0,1 mM SA. Tilslutt viser bilde.D prolifererte celler ved 1,0 mM SA tilsatt dyrkingsmediet

4.5 MTT assay

Tabell.22 viser resultatene for absorpsjonsmålinger gjort av duplikate prøver tilsatt sialinsyre og inkubert i en time ved 37 °C med 5 % CO₂. Alle prøvene viser at cellene påvirkes av sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet. Av disse så skiller 100 mM seg ut som den som kan ha negativ påvirkning på levedyktigheten til cellene. 0,01 mM, 0,1 mM, 1,0 mM og 10 mM Neu5Ac registrerte større mengde levende celler sammenlignet med prøve fra normale vekstforhold uten Neu5Ac tilsatt (0,0 mM). **Figur.13** viser en grafisk fremstilling av verdiene og her vises 1,0 mM som en tydelig topp sammenlignet med de andre verdiene.

Tabell.22 Viser optisk densitet ved de ulike sialinsyre konsentrasjonene ved avslutningsvis MTT assay.

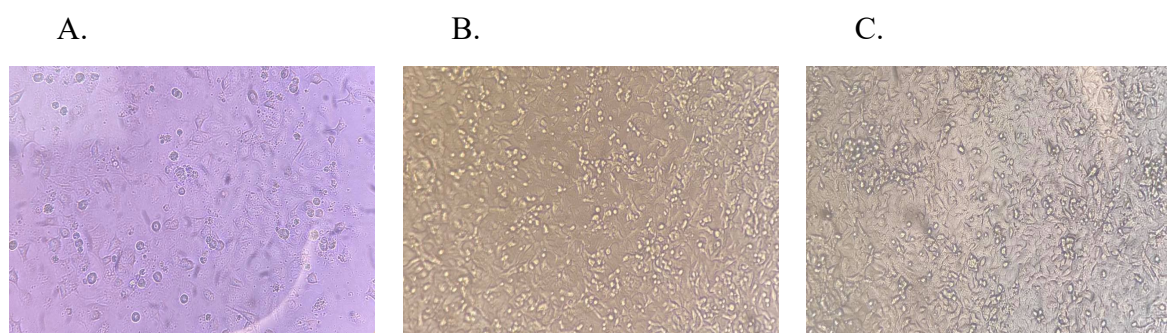
SA konsentrasjon (mM)	MTT 37 °C (OD)		Mean OD
0,0	0,17	0,18	0,175
0,01	0,21	0,14	0,175
0,1	0,16	0,21	0,185
1,0	0,20	0,25	0,225
10	0,12	0,25	0,185
100	0,12	0,14	0,13
Ingen celle bakgrunn	0,05	0,05	0,05
5 % DMSO	0,16	0,13	0,145



Figur.13 Viser sammenligningen av de replikate verdiene ved de ulike inkubasjonsforholdene. Sialinsyre konsentrasjon er fordelt på x-aksen, mens y-aksen viser optisk densitet (OD).

4.6 *In vitro* celledyrkingsforsøk

For alle *in vitro* celledyrkingsforsøkene har negativ og positiv kontroll blitt inkludert. Vekstkontroller for undersøkelser av Neu5Ac tilsatt A549 celler påvirker normalvekst inkluderes også. Ingen av vekstkontrollene viste synlige forskjeller fra normal celledyrking, heller ikke parallellene hadde avvik fra hverandre, se **Vedlegg.12**. Negative kontroller viste normal vekst uten CPE. De positive kontrollene ble satt opp som rene viruskulturer som har blitt målt gjennom RT-qPCR for hvert enkelt forsøk som presenteres videre i oppgaven. **Figur.14** viser utviklingen i normal celledyrking. Bilde. **A**, **Figur.14** viser konfluens cirka 40 % av A549 celler med normal vekst ved 48 timer. Bilde. **B** viser A549 celler etter 72 timer, hvor man ser en økning i konfluens. Bilde. **C** viser cellene etter 96 timer. Bildene viser en ekstrem økning i konfluens. Fargen som presenteres er ikke representativ for prøven, men viser endring i tilgang på næring i dyrkingsmediet. Etter 96 timer er konfluens tilnærmet 100 %. Bildene representerer nødvendigvis ikke virkeligheten, da disse bildene fremstår som mer ekstreme i fargen. Alle rådataer fra *in vitro* celledyrkingsforsøkene i denne studien finnes i **Vedlegg.13**.



Figur. 14 Viser utviklingen av A549 i celleflaske over tid, som representerer negativ kontroll. Bildene er tatt ved å se gjennom okularmikroskop (Motic® AE31) med forstørrelsen 10x. Bilde. A er tatt etter 24 timer, bilde. B i midten viser vekst etter 48 timer og bilde. C viser cellene etter 72 timer.

4.6.1 Forsøk. 1

HRV87 ble kontinuerlig kultivert i A549 celler med Neu5Ac tilsatt dyrkingsmediet. Prøver ble isolert ved tre ulike tidspunkt fra ulike celleflasker, som ga totalt tjuefire etter RNA ekstraksjon. Verdiene fra gjennomført RT-qPCR er presentert i **Tabell.23-26**. I tabellene presenteres biologiske replikatene og tekniske replikater sammen med standardavvik og den gjennomsnittlige C_T -verdien for mengde virus registrert i de biologiske replikatene. RT-qPCR metoden hadde ingen problem med å amplifisere eller kvantifisere prøvene. Målingene gjort fra prøver uten tilsatt Neu5Ac, positiv kontroll (**Tabell.23**), sammenlignet med prøvene tilsatt 0,1 mM Neu5Ac (**Tabell.24**) viser høyere C_T -verdier ved sialinsyre til stede ved 48 timer og 72

timer, men ikke etter 96 timer. Prøver med 1,0 mM Neu5Ac (**Tabell.25**) og 2,0 mM Neu5Ac (**Tabell.26**) ble registrert med lavere C_t -verdier for både 48 timer og 96 timer sammenlignet med positiv kontroll. 1,0 mM Neu5Ac ved 48 timer kastes på grunn av manglende verdi og kan ikke vurderes. Resultatene viser at RT-qPCR metoden har tilfredsstillende presisjon sett på C_t -verdiene for de biologiske replikatene og de tekniske replikatene, som er nær hverandre i verdi.

$$1000 \mu\text{l} = \text{TCID}_{50} 10^4$$

Tabell.23 Presenterer C_t -verdiene registrert for positiv kontroll med normal kultivering av HRV87 etter gjennomført RT-qPCR hvor RNA ble fortynnet 1:10. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av TCID_{50} fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	TCID_{50}eq (mean)	SD
a1000μl 48t	10,0000000	C2	30,74	30,575	x * 10^1 TCID_{50}	0,16500
		C3	30,41			
b1000μl 48t	10,0000000	C5	31,09	31,01	x * 10^1 TCID_{50}	0,08000
		C6	30,93			
a1000μl 72t	10,0000000	D2	31,04	30,825	x * 10^1 TCID_{50}	0,21500
		D3	30,61			
b1000μl 72t	10,0000000	D5	30,74	30,85	x * 10^1 TCID_{50}	0,10500
		D6	30,95			
a1000μl 96t	10,0000000	E2	29,54	29,42	x * 10^2 TCID_{50}	0,12000
		E3	29,3			
b1000μl 96t	10,0000000	E5	29,81	29,88	x * 10^2 TCID_{50}	0,06500
		E6	29,94			

Tabell.24 Presenterer C_t -verdiene registrert for kultivering av HRV87 dyrket med 0,1 mM Neu5Ac tilsatt mediet. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ble fortynnet 1:10. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50eq}$ (mean)	SD
a1000μl 48t	10,0000000	C2	31,36	31,79	x * 10^1 $TCID_{50}$	0,43000
		C3	32,22			
b1000μl 48t	10,0000000	C5	31,94	31,73	x * 10^1 $TCID_{50}$	0,21000
		C6	31,52			
a1000μl 72t	10,0000000	D2	31,2	31,175	x * 10^1 $TCID_{50}$	0,02500
		D3	31,15			
b1000μl 72t	10,0000000	D5	30,36	30,43	x * 10^1 $TCID_{50}$	0,07000
		D6	30,5			
a1000μl 96t	10,0000000	E2	28,94	28,77	x * 10^2 $TCID_{50}$	0,17000
		E3	28,6			
b1000μl 96t	10,0000000	E5	28,95	29,08	x * 10^2 $TCID_{50}$	0,12500
		E6	29,2			

Tabell.25 Presenterer C_t -verdiene registrert for kultivering av HRV87 dyrket med 1,0 mM Neu5Ac tilsatt mediet. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ble fortynnet 1:10. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50eq}$ (mean)	SD
a1000μl 48t	10,0000000	C2	29,51	29,68	x * 10^2 $TCID_{50}$	0,17000
		C3	29,85			
b1000μl 48t	10,0000000	C5	28,22	28,22	x * 10^2 $TCID_{50}$	14,11000
		C6	0			
a1000μl 72t	10,0000000	D2	30,11	29,785	x * 10^2 $TCID_{50}$	0,32500
		D3	29,46			
b1000μl 72t	10,0000000	D5	29,93	29,97	x * 10^2 $TCID_{50}$	0,04000
		D6	30,01			
a1000μl 96t	10,0000000	E2	28,77	28,815	x * 10^2 $TCID_{50}$	0,04500
		E3	28,86			

b1000µl 96t	10,0000000	E5	27,12	27,21	x * 10 ² TCID ₅₀	0,09000
		E6	27,3			

Tabell.26 Presenterer C_t-verdiene registrert for kultivering av HRV87 dyrket med 2,0 mM Neu5Ac tilsatt mediet. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ble fortynnet 1:10. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t-verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av TCID₅₀ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	TCID₅₀eq (mean)	SD
a1000µl 48t	10,0000000	C2	30,01	30	x * 10 ¹ TCID ₅₀	0,01000
		C3	29,99			
b1000µl 48t	10,0000000	C5	30,08	30	x * 10 ¹ TCID ₅₀	0,08000
		C6	29,92			
a1000µl 72t	10,0000000	D2	28,66	28,77	x * 10 ² TCID ₅₀	0,11000
		D3	28,88			
b1000µl 72t	10,0000000	D5	29,88	30,33	x * 10 ¹ TCID ₅₀	0,44500
		D6	30,77			
a1000µl 96t	10,0000000	E2	28,5	28,51	x * 10 ² TCID ₅₀	0,01000
		E3	28,52			
b1000µl 96t	10,0000000	E5	29,17	28,96	x * 10 ² TCID ₅₀	0,21500
		E6	28,74			

4.6.2 Forsøk.2

HRV87 ble inkubert i to timer på A549 cellene med de samme Neu5Ac konsentrasjonene tilsatt dyrkingsmediet som ved foregående forsøk. A549 cellene var på det tidspunktet virus ble tilsatt inkubert med Neu5Ac i to timer. Her ble prøve isolert fra samme celleflaske ved de ulike tidspunktene. Totalt ble det isolert 16 rør med prøve etter RNA ekstrahering. Det ble i tillegg isolert en null prøve ved start som representerer hele forsøket og denne ble målt til C_t 18,43. I **Tabell. 27**, **Tabell.28**, **Tabell.29** og **Tabell.30** presenteres en oversikt over de målte verdiene for de enkelte sialinsyre konsentrasjonene tilsatt $TCID_{50} 10^3$ og $TCID_{50} 10^2$ med henholdsvis 0,0 mM SA, 0,1 mM SA, 1,0 mM SA og 2.0 mM SA. Målingene gjort fra normal kultivert HRV87 (positiv kontroll) viser variasjoner i C_t -verdiene med høyere C_t -verdi både ved 0,1 mM og 1,0 mM. C_t -verdi fra prøvene tilsatt 2,0 mM Neu5Ac er målt som lavere C_t -verdier sammenlignet med 0,1 mM og 1,0 mM, som betyr at en større mengde virus som har klart å reprodusere seg. Disse variasjonene undersøkes om de skyldes signifikant forskjell eller ikke (**Tabell. 31** og **Tabell.32**). Ved å se på den gjennomsnittlige C_t -verdi for de enkelte sialinsyre konsentrasjonene kan det gjøres en vurdering på om det er forskjell mellom mengde virus målt til de ulike tidene, se **Tabell.33**. Ved gjennomførelse av t-test ble det undersøkt om det var signifikant forskjell mellom målingene ($p=0,05$), se **Vedlegg.13**. Alle testene ble regnet med fire verdier siden prøvene er gjennomført i biologiske replikater og tekniske replikater. I denne oppgaven inkluderes de prøvene som ble beregnet til signifikant forskjellige. Det ble gjort videre vurderingen på om de signifikante forskjellene skyldtes stor varians mellom de biologiske replikatene eller om det ble registrert en målbar effekt ved tilsatt sialinsyre. For alle beregninger se **Vedlegg.13**.

$$10 \mu l = TCID_{50} 10^2$$

$$100 \mu l = TCID_{50} 10^3$$

Tabell.27 Presenterer C_t -verdiene registrert for HRV87 prøvene kultivert uten sialinsyre, hvor både $TCID_{50} 10^2$ og $TCID_{50} 10^3$ ble tilsatt ved start. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ikke fortynnet. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske replikatene.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50}eq$ (mean)	SD
a10 μ l 24t	1,0000000	C2	37,2	37,2	$>10^0 TCID_{50}$	18,60000
		C3	0			
b10 μ l 24t	1,0000000	C5	37,21	37,305	$>10^0 TCID_{50}$	0,09500
		C6	37,4			
a10 μ l 48t	1,0000000	D2	32,44	32,075	$x * 10^1 TCID_{50}$	0,36500
		D3	31,71			
b10 μ l 48t	1,0000000	D5	30,98	31,34	$1,0 * 10^1 TCID_{50}$	0,35500
		D6	31,69			
a10 μ l 72t	1,0000000	E2	27,59	27,24	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,35000
		E3	26,89			
b10 μ l 72t	1,0000000	E5	27,99	27,72	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,27500
		E6	27,44			
a100 μ l 24t	1,0000000	F2	34,31	33,98	$x * 10^0 TCID_{50}$	0,33500
		F3	33,64			
b100 μ l 24t	1,0000000	F5	35,57	36,77	$> 10^0 TCID_{50}$	1,19500
		F6	37,96			
a100 μ l 48t	1,0000000	G2	28,45	28,35	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,10500
		G3	28,24			
b100 μ l 48t	1,0000000	G5	26,27	26,39	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,12000
		G6	26,51			
a100 μ l 72t	1,0000000	H2	24,12	23,91	$x * 10^3 TCID_{50}$	0,21000
		H3	23,7			
a100 μ l 72t	1,0000000	H5	23,14	22,90	$x * 10^3 TCID_{50}$	0,24500
		H6	22,65			

Tabell.28 Presenterer C_t -verdiene registrert for HRV87 prøvene kultivert med 0,1 mM Neu5Ac, hvor både $TCID_{50}$ 10^2 og $TCID_{50}$ 10^3 ble tilsatt ved start. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ikke fortynnet. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske replikatene.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50eq}$ (mean)	SD
a10 μ l 24t	1,0000000	A1	36,67	36,06	$>10^0$ $TCID_{50}$	0,61000
		A2	35,45			
b10 μ l 24t	1,0000000	B1	37,52	0	$>10^0$ $TCID_{50}$	18,76000
		B2	0			
a10 μ l 48t	1,0000000	A3	30,89	30,975	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,08500
		A4	31,06			
b10 μ l 48t	1,0000000	B3	30,29	30,055	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,23500
		B4	29,82			
a10 μ l 72t	1,0000000	A5	26,11	25,845	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,26500
		A6	25,58			
b10 μ l 72t	1,0000000	B5	26,48	26,375	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,10500
		B6	26,27			
a100 μ l 24t	1,0000000	C1	32,06	32,385	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,32500
		D1	32,71			
b100 μ l 24t	1,0000000	C2	32,91	32,92	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,01000
		D2	32,93			
a100 μ l 48t	1,0000000	E1	25,98	25,97	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,01000
		F1	25,96			
b100 μ l 48t	1,0000000	E2	27,8	27,8	$x * 10^2$ $TCID_{50}$	0,00000
		F2	27,8			
a100 μ l 72t	1,0000000	G1	22,57	22,5	$x * 10^4$ $TCID_{50}$	0,07000
		H1	22,43			
a100 μ l 72t	1,0000000	G2	22,82	22,705	$x * 10^4$ $TCID_{50}$	0,11500
		H2	22,59			

Tabell.29 Presenterer C_t -verdiene registrert for HRV87 prøvene kultivert med 1,0 mM Neu5Ac, hvor både $TCID_{50}$ 10^2 og $TCID_{50}$ 10^3 ble tilsatt ved start. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ikke fortynnet. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske replikatene.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50eq}$ (mean)	SD
a10 μ l 24t	1,0000000	C3	37,31	37,215	$>10^0$ $TCID_{50}$	0,09500
		D3	37,12			
b10 μ l 24t	1,0000000	C4	0			
		D4	0			
a10 μ l 48t	1,0000000	E3	31,8	31,875	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,07500
		F3	31,95			
b10 μ l 48t	1,0000000	E4	31,68	32,07	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,39000
		F4	32,46			
a10 μ l 72t	1,0000000	G3	27,37	27,31	$x * 10^2$ $TCID_{50}$	0,06000
		H3	27,25			
b10 μ l 72t	1,0000000	G4	26,7	26,61	$x * 10^2$ $TCID_{50}$	0,09500
		H4	26,51			
a100 μ l 24t	1,0000000	C5	34,59	34,77	$x * 10^0$ $TCID_{50}$	0,18000
		D5	34,95			
b100 μ l 24t	1,0000000	C6	35,53	35,37	$x * 10^0$ $TCID_{50}$	0,16000
		D6	35,21			
a100 μ l 48t	1,0000000	E5	26,71	26,74	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,03000
		F5	26,77			
b100 μ l 48t	1,0000000	E6	27,74	27,57	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,17000
		F6	27,4			
a100 μ l 72t	1,0000000	G5	23,45	23,36	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,09500
		H5	23,26			
a100 μ l 72t	1,0000000	G6	23,43	23,51	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,08000
		H6	23,59			

Tabell.30 Presenterer C_t -verdiene registrert for HRV87 prøvene kultivert med 2,0 mM Neu5Ac, hvor både $TCID_{50}$ 10^2 og $TCID_{50}$ 10^3 ble tilsatt ved start. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA ikke fortynnet. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske replikatene.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50eq}$ (mean)	SD
a10 μ l 24t	1,0000000	C9	35,98	35,645	$>10^0$ $TCID_{50}$	0,33500
		D9	35,31			
b10 μ l 24t	1,0000000	C10	36,41	36,095	$>10^0$ $TCID_{50}$	0,31500
		D10	35,78			
a10 μ l 48t	1,0000000	E9	30,33	30,335	$x * 10^2$ $TCID_{50}$	0,00500
		F9	30,34			
b10 μ l 48t	1,0000000	E10	30,2	30,215	$x * 10^2$ $TCID_{50}$	0,01500
		F10	30,23			
a10 μ l 72t	1,0000000	G9	25,44	25,425	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,01500
		H9	25,41			
b10 μ l 72t	1,0000000	G10	24,43	24,48	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,05000
		H10	24,53			
a100 μ l 24t	1,0000000	C11	32,12	31,895	$x * 10^1$ $TCID_{50}$	0,22500
		D11	31,67			
b100 μ l 24t	1,0000000	C12	33,14	33,415	$x * 10^0$ $TCID_{50}$	0,27500
		D12	33,69			
a100 μ l 48t	1,0000000	E11	25,58	25,61	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,03000
		F11	25,64			
b100 μ l 48t	1,0000000	E12	26,2	26,105	$x * 10^3$ $TCID_{50}$	0,09500
		F12	26,01			
a100 μ l 72t	1,0000000	G11	21,4	21,545	$x * 10^4$ $TCID_{50}$	0,14500
		H11	21,69			
a100 μ l 72t	1,0000000	G12	21,32	21,445	$x * 10^4$ $TCID_{50}$	0,12500
		H12	21,57			

Tabell.31 Viser den gjennomsnittlige C_t -verdien for alle prøvene tilsatt samme viruskonsentrasjon og dyrket ved de samme betingelsene rundt mengde Neu5Ac tilsatt dyrkingsmediet. Tabellen viser sammenligninger mellom verdiene for de enkelte tidspunktene for å vise endring i mengden virus.

		24t	48t	72t	Δ 24-84	Δ 48-74
HRV87	TCID ₅₀ 10 ²	27,95	31,70	27,47	-3,75	4,23
	TCID ₅₀ 10 ³	35,37	27,36	23,40	8,01	3,96
0,1 mM SA	TCID ₅₀ 10 ²	27,41	30,51	26,11	-3,1	4,5
	TCID ₅₀ 10 ³	32,65	26,88	22,60	5,77	4,28
1,0 mM SA	TCID ₅₀ 10 ²	18,60	31,97	26,95	-13,37	5,02
	TCID ₅₀ 10 ³	35,07	27,15	23,43	7,89	3,72
2,0 mM SA	TCID ₅₀ 10 ²	35,87	30,27	24,95	5,6	5,32
	TCID ₅₀ 10 ³	32,65	25,85	21,49	6,8	4,36

Tabell.32 Viser en oversikt over registrert C_t -verdi for prøver isolert ved samme tidspunkt og med samme mengde virus tilsatt ved start, her TCID₅₀ 10² (0,0 mM). Oversikten viser målt signifikant forskjell mellom prøver som har hatt ulike forutsetninger for kultivering med ulik Neu5Ac konsentrasjon tilsatt dyrkingsmediet. Standardavvik og T-test presenteres med P-verdi satt til 0,05.

Sialinsyre konsentrasjoner (mM)		SD	T-test
0,1, 10 μ l (48t)	2,0, 10 μ l (48t)	0,83466966	0,4153859
1,0, 10 μ l (48t)	0,0, 10 μ l (48t)	0,44196825	0,470215993
0,1, 10 μ l (72t)	1,0, 10 μ l (72t)	0,54797211	0,1036385
0,1, 10 μ l (72t)	2,0, 10 μ l (72t)	0,70900348	0,079248314
1,0, 10 μ l (72t)	0,0, 10 μ l (72t)	0,45893218	0,2525613
2,0, 10 μ l (72t)	0,0, 10 μ l (72t)	1,33564591	0,1113306

Tabell.33 Viser en oversikt over registrert C_T -verdi for prøver isolert ved samme tidspunkt og med samme mengde virus tilsatt ved start, her $TCID_{50} 10^3$ (0,0 mM). Oversikten viser en sammenligning mellom prøver som har hatt ulike forutsetninger for kultivering med ulike Neu5Ac konsentrasjoner tilsatt dyrkingsmediet. Standardavvik og T-test presenteres med P-verdi satt til 0,05.

Sialinsyre konsentrasjoner (mM)		SD	T- test
0,1, 100 μ l (24h)	2,0, 100 μ l (24t)	0,61852521	0,9951398
1,0, 100 μ l (24h)	0,0, 100 μ l (24t)	1,20003125	0,7518889
0,1, 100 μ l (48h)	1,0, 100 μ l (48t)	0,72830282	0,4308084
0,1, 100 μ l (48h)	0,0, 100 μ l (48t)	0,98027978	0,689141736
1,0, 100 μ l (48h)	0,0, 100 μ l (48t)	0,7674379	0,811056221
2,0, 100 μ l (48h)	0,0, 100 μ l (48t)	1,04270981	0,125074863
0,1, 100 μ l (72h)	0,0, 100 μ l (72t)	0,5697313	0,113274406
1,0, 100 μ l (72h)	0,0, 100 μ l (72t)	0,40236022	0,93981898

4.6.3 Forsøk.3

HRV87 ble kultivert på samme måte i A549 celler, men med gradert Neu5Ac konsentrasjoner hvor en prøve ble isolert fra hver celleflaske. Dette ga totalt 12 rør med ekstrahert RNA, inklusive de biologiske replikatene. I tillegg ble det isolert en nullprøve som ble registrert til C_t -verdi lik 18,65. Alle isoleringer ble gjennomført etter 24 timer. **Tabell.34** viser en oversikt over C_t -verdier for biologiske replikater og tekniske replikater tilsatt sialinsyre og HRV87. For alle Neu5Ac konsentrasjonene ble det registrert høyere C_t -verdier etter 24 timer enn ved start. **Tabell.35** viser gjennomsnittsverdier av de enkelte konsentrasjonene og endring mellom disse fra start til 24 timer senere. Det ble gjennomført t-test for å undersøke om det var signifikant forskjell mellom prøvene, utregningene finnes i **Vedlegg.13**. I de tilfellene hvor det ble registrert signifikant forskjell presenteres i **Tabell.36**. Også her ble det undersøkt om den signifikante forskjellen skyldtes stor varians mellom de biologiske replikatene (**Vedlegg.13**)

$$1000 \mu\text{l} = \text{TCID}_{50} 10^4$$

Tabell.34 Presenterer C_t -verdier registrert for normal kultivering av HRV87 sammen med HRV87 kultivert med henholdsvis 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM og 1,0 mM sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet. For gjennomførelse av RT-qPCR ble RNA fortynnet 1:10. Tabellen presenterer også gjennomsnittlig C_t -verdi for de biologiske replikatene sammen med sammenligning av $TCID_{50}$ fra standardkurve og standardavvik. De biologiske replikatene representeres som a og b for de ulike tidene, mens de enkelte brønnene viser til de tekniske replikatene.

Prøve	Fortynning	Brønn	C_t	C_t mean	$TCID_{50eq}$ (mean)	SD
a1000 μ l	10,0000000	A1	27,96	27,72	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,24000
		A2	27,48			
b1000 μ l	10,0000000	B1	26,54	27,045	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,50500
		B2	27,55			
a10000 μ l 0,2 mM SA	10,0000000	A3	26,38	26,52	$x * 10^3 TCID_{50}$	0,14000
		A4	26,66			
b1000 μ l 0,2 mM SA	10,0000000	B3	25,05	25,01	$x * 10^3 TCID_{50}$	0,04000
		B4	24,97			
a1000 μ l 0,4 mM SA	10,0000000	A5	27,71	27,83	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,12000
		A6	27,95			
b1000 μ l 0,4 mM SA	10,0000000	B5	27,43	27,64	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,21000
		B6	27,85			
a1000 μ l 0,6 mM SA	10,0000000	C1	27,82	27,62	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,20000
		D1	27,42			
b1000 μ l 0,6 mM SA	10,0000000	C2	28,18	28,135	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,04500
		D2	28,09			
a1000 μ l 0,8 mM SA	10,0000000	E1	27,97	28,025	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,05500
		F1	28,08			
b1000 μ l 0,8 mM SA	10,0000000	E2	27,0	27,1	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,08000
		F2	27,18			
a1000 μ l 1,0 mM SA	10,0000000	G1	27,53	27,46	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,07000
		H1	27,39			
a1000 μ l 1,0 mM SA	10,0000000	G2	27,48	27,51	$x * 10^2 TCID_{50}$	0,03000
		H2	27,54			

Tabell. 35 Viser den gjennomsnittlige C_T -verdien for alle prøvene dyrket ved de samme betingelsene rundt mengde Neu5Ac tilsatt dyrkingsmediet til $TCID_{50} 10^4$ viruskulturer. Tabellen viser sammenligninger mellom verdiene for de enkelte tidspunktene for å vise endring i mengden virus. Verdiene som viser forskjellen mellom tid 0 og etter 24 timer tar utgangspunkt i C_T -verdi for null prøven lik 18,65

	24 timer	$\Delta HRV87\ 0 - 24$
HRV87 - $TCID_{50} 10^4$	27,3825	-8,7325
0,2 mM - $TCID_{50} 10^4$	25,765	-7,1150
0,4 mM - $TCID_{50} 10^4$	27,735	-9,0850
0,6 mM - $TCID_{50} 10^4$	27,8775	-9,2275
0,8 mM - $TCID_{50} 10^4$	27,5575	-8,9075
1,0 mM - $TCID_{50} 10^4$	27,485	-8,8350

Tabell.36 Viser en oversikt over registrert C_T -verdi for prøver isolert ved samme tidspunkt og med samme mengde virus tilsatt ved start, her $TCID_{50} 10^4$ (0,0 mM). Oversikten viser målt signifikant forskjell mellom prøver som har hatt ulike forutsetninger for kultivering med ulik Neu5Ac konsentrasjon tilsatt dyrkingsmediet. Standardavvik og T-test presenteres med P-verdi satt til 0,05.

Sialinsyre konsentrasjoner (mM)		SD	T-test
0,0, 1000 μ l	0,4, 1000 μ l	0,43047757	0,23214829
0,0, 1000 μ l	0,6, 1000 μ l	0,48992346	0,31452256
0,0, 1000 μ l	0,8, 1000 μ l	0,50480194	0,48628319
0,0, 1000 μ l	1,0, 1000 μ l	0,3734949	0,75010053
0,4, 1000 μ l	0,6, 1000 μ l	0,26052531	0,62595944
0,4, 1000 μ l	0,8, 1000 μ l	0,37292551	0,48271643
0,4, 1000 μ l	1,0, 1000 μ l	0,19111515	0,14440413
0,6, 1000 μ l	0,8, 1000 μ l	0,42581539	0,51510437
0,8, 1000 μ l	1,0, 1000 μ l	0,33931687	0,81868333

5 DISKUSJON

Arbeidet som er utført i denne oppgaven har i all hovedsak vært å etablere en RT-qPCR prosedyre for å kunne detektere HRV87 og vurdere om metoden kan anvendes for *in vitro* studier. Dette har blitt gjort med utgangspunkt i MIQE retningslinjene. I denne oppgaven er inkubasjonstid av sialinsyren før samhandling med virus, inkubasjonstiden til viruskultur og mengde viruskultur optimalisert for *in vitro* celledyrkingsforsøkene.

Metodeutvikling

I utarbeidelse av RT-qPCR ble det besluttet å utarbeide ett-steps RT-qPCR fordi fordelene var (begrenset kontaminering, enkelhet, sensitivitet og high-throughput prøvescreening) bedre enn ulempene sammenlignet med to-steps RT-qPCR (Wacker & Godard, 2005). Ved to-steps analyse ville negativ kontroll gjennomføres uten revers transkriptasen (NoRT kontroll). For ett-steps reaksjoner tilsettes alle komponenter i samme brønn hvor omdannelse fra RNA til det mer stabile cDNA skjer internt i et lukket miljø og derfor ekskluderes vurdering av revers transkriptase.

I metodeutviklingen ble positive og negative kontroller inkludert. Kontrollene vurderes basert på kvalitet, med andre ord forteller de noe om hvilke forutsetninger som gir utgangspunkt for prøveresultatene. Registreres avvik i kontrollene kan dette skyldes feil ved normale vekstvilkår og prøvene må vurderes og repeteres sammen med nye kontroller. Kontroller uten templat (NTC) har blitt benyttet for å kontrollere renheten til reagensene. Dersom brønner med NTC registrerer C_T -verdi vil det tyde på kontaminering, noe som har viser viktigheten ved kontroller for å eliminere eventuelle feil ved prøven.

Mastermiks tilsatt referanse dye ROX har blitt brukt gjennom hele arbeidet. ROX fungerer som en intern kontroll som normaliserer forstyrrende fluorescenssignaler som påvirker replikater. Det vil si at ROX brukes til å normalisere prøveresultatene. Bruk av spesifikke primere minimerer mulige dannelser av uspesifikke biprodukter som primer-dimere (Eurogenetec). Hydrolyse probe med minor groove binding (MGB) ble valgt på bakgrunn av stabiliteten gjennom tidligere studier med RT-qPCR (Do et al., 2010). Funksjonaliteten til RT-qPCR metoden ble vurdert sammen med reagensene, dette inkluderte funksjonaliteten til primerne, proben og mastermiksen (NTC). Funksjonaliteten ble vurdert ved å bruke ekstrahert RNA fra virusvial i et direkte testoppsett på PCR. Normalt sett inkluderes gDNA kolonne som en del av

RNeasy Mini kit prosedyren fra Qiantabio. Dette var imidlertid ikke nødvendig ved ekstrahering av RNA siden prøvene ikke inneholdt DNA. Derfor ble ekstrahering av RNA i denne studien gjennomført uten gDNA kolonne. RNA ble isolert fra vial og prøver for videre ekstrahering. Prosedyren for RNA ekstraksjon ble gjennomført direkte på en skånsom måte for å ivareta kvaliteten. Alle RNA-prøver ble fryst ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. På bakgrunn av denne håndteringen, men også ved å gjennomføre innledende forsøk for å undersøke kvalitet og mengde RNA, så ble det med stor sikkerhet vurdert at kvaliteten til RNA i dette arbeidet ble opprettholdt gjennom hele prosjektets kontinuitet. For å kontrollere at ekstraksjon av RNA resulterte i RNA, ble Qubit 4.0 brukt til å måle RNA konsentrasjon (data ikke vist). Denne typen kontrollpunkt hindrer unødig arbeid og bortkastede reagenser dersom ekstrahert materiale hadde blitt satt opp direkte i en PCR-analyse for så å finne ut at RNA ikke var til stede. Qubit brukes normalt som et kvalitetsparameter for å måle mengde RNA i en prøve. I denne studien har ikke denne typen målinger blitt gjort. Fokuset i studien har vært å se på endring i mengde virus ved ulike tidspunkt for å kunne se på endring over tid.

Utover funksjonaliteten til reagensene ble det gjennomført en optimalisering av primer og probe konsentrasjoner for å tilpasse disse etter behovet for HRV87 deteksjon. De to konsentrasjon sammensetningene (200 nM / 300 nM og 300 nM / 400 nM med henholdsvis FWD og RWD primer) ble vurdert som det beste forholdet mellom primerne. Begge disse kombinasjonene ble derfor satt opp for optimalisering av probe konsentrasjonen. Resultatet viste C_t -verdier i nærheten av hverandre, alle innenfor grenseverdi. Konsentrasjonene ble bestemt til 300 nM forward primer, 400 nM revers primer og 300 nM probe fordi kombinasjonen ga de laveste konsentrasjonene som klarte å registrere C_t -verdi, med andre ord $C_t \leq 30$ som viste best reproduserbarhet. Valget ble også basert på amplifiseringskurven (slope) og repliater med liten varians mellom målt C_t -verdi.

HRV87 fra ATCC ble kultivert ved å tilsette viruset til A549 celler. Ved oppstart av viruskultivering ble HRV87 plassert til inkubasjon ved ulike temperaturer for å se om viruset utvikles seg ulikt. Temperaturene som ble vurdert var basert på virusets optimale vekstforhold, $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ATCC, 2021b), og cellenes optimale vekstforhold, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $5\text{ }\%$ CO_2 (ATCC, 2021a). Cellene viste tilnærmet lik vekst ved $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ som ved normale forhold, mens viruset ikke viste like stabil utvikling ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $5\text{ }\%$ CO_2 . Vurderingen for vekstvilkårene ble basert på observert vekst og morfologi hos cellene, og utviklingen av CPE i viruskulturen. Valget falt på

at alle inkubasjoner med HRV87 skulle gjøre ved 33 °C. Det ble tydelig ved kontinuerlig kontroll av viruskulturen, at rundt dag tre til fire var omtrent 100 % cytopatisk effekt (CPE) i celleflaskene. Det vil si at det ikke lenger var nok celler til å opprettholde viruskulturen. Virus ble lagret som virusstock, mens en liten andel virus ble rekultiveres til ny cellekultur.

Virus titer assay, TCID₅₀ ble gjennomført for å bestemme en verdi for hvilken HRV87 konsentrasjon som førte til infeksjon i 50 % av cellene. TCID₅₀ verdien ble kalkulert basert på mengde lyserte celler ved de ulike konsentrasjonene. Fortynningsfaktoren for 50 % infiserte celler var på grensen til den sjette fortynningen, men beregningene for denne testen resulterte i TCID₅₀ for HRV87 lik 10⁻⁵. RT-qPCR metoden ble validert ved å etablere en standardkurve fra en fortynningsrekke med utgangspunkt i virusstock. To standardkurver ble generert fra to forskjellige analysetidspunkt. Gjennomsnittsverdier for alle standardene fra begge preparatene var lineære for hele fortynningsrekken med R²-verdier på 0,9966 eller 0,9979 som viser til en stabil metode. Alle avvik var innenfor en standardfeil på den beste minste kvadratiske regresjonslinjen (X. Lu et al., 2008). Fra standardkurven leses 10⁻⁵ fortynning tilsvarende virusstock lik TCID₅₀ 1⁰ C_t 35, 42 (STD1) og 35,66 (STD2). De aller vanligste TCID₅₀ verdiene ligger normalt sett på et anvendelsesområde mellom 2 TCID₅₀ tilsvarende 10⁻³ fortynning og 3 TCID₅₀ tilsvarende 10⁻² fortynning. I denne studien ble det valgt å se på effekten av flere konsentrasjoner, hvor 10² (10 µl), til og med 10⁴ (1000 µl) ble undersøkt.

I følge MIQE retningslinjene (**Vedlegg.2**) settes prøver opp som triplikater for å kunne validere RT-qPCR metoden. På grunn av usikkerhetene knyttet til gangen i forskningsprosjektet som en ringvirkning av SARS-Cov-2 som har gjort det vanskelig med tilgang til reagenser, ble det valgt å sette opp biologiske replikater. For biologiske replikater ble det også satt opp tekniske replikater som ga totalt fire C_t-verdier for hver enkelt prøve. Dette ble fremgangsmåten for arbeid utført i denne studien. Ved registrert avvik, ble resultater kastet, på samme måte som ved feil i en av triplikatene til en prøve. Med et annet utgangspunkt hadde det blitt gjennomført triplikater. Likevel, basert på det som har blitt gjort viser verdiene fra intraassay variasjon relativt stabile verdier, hvor begge standardkurvene har tilfredse R²-verdier. Spesifisiteten til metoden ble validert basert på at alle praktiske formål i denne studien har blitt utført med viruskultur fra sterile forhold. Det ble med stor sikkerhet antatt av proben primært ville detektere HRV87 (Thermofisher). Det asymmetriske forholdet mellom forward primer og revers primer kan også ha påvirket metodens spesifisitet fordi det hindrer dannelse av uønskede produkter. Tester for å analysere om reagensene kan detektere andre målsekvenser basert på

proben spesifisitet til målgenet burde blitt inkludert for å kunne utbedre den analytiske spesifisiteten.

For det praktiske arbeidet utført i denne studien har ikke fokus på disse parameterne vært like sentrale siden utgangspunktet var rendyrket kulturprøver. For videre bruk av metoden bør både sensitivitet og spesifisitet undersøkes mer grundig, spesielt ved bruk av deteksjon av HRV87 fra andre typer prøver. Ved analyse av laboratorieprøver, for eksempel ved påvisning av andre rhinovirus varianter eller SARS-Cov-2, så vil ikke prøvene kunne valideres basert på ren deteksjon. Ved laboratorieprøver vurderes spesifisitet, men også sensitiviteten basert på forholdet mellom sann positiv og falsk negativ svar ((Gambarino et al., 2009), (Barra, Santa Rita, Mesquita, Jácomo, & Nery, 2020)). Spesifisiteten til både primerne og proben kan undersøkes ved å gjennomføre analyser av beslektede arter. Ved PCR analyser henger forarbeidet for reaksjonene sammen med pipettering og behandling av reagenser som også påvirker effektiviteten og presisjonen til analysen. Feilpipettering kan føre til inhiberte prøver og, eller krysskontaminering som gjør at arbeidet må repeteres. En tydelig svakhet i denne studien er at det ikke har blitt gjennomført flere repetisjoner som inkluderte flere paralleller, men dette har blitt begrenset av prosjektets natur.

I starten av *in vitro* celledyrkingen ble to epitelcellelinjer, Calu-3 og A549 celler, etablert som utgangspunkt for oppgaven. Begge disse cellelinjene ble dyrket ved 37 °C og 5 % CO₂. Calu-3 cellene viste tidlig dårlig vekst sammenlignet med utviklingen i A549 kulturen. A549 cellene viste 90 % konfluens uten at dyrkingsmedium ble misfarget, mens Calu-3 cellene ikke viste konfluens over 70 % og uten unntak fikk alle cellene misfarget dyrkingsmediet på kort tid. Fordi vekstbetingelsene for A549 cellene var betraktelig bedre enn for Calu-3 cellene, så ble det bestemt å fortsette arbeidet med A549 celler. Begge cellene gjennomgikk proliferasjonstest for å se på levedyktigheten. Hos Calu-3 cellene var det gjennomgående at det ble registrert liten andel prolifererte celler, noe som også var påvirket av at det i utgangspunktet var lite celler ved start på grunn av tidkrevende utvikling. De to cellelinjene viste ulik utvikling og på bakgrunn av begrensningen satt for disponeringen av tid, ble Calu-3 cellene forkastet. Alt videre arbeid tok utgangspunkt i A549 cellene. For celledeling ble trypsin benyttet for å løsne cellene fra underlaget. Vanligvis er det tilstrekkelig med omtrent tre minutter for trypsin til å løsrive og separere celler. A549 cellene viste robusthet med minimum 10 minutter med trypsin for en fikk løsrivende effekt. Trypsin og evnen det har til å løsne cellene fra underlaget, avhenger av cellelinjen, noe som ble tydelig i dette tilfellet. Det ideelle hadde vært å gjennomføre en

optimalisering av løsrivingen ved å teste ulike konsentrasjoner og virkningstid, noe som ville bidratt til bedre grunnlag for celledeling.

A549 cellenes levedyktighet

Proliferasjonstest ved bruk av flowcytometri ble brukt til å se på evnen A549 cellene har til å gjennomgå celledeling ved påvirkning av sialinsyre. De første rundene med celleproliferasjonstest ble brukt til å utbedre prosedyren ved å endre reagenser og tidsintervallene for inkubasjonstrinnene. Brdu inkubasjon ble utvidet fra en time til to for å sikre inkorporering i cellene. Det samme ble gjort for inkubasjonstrinnet med DNase, også her ble inkubasjonstiden utvidet til to timer. I de innledende rundene ble Brdu alikvoter fra tidligere benyttet for sammenligning med ny direkte laget Brdu. Ved ferdig utarbeidet prosedyre, ble både Calu-3 celler og A549 celler undersøkt. Neu5Ac ble inkubert samtidig som Brdu og hadde dermed henholdsvis en og to timer inkubasjon på cellene. Det ble klart at to timer inkubasjon med Brdu og DNase utbedret mengde prolifererte celler med 20 %. På bakgrunn av dette ble videre tester gjennomført med optimaliserte inkubasjonstrinn.

For å validere resultatene fra flowcytometri ble både gate satt, de ulike skalaene justert og kompensasjonsjusteringer utført for alle prøvene. Disse justeringene ble gjort for å presisere de analytiske verdiene fra resultatene. Gate velges for å bestemme hva som skal undersøkes. I dette tilfellet ble hele populasjonene satt som gate P1. Samtidig ble gate P2 satt som intern negativ kontroll som viste de cellene som ikke gjennomgikk proliferasjon. Skala ble justert for å tilpasse analyseområdet. Kompensasjonsjusteringer ble også gjort for å sikre fordeling av celler og forhindre for stor påvirkning av skalaene satt. Ved å sikre spredningen kunne cellulære hendelser enklere skilles fra det som anses som rusk.

BD pharming prosedyren ble gjennomført for Calu-3 celler med et bredt spekter med Neu5Ac konsentrasjoner fra 0,0 mM til 100 mM som ble tilsatt dyrkingsmediet. Resultatene viste tydelig at konsentrasjoner utover 10 mM har toksisk påvirkning på cellene og dermed hindrer celleproliferasjon (data ikke vist). For å kunne vurdere påvirkningen av 10 mM Neu5Ac og høyere, måtte tilpasninger gjøres for å regulere sialinsyrens påvirkning på vekstvilkårene til cellene. pH målinger ble gjort for de enkelte Neu5Ac konsentrasjonene brukt i dette arbeidet. Målingene bekreftet et skifte i pH målt ved 10 mM, lavere konsentrasjoner ble målt til pH omkring 7 og utgjorde derfor liten påvirkning på cellene. 100 mM Neu5Ac ble målt til pH lik 2,49, så lav konsentrasjon vil hemme all vektutvikling for både A549 cellekulturen og HRV87.

Det ble også gjennomført vekstkontroll av dyrkingsmediet tilsatt sialinsyre ved å måle pH både før og etter inkubasjon med A549 celler og HRV87. Målinger gjort av sialinsyre tilsatt dyrkingsmediet som inkluderte verdier fra 0,01 mM til 10 mM Neu5Ac viste liten forskjell i pH før inkubasjon sammenlignet med etter inkubasjon. Denne typen reguleringer er viktig for å kontrollere at cellekulturer med og uten HRV87 og Neu5Ac ikke hemmer normale forhold. Dersom pH målingen fra vekstkontroll hadde resultert i større utslag så viser det at sialinsyren vil påvirke bufferkapasiteten i dyrkingsmediet som vil ha en direkte innvirkning på vekstvilkårene til celle- og viruskultur. For å kunne vurdere effekten av Neu5Ac utover 10 mM sett på A549 cellenes levedyktighet ble det gjort en pH justering ved dråpevis tilsetning av NaOH. NaOH er en sterk base og små dråper har sterk påvirkningen på pH. I dette arbeidet ga 20 dråper med NaOH en pH målt til 7,51 som ble brukt som utgangspunkt for videre fortyninger av 100 mM Neu5Ac. Denne reguleringen vil trolig være ulik ved neste forsøk på justering fordi størrelsen på hver enkelt dråpe vil være avgjørende.

For A549 cellene ble pH tilpasningen gjort før proliferasjonstest. Alle prøvene som ble analysert ble satt opp som duplikater. Resultatene fra måling med flowcytometri ble vurdert ved å se på prosentandel celler som gjennomgikk proliferasjon. Resultatene viste at 0,01 mM sialinsyre med 29,2 % prolifererte celler, og 1,0 mM sialinsyre med 27,2 % ga bedre proliferasjon sammenlignet 14,8 % prolifererte celler ved normale forhold. Resultatene viste en gradvis økning frem til 0,01 mM, før lavere prosentandel prolifererte celler ved 0,1 mM Neu5Ac tilsatt, men flere cellulære hendelser ble registrert for prøvene tilsatt 1,0 mM Neu5Ac. Fra 1,0 mM sialinsyre ble det registrert en gradvis nedgang i mengde celler som proliferert i takt med høyere konsentrasjoner av sialinsyre. Det blir helt tydelig gjennom denne testen at Neu5Ac ikke har en negativ effekt på celledeling. Alle prøvene hvor sialinsyre ble tilsatt viste bedre proliferasjon sammenlignet med A549 dyrket i normal kultur, med 14,8 % prolifererte celler. I denne studien ble det ikke gjort videre forsøk med pH tilpassede sialinsyre konsentrasjoner. For videre arbeid hadde det blitt nødvendig å repetere gjennomførelsen av A549 cellene og da inkludert både ekstern negativ kontroll sammen med den interne negative kontrollen for ytterligere validering av resultatene.

For gjennomførelse av MTT assay ble de samme pH justerte Neu5Ac konsentrasjonene tilsatt som ved gjennomførelse av BD prosedyren av A549 cellene. Ut ifra disse resultatene ser det ut til at noen av cellene ble borte trolig gjennom vasketrinn ved avsluttende inkubasjon med sialinsyre. Målingene viser tydelig økning i levedyktigheten til celler tilsatt 1,0 mM Neu5Ac i

dyrkingsmediet mot de andre sialinsyre konsentrasjonene. I utførelsen av prosedyren ble det brukt DMEM medium fremfor DMEM/F-12 medium som kan ha vært en medvirkende faktor til resultatet. DMEM/F-12 er medium 1:1 med DMEM og Ham's F12 medium. Denne blandingen gjør mediet mer næringsrikt (SigmaAldrich, 2021b). DMEM medium ble brukt for å få gjennomført testen innenfor tidsrammene, i mangel på DMEM/F-12 medium. Hadde det vært mer tid i dette prosjektet, så ville en utbedret prosedyre og vasketrinnet, for å fjerne restene av sialinsyren. Avgjørende informasjon om sialinsyren Neu5Ac basert på resultatene blir presentert. Neu5Ac tilsatt cellekultur virker ikke hemmende på levedyktigheten, men heller fremmende basert på antall levende celler registreres som høyere for disse prøvene sammenlignet med prøver fra normale vekstvilkår. Dette ble også vist gjennom celleproliferasjonstest med flowcytometri. Ved BD pharming prosedyren for celleproliferasjon, viser resultatene at A549 celler dyrket uten tilstedeværelse av Neu5Ac sammenlignet med Neu5Ac til stede, uavhengig av konsentrasjonen observeres en økning i andel prolifererte celler. Å vite at sialinsyren ikke degraderer cellenes utvikling er grunnleggende og en viktig observasjon gjort i denne studien og for videre arbeid med sialinsyre som tilsetningsstoff.

In vitro celledyrkningsforsøk

For å bedre forstå effekten av Neu5Ac på både A549 og HRV87, ble det utarbeidet ulike *in vitro* celledyrkningsforsøk. I alle forsøkene ble det etablert rene cellekulturer som negative kontroller. Samtidig ble alle forsøkene inkludert positive kontroller med A549 celler og HRV87 for å se på normal virusreplikasjonen. På denne måten kunne CPE effekt observert med sialinsyre til stede, vurderes på et bedre grunnlag. De negative kontrollene viste 0 % CPE og viste til normale vekstvilkår for A549 cellene. Positiv kontroll viste normal utvikling av CPE som skjedde fortløpende. Det vil si at ingen av kontrollene viste avvikende tilfeller. Det samme gjaldt for RNA ekstraksjonene gjort for de enkelte prøvene. Ved å sette opp RNA direkte i PCR uten kontrollering av verifisert RNA så kunne tid og reagenser gått tapt. Bruk av Qubit hindret dette ved å måle tilstedeværelsen av RNA som et kontrollpunkt. For hver prøve har det blitt ekstrahert RNA satt opp som biologiske replikater og tekniske replikater som gir innsikt i RT-qPCR metodikkens presisjon. Denne typen presisjon var spesielt nødvendig i dette tilfellet hvor interessen har vært å se på de relative endringene over tid basert på fire analyseverdier for hver prøve.

Ved start ble det satt opp et innledende forsøk (3.12.1 *Innledende forsøk*) for å se på rammeverket for undersøkelsene. Det ble gjort en vurdering om epitelcellene som skulle benyttes gjennom arbeidet skulle være Calu-3 celler eller A549 celler. Forsøket ble utledet ved å bruke Calu-3 celler i 6-brønn-plate sammen med 1,0 mM, 10 mM og 100 mM sialinsyre. Ved å velge såpass ulike konsentrasjoner ble det enklere å vurdere ved hvilket nivå eventuelle justeringene måtte gjøres. Kultivering av HRV87 hadde vist fullstendig CPE ved skiftet mellom dag tre og fire. Dette betyr at utover 96 timer vil det ikke kunne registreres større mengde virus sammenlignet med mengden virus ved 96 timer inkubasjon. Basert på denne informasjon ble tidspunktene for prøveuttak angitt til 48 timer, 72 timer, og 96 timer.

Omtrent 46 timer ut i inkubasjonstiden ble de to cellebrettene undersøkt for å kontrollere utvikling. Ved første øyekast var det enkelt å se at brønnene så betraktelig mye tørrere ut enn ved inkubasjonsstart. I mikroskopet ble begge brettene kontrollert hvor det ble oppdaget alvorlige feil og mangler. Noen av brønnene var uttørket, som trolig var en sammenheng mellom for lite vann i inkubasjonsskapet, temperatur og for lite volum i brønnene. I de brønnene hvor det fremdeles var noe volum hadde store deler av cellene som ble sådd, gått i apoptose allerede etter så kort tid ut i forsøket. Flere av brønnene hadde også endring i fargen på mediet. I de tilfellene hvor det ble observert celler, så var disse enkeltstående eller i mindre kolonier som er uvanlig for morfologien til Calu-3 cellene. Det var gjentagende at i de brønnene tilsatt 10 mM og 100 mM sialinsyre ble det observert minst eller svært få celler i live. Cellene hadde tydelig vært der for fimbrinnettverk var til stede, noe som indikerte celledeling ved et tidligere stadie.

På bakgrunn av disse observasjonene ville det vært umulig å isolere RNA ved de tidspunktene som ble satt. Summen av mengden avvik avdekket førte til at det ble besluttet å avlyse forsøket. Indikasjonen som ble gitt ved 46 timer viste at rammeverket for videre arbeid måtte utbedres. Konsentrasjonene av sialinsyre fra 10mM og over, hadde toksisk effekt på cellene og bidro til celledød raskere enn at utviklingen kunne undersøkes. I det innledende forsøket ble sialinsyre og viruskultur tilsatt samtidig. Calu-3 cellene i seg selv fungerte ikke gunstig i et slik tidkrevende forsøk hvor effekt over tid skulle undersøkes. Det ble derfor besluttet å se bort i fra Calu-3 cellene helt og heller bruke A549 celler som også er lungeepitelceller med bedre vekstbetingelser. Cellebrettene med lite og begrensende volum var ugunstige å bruke i forsøk. For videre arbeid ble det besluttet å erstatte 6-brønn-plate med små celleflasker (25 cm² VWR®). På denne måten var miljøet sikrere, mindre sjanse for kontaminering ved prøve uttak

og generell bedre kontroll på omstendighetene. De toksiske konsentrasjonene av sialinsyre ble tatt hensyn til ved å heller vurdere en rekke konsentrasjoner under 10 mM. Viruskonsentrasjonen som ble tilsatt var 300 µl, tilsvarende 10^5 TCID₅₀ til 3 ml volum i brønnene. Dette var høy konsentrasjon av viruskultur i utgangspunktet og ble nedregulert i forhold til totalvolumet i de små celleflaskene.

For videre arbeid (3.12.2 *Forsøk.1*) ble det avgjørende å gjøre undersøkelser rundt RT-qPCR metodikken som ble utarbeidet. Tilsettingen av sialinsyre ble nedjustert og konsentrasjonene som ble valgt var henholdsvis 0,1 mM, 1,0 mM og 2,0 mM. Det ble valgt en relativ stor konsentrasjon (1000 µl, tilsvarende TCID₅₀ 10^4) av HRV87 som ble tilsatt ved start for å sikre tilstrekkelig mengde for deteksjon ved RT-qPCR. Metoden viste ingen problemer med å detektere virus eller små variasjoner fra Neu5Ac tilsatt. Ved å benytte tilsetningsstoffer kan effektiviteten til metoden endres, men ble vurdert som stabil basert på deteksjon av HRV87 i alle prøvene uavhengig av Neu5Ac. Dette forsøket forsterket informasjonen om at Neu5Ac verken påvirker dyrkingsvilkårene for cellene eller for normal viruskultivering.

Ut ifra C_t-verdiene registrert så det tilsynelatende ut som at Neu5Ac har bremsede effekt på virus replikasjon ved 72 timer sett mot mengde virus registrert etter 48 timer. Forskjell i målt mengde virus etter 72 timer og 96 timer var små på grunn av tilnærmet 100 % CPE allerede etter 72 timer. Det betyr at det ved 72 timer etter virus er tilsatt så skjer det en utfelling tilnærmet 100 % CPE. Kun ved 1,0 mM Neu5Ac og i positiv kontroll uten sialinsyre måles det mindre mengde virus etter 96 timer mot 72 timer. Ved tilnærmet fullstendig lysering observert ved 72 timer var det tydelig at sialinsyre konsentrasjonene tilsatt ikke har hatt noen effekt på virusreproduksjon ved videre inkubasjon. Effekten av sialinsyre sett fra 48 timer til 72 timer kan ikke verifiseres siden prøvene er tatt fra ulike celleflasker. De biologiske prosessene i flaskene vil være ulike og uten prøve isolert fra samme flaske over tid så kan man heller ikke vurdere den relative endringen sett som effekt. Derfor måtte nærmere undersøkelser gjøres ved å ta prøveuttak fra samme miljø for å vurdere den egentlige endringen.

En annen viktig faktor her er om spekteret med sialinsyre konsentrasjoner brukt er for smalt sammenlignet med mengden viruskultur tilsatt. Forsøket gikk som forventet, men hadde spesielt en avgjørende faktor som ikke gjorde det mulig å si noe om de relative endringer. Mengden virus tilsatt ved start sammen med de lave sialinsyre konsentrasjonene kan ha gjort det vanskelig å vurdere effekt uansett fordi mengden virus var for stor ved start. Virus vil ikke

være til stede i kroppen kontinuerlig sammen med stabile nivåer av sialinsyre. Disse reguleringene tas hensyn til ved å gjøre fortyndinger av viruskulturen slik at mengden HRV87 som tilsettes ved start blir redusert. Det vil derfor være fordelaktig å tilsette sialinsyre til cellene før viruskulturen.

Ved å tilsette sialinsyre på denne måten ville det være sialinsyre til stede både i mediet og i cellene. Ved å sette disse premissene ville vurderingen av Neu5Ac evne til å påvirke virus replikasjon bli sett nærmere på (3.12.3 Forsøk.2). Det ble vurdert om sialinsyren tilsatt cellekulturen før viruset kunne skape en mer realistisk effekt. Fra tidligere tester av cellene levedyktighet hadde det blitt brukt både en og to timer inkubasjonstid med sialinsyre som begge ga forbedret celleproliferasjon. Det ble derfor bestemt at sialinsyre ble tilsatt cellekulturen to timer før viruskulturene. Etter to timer ble både TCID₅₀ 10² (10 µl) og TCID₅₀ 10³ (100 µl) tilsatt og inkubert i ytterligere to timer før mediet ble fjernet fra celleflaskene. Monolaget med celler ble vasket for å sikre at fire viruspartikler elimineres før videre inkubasjon med sialinsyre. Tidsintervallet for inkubasjon av viruskultur ble vurdert basert på at viruset måtte være til stede en viss tid slik at noen av viruspartiklene kunne gjennomgå replikasjon, men også hindre at mengden virus ble for stor. For kort inkubasjonstid kunne resultert i så få viruspartikler at det ikke ville vært et utgangspunkt for å se på relative endringer.

Resultatene viste sammenlignet med C_T-verdiene for de samme tidspunktene i forrige forsøk, at redusert inkubasjonstid for viruskulturen og Neu5Ac tilsatt i forkant av HRV87 kultivering viste mindre mengde virus målt i dette forsøket. C_T-verdiene viste signifikante forskjeller mellom enkelte av sialinsyre konsentrasjonene. Det ble gjennomført t-test for å finne ut om det riktignok var registrert signifikante forskjeller mellom SA konsentrasjonene. For prøvene med TCID₅₀ 10² isolert etter 24 timer var det mangelfulle verdier som gjorde at disse ble kastet og ikke vurdert. For de Neu5Ac konsentrasjonene som ga verdi tilsvarende signifikante forskjell, ble videre vurdert ved å se på de biologiske parallellene. For stor varians mellom de biologiske parallellene ga signifikante forskjeller. Variansen mellom parallellene for 0,1 mM SA med 10 µl ved 48 timer, 10 µl HRV87 ved 48 timer, 0,1 mM SA med 100 µl ved 24 timer, 2,0 mM SA med 100 µl ved 24 timer, 1,0 mM SA med 100 µl ved 24 timer, 100 µl HRV87 ved 24 timer, 1,0 mM SA med 100 µl ved 48 timer og 100 µl HRV87 ved 48 timer var store med nesten en helt C_T-verdi som skilte de to. Dersom det ikke hadde vært signifikante forskjeller mellom de to biologiske replikatene, så ville de signifikante forskjellene mellom sialinsyre konsentrasjonene blitt validert. Ved noen av tilfellene ble det registrert store forskjeller i C_T-

verdi mellom de biologiske replikatene, selv om det ikke var signifikant forskjell, men heller en reel forskjell. I og med at parallellene innad i en flaske er lik så er det åpenbart at det er en reel forskjell i reproduksjon av virus mellom flaskene, og derfor er det ingen variasjoner som er så store at det viser åpenbare effekter innenfor det arbeidet som er presentert i denne studien.

Det er tydelig ved å se på C_t -verdiene at den største biologiske påvirkningen skjer mellom 48 og 72 timer for det er her virus tas opp i celler og reproduseres. For å bedre forstå hva som skjer frem til 24 timer og mekanismene bak opptak og binding til sialinsyre reseptoren, så må ytterligere forsøk gjennomføres. Men som vist i dette forsøket må det være mer virus til stede ved start sett på resultatene ved 10 μ l og 24 timer som ikke har gitt resultater og 100 μ l etter 24 timer. Selv om det har blitt tilsatt gitt mengde virus til alle flaskene, så vil det være forskjeller på hvordan de biologiske mekanismene med opptak av virus og inne i cellen, reproduksjon og CPE utvikles. Dette viser at det er viktig å gå videre inn på å studere variasjonene. Vekstbetingelsene og cellenes morfologi endrer seg noe, men for lite til å si noe annet enn at morfologien ser lik ut med Neu5Ac tilsatt dyrkingsmediet sammenlignet uten Neu5Ac tilsatt.. Samtidig blir det tydelig i dette forsøket at sialinsyren ikke påvirker deteksjon av HRV87. Metoden har vist analytisk spesifisitet og kan valideres for videre bruk for å se bedre på påvirkningen Neu5Ac har på viruset.

Neu5Ac konsentrasjonene testet i forsøk.1 og forsøk.2 viser forskjell mellom 0,1 mM og 1,0 mM Neu5Ac. For videre arbeid graderes Neu5Ac konsentrasjonene som undersøkes for å dekke konsentrasjoner mellom 0,1 og 1,0 mM. C_t -verdier fra forsøk.2 viste observerte små rundt 1,0 mM sialinsyre som velges som høyeste konsentrasjon for videre arbeid. De største forskjellene mellom tidsintervallene var ved 0,1 mM sialinsyre tilsatt. Det kan tenkes at lavere konsentrasjoner har størst effekt på virusopptak i cellene og har størst positiv effekt sett på den relative endringen over tid. Dette ga grunnlag for å utarbeide ytterligere et forsøk (3.12.4 *Forsøk.3*) som vurderte graderte sialinsyre konsentrasjoner sett på ved start og etter 24 timer. Sialinsyre konsentrasjoner allerede testet ga ingen entydige svar, men indikerte endringer ved lave konsentrasjoner. Og fordi høyere konsentrasjoner har vist seg å være toksiske, så ble sialinsyren nedjustert til en noe mer dekkende gradient med 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM og 1,0 mM. De små endringene i konsentrasjonene ble også vurdert mot RT-qPCR metoden som var etablert og om metoden klarte å detektere de små forandringer ved dyrkingsvilkårene. Fordi prøvene fra forrige forsøk tilsatt $TCID_{50} 10^2$ ikke ga gyldige resultater så ble det avgjort å øke viruskonsentrasjon ved start. Ved start ble $TCID_{50} 10^5$, lik C_t 18,65 fortynnet i

dyrkingsmediet til TCID₅₀ 10⁴. Etter 24 timer ble det registrert virus med C_t-verdi rundt 27. Dette sammenlignet med verdier i standardkurven tilsvarer TCID₅₀ 10². Som viser til at det har skjedd mye i løpet av denne tiden. C_t-verdiene viser at fra start til 24 timer, skjer det en økning i mengden virus hos alle celleflaskene. Resultatene viser ingen åpenbar effekt på tilstedeværelse av sialinsyre, men for prøvene tilsatt 0,2 mM og 0,8 mM sialinsyre er det ingen signifikant forskjell mellom de biologiske replikatene som betyr at observert effekt også kan måles som relativ endring over tid. Dette gir indikasjoner på at målt effekt av Neu5Ac i dyrkingsmediet vil påvirke viruskulturen i løpet av det første døgnet.

Gjennom forsøkene i denne studien ble det tydelig at høye konsentrasjoner med viruskultur gir større vekst fra start til døgn én, og mindre vekst til døgn to. Mens lavere konsentrasjoner med viruskultur gir lavere vekst til første døgn og større vekst til neste. I de forsøkene hvor TCID₅₀ 10⁴ ble testet, ser man liten eller ingen effekt av tilstedeværelsen av sialinsyre fra 24 timer til 48 timer. Det er tydelig at lave konsentrasjoner av viruskultur sammen med sialinsyre har større effekt. I forsøk.1 hvor virus var til stede i celleflaskene kontinuerlig gjennom undersøkelsene, ble det ikke observert noen påvirkning ved tilstedeværelse av sialinsyren. Denne studien er utarbeidet med forutsetning om at A549 cellene har gjennomgått en cellesyklus før prøvemateriale ble tatt ut, hvor det i løpet av syklusen var blitt x viruspartikler som ble tatt opp og reproduisert. Dette arbeidet har derfor vurdert effekten til sialinsyre, på allerede etablert viruskultur. Alle forsøkene anses som lenger forsøk og her er det tydelig at sialinsyre til stede, ikke kan hindre reproduksjon av virus. Det er også vist at sialinsyre til stede i rene cellekulturer ikke påvirker levedyktigheten negativt. Lave konsentrasjoner av sialinsyre som ligger fra 0.1mM til 1.0mM gir bedre proliferasjon sammenlignet med høyere konsentrasjoner, og sammenlignet med proliferasjon til ren cellekultur. Ved 0,2 mM og 0,8 mM sialinsyre tilsatt viruskultur ble det observert en relativ endring fra start til 24 timer. I alle forsøkene satt opp, uavhengig av viruskonsentrasjon, så ble 100 % CPE observert etter omtrent 72 timer. Ved å bruke RT-qPCR har mengde virus som gjennomgikk reproduksjon i løpet av inkubasjonstiden blitt målt på en gunstig måte. En tilpasning som ikke er blitt gjort i dette arbeidet er fornyelse av dyrkingsmedium i celleflaskene etter prøve isolering ved de utvalgte tidspunktene. Ved å fjerne dyrkingsmedium etter isolering og gjøre dette som en repetitiv del ved de enkelte isoleringene blir det mer realistiske relative verdier ved RT-qPCR kjøringene av de ekstraherte prøvene.

5.1 Veien videre

Samspeilet mellom sialinsyre og virus krever en bredere forståelse for å kunne fastslå om sialinsyre kan ha effekt på reproduksjon av HRV87 i epitelceller. Videre forsøk bør gjennomføres for å undersøke tidlig stadie i virusinfeksjon (0-24 timer) dyrket med graderte Neu5Ac konsentrasjoner (0,0 mM – 1,0 mM) med prøveuttak i kortere intervaller (4-6 timer). Det er også av interesse å utarbeide et bredt spekter av pH tilpassede sialinsyre konsentrasjoner for å kunne gjøre en vurdering av effekten.

6 KONKLUSJON

Etablering av metode for kvantifisering av virus, samt testing og utarbeidelse av *in vitro* celleforsøk for bedre forståelse av effekten til sialinsyre på virus reproduksjon, har vært det viktigste arbeidet i denne prosessen. Hovedfokuset har vært å undersøke Neu5Ac konsentrasjoner som er realistiske å benytte uten å måtte gjøre pH tilpasninger for å hindre toksisitet. Denne studien har at RT-qPCR metoden fungerer i deteksjon av HRV87 også ved å oppfatte små variasjoner i prøver. Analysene som er gjort til nå har ikke detektert noen signifikant endring i HRV87 replikasjon når det er dyrket i celler med og uten sialinsyre til stede. Lave konsentrasjonene av sialinsyren Neu5Ac ser ut til å ha en effekt før 48 timer, spesielt det første døgnet. Indikasjonene som er gitt gjennom denne studien må videre følges opp med mer detaljerte undersøkelser.

7. VEDLEGG

1. Utstyrliste: Material og metode
2. MIQE retningslinjer
3. ATCC® Virology guide
4. RNeasy Plus Mini Kit prosedyre
5. Qubit RNA HS Assay user manual
6. NCBI primer design
7. Utarbeidet RT-qPCR metode
8. BD Pharmingen™ Instruction Manual
9. Rådata: Primer og probe optimalisering
10. Rådata: Assay validering - standardkurve
11. Flowcytometri data
12. Rådata: *In vitro* celleforsøk, negativ kontroll
13. Rådata: *In vitro* celleforsøk t-test

8. LITTERATURLISTE

- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53. doi:10.1042/bio20200034
- Afonina, I. A., Reed, M. W., Lusby, E., Shishkina, I. G., & Belousov, Y. S. (2002). Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques*, 32(4), 940-944, 946-949. doi:10.2144/02324pf01
- Alpana Waghmare, H. X., Thuy Nguyen, Terry L. Stevens-Ayers, Wendy M. Leisenring, Keith R. Jerome, Janet A. Englund, Michael J. Boeckh, Jane M. Kuypers. (2018). viral Quantification of Human Rhinovirus Using Digital RT-PCR in Lower Respiratory Tract Samples From Hematopoietic Cell Transplant Recipients: Risk Factors Determining Viral Load and Association with Mortality. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.12.469>
- ATCC. (2021a). A549 (CCL-185™). Retrieved from <https://www.atcc.org/products/ccl-185>
- ATCC. (2021b). Enterovirus D68 (ATCC® VR- 1197™). Retrieved from <https://www.atcc.org/products/vr-1197>
- Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 9(6), 541-544. doi:<https://doi.org/10.1038/nmeth.2027>
- Barra, G. B., Santa Rita, T. H., Mesquita, P. G., Jácomo, R. H., & Nery, L. F. A. (2020). Analytical Sensitivity and Specificity of Two RT-qPCR Protocols for SARS-CoV-2 Detection Performed in an Automated Workflow. *Genes*, 11(10), 1183. doi:<https://doi.org/10.3390/genes11101183>
- Basnet, S., Palmenberg, A. C., & Gern, J. E. (2019). Rhinoviruses and Their Receptors. *Chest*, 155(5), 1018-1025. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.012>
- BiteSizeBio. (2020). The threshold level and Cq value on a real-time PCR amplification curve. In W. i. a. C. C. value? (Ed.).
- Blomqvist, S., Savolainen, C., Råman, L., Roivainen, M., & Hovi, T. (2002). Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4218-4223. doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.40.11.4218-4223.2002>
- Blaas, D., & Fuchs, R. (2016). Mechanism of human rhinovirus infections. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), 21. doi:<https://doi.org/10.1186/s40348-016-0049-3>

- Britannica, T. E. o. E. (2019, February 18). Cell culture. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/cell-culture>
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts & Peter Walter. (2008a). *Molecular Biology of the cell*. (sixth edition), 717-720.
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts & Peter Walter. (2008b). *Molecular Biology of the cell*. (sixth edition).
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts & Peter Walter. (2008c). *Molecular Biology of the cell*. (sixth edition), 575-576.
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts & Peter Walter. (2008d). *Molecular Biology of the cell*. (Sixth edition).
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts & Peter Walter. (2008e). *Molecular Biology of the cell* (sixth edition).
- Burdett, E., & Mitchell, V. (2011). Anatomy of the larynx, trachea and bronchi. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 12(8), 335-339.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2011.05.002>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
doi:<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D. B., Sheehan, J. K., . . . Rubinstein, M. (2012). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6097), 937-941.
doi:<https://doi.org/10.1126/science.1223012>
- Chauhan, D. T. (2020). Differences between PCR vs qPCR. Retrieved from <https://geneticeducation.co.in/differences-between-pcr-vs-qpcr/>
- Christian A.Heid, J. S., Kenneth J.Livak, P. Mickey Williams (1996). Real Time Quantitative PCR doi:10.1101/gr.6.10.986
- Crystal, R. G., Randell, S. H., Engelhardt, J. F., Voynow, J., & Sunday, M. E. (2008). Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 772-777. doi:10.1513/pats.200805-041HR
- Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31(5), 1106-1116, 1118, 1120-1101.
doi:10.2144/01315rv02

- Do, D. H., Laus, S., Leber, A., Marcon, M. J., Jordan, J. A., Martin, J. M., & Wadowsky, R. M. (2010). A one-step, real-time PCR assay for rapid detection of rhinovirus. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, *12*(1), 102-108. doi:<https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090071>
- Dominguez, S. R., Briese, T., Palacios, G., Hui, J., Villari, J., Kapoor, V., . . . Lipkin, W. I. (2008). Multiplex MassTag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade. *J Clin Virol*, *43*(2), 219-222. doi:10.1016/j.jcv.2008.06.007
- Earn, D. J. D., Dushoff, J., & Levin, S. A. (2002). Ecology and evolution of the flu. *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(7), 334-340. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02502-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02502-8)
- Eurogentec, J. V. qPCR guide Retrieved from <https://www.gene-quantification.de/eurogentec-qPCR-guide.pdf>
- FHI. (2010). Rhinovirusinfeksjon - veileder for helsepersonell. Retrieved from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/rhinovirusinfeksjon--veileder-for/>
- FHI. (2015). Enterovirusinfeksjoner - veileder for helsepersonell. Retrieved from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/enterovirusinfeksjoner---veileder-f/>
- Freire-de-Lima, L., Oliveira, I., Neves, J., Penha, L., Alisson-Silva, F., Dias, W., & Todeschini, A. (2012). Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*, *3*(356). doi:10.3389/fimmu.2012.00356
- Fuchs, R., & Blaas, D. (2010). Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol*, *20*(5), 281-297. doi:10.1002/rmv.654
- Furlow, P. W., & Mathisen, D. J. (2018). Surgical anatomy of the trachea. *Annals of cardiothoracic surgery*, *7*(2), 255-260. doi:10.21037/acs.2018.03.01
- Gambarino, S., Costa, C., Elia, M., Sidoti, F., Mantovani, S., Gruosso, V., . . . Cavallo, R. (2009). Development of a RT real-time PCR for the detection and quantification of human rhinoviruses. *Molecular Biotechnology*, *42*(3), 350-357. doi:10.1007/s12033-009-9164-x
- Ghosh, S. (2020). Sialic acid and biology of life: An introduction. *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*, 1-61. doi:10.1016/B978-0-12-816126-5.00001-9

- Haines-Menges, B. L., Whitaker, W. B., Lubin, J. B., & Boyd, E. F. (2015). Host Sialic Acids: A Delicacy for the Pathogen with Discerning Taste. *Microbiol Spectr*, 3(4). doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0005-2014
- Hegner, I. v. (2009). Molekylær palæoantropologi. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/12518203.pdf>
- Heida, R., Bhide, Y. C., Gasbarri, M., Kocabiyik, Ö., Stellacci, F., Huckriede, A. L. W., . . . Frijlink, H. W. (2021). Advances in the development of entry inhibitors for sialic-acid-targeting viruses. *Drug Discovery Today*, 26(1), 122-137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.009>
- Heikkinen, T., & Järvinen, A. (2003). The common cold. *The Lancet*, 361(9351), 51-59. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12162-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12162-9)
- Hem, K.-G. (2011). *Bedriftenes kostnader ved sykefravær*. Retrieved from SINTEF: <https://www.sintef.no/contentassets/5c5963abef68468a9f22c5b5c3af201a/kostnader-sykefrav2011.pdf>
- Jacobs, S. E., Lamson, D. M., St George, K., & Walsh, T. J. (2013). Human rhinoviruses. *Clinical microbiology reviews*, 26(1), 135-162. doi:10.1128/CMR.00077-12
- Karen N. Barnarda, B. R. W., Justin R. LaClaira, Wendy S. Weichert, Brynn K. Lawrence, Colin R. Parrisha. (2019). Expression of 9-O- and 7,9-O-acetyl modified sialic acid in cells and their effects on influenza viruses. doi:<https://doi.org/10.1101/650341>
- Kooner, A. S., Yu, H., & Chen, X. (2019). Synthesis of N-Glycolylneuraminic Acid (Neu5Gc) and Its Glycosides. *Front Immunol*, 10, 2004. doi:10.3389/fimmu.2019.02004
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., . . . Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research*, 28(2), 655-661. doi:10.1093/nar/28.2.655
- Larionov, A., Krause, A., & Miller, W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, 6(1), 62. doi:10.1186/1471-2105-6-62
- Lei, C., Yang, J., Hu, J., & Sun, X. (2021). On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity. *Virologica Sinica*, 36(1), 141-144. doi:10.1007/s12250-020-00230-5
- Lesk, A. M. (2017). Introduction to genomics. (third edition), 112.
- Leung, H. S. Y., Li, O. T. W., Chan, R. W. Y., Chan, M. C. W., Nicholls, J. M., & Poon, L. L. M. (2012). Entry of influenza A Virus with a α 2,6-linked sialic acid binding

- preference requires host fibronectin. *Journal of virology*, 86(19), 10704-10713.
doi:10.1128/JVI.01166-12
- Liu, Y., Sheng, J., Baggen, J., Meng, G., Xiao, C., Thibaut, H. J., . . . Rossmann, M. G. (2015). Sialic acid-dependent cell entry of human enterovirus D68. *Nat Commun*, 6, 8865. doi:10.1038/ncomms9865
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:<https://org.doi/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, X., Holloway, B., Dare, R. K., Kuypers, J., Yagi, S., Williams, J. V., . . . Erdman, D. D. (2008). Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 533-539. doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.01739-07>
- Matrosovich, M., Herrler, G., & Klenk, H. D. (2015). Sialic Acid Receptors of Viruses. *Topics in current chemistry*, 367, 1-28. doi:10.1007/128_2013_466
- McAuley, J. L., Corcilius, L., Tan, H. X., Payne, R. J., McGuckin, M. A., & Brown, L. E. (2017). The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunology*, 10(6), 1581-1593. doi:<https://doi.org/10.1038/mi.2017.16>
- McKee, T. M. J. R. (2013). *Biochemistry: the molecular basis of life* (international fifth edition ed.). 198 Madison Avenue, New York: Oxford University press.
- McMeen, V., Shaker, M., Gern, J., Carper, H., Murphy, D., Vrtis, R., . . . Heymann, P. (2008). Viral Load Assessments of Rhinovirus (RV) by Quantitative RT-PCR in Nasal Washes from Children Treated in the Emergency Department (ED) for Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2, Supplement 1), S146. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.12.1118>
- Michael Madigan, J. M., Kelly Bender, Daniel Buckley & David Stahl. (2015). Brock biology of microorganisms. (Fourteenth edition), 343-345.
- Miland, Å. O. (2020). Respirasjon (fysiologi). Retrieved from https://sml.snl.no/respirasjon_-_fysiologi
- Müller, S., & Nebe-von-Caron, G. (2010). Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 554-587. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00214.x>

- N. J. Dimmock, A. J. E. K. N. L. (2016a). *Introduction to modern virology* (seventh edition ed.). The atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK Blackwell publishing Ltd.
- N. J. Dimmock, A. J. E. K. N. L. (2016b). introduction to modern virology. (seventh edition), 300-301.
- N. J. Dimmock, A. J. E. K. N. L. (2016c). *Introduction to modern virology* (seventh edition ed.). The atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK: Blackwell publishing Ltd.
- N. J. Dimmock, A. J. E. K. N. L. (2016). Introduction to modern virology. (seventh edition), 295-296.
- Olav Sand, Ø. V. S., Egil Haug & Jan G.Bjåle. (2006). Menneskekroppen; Fysiologi og anatomi. (2.utgave), 356-360.
- Paules, C. I., Marston, H. D., & Fauci, A. S. (2020). Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA*, 323(8), 707-708. doi:10.1001/jama.2020.0757
- Qiagen. (2010). Critical factors for successful real-time PCR. Retrieved from <https://www.qiagen.com/resources/downloads>
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology*, 5(2), 85-86. doi:10.5501/wjv.v5.i2.85
- Sambrook, M. R. G. a. J. (2019). Polymerase Chain Reaction. doi:doi:10.1101/pdb.top095109
- Samraj, A., Läubli, H., Varki, N., & Varki, A. (2014). Involvement of a Non-Human Sialic Acid in Human Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4(33). doi:10.3389/fonc.2014.00033
- Sauer, A.-K., Liang, C.-H., Stech, J., Peeters, B., Quéré, P., Schwegmann-Wessels, C., . . . Herrler, G. (2014). Characterization of the sialic acid binding activity of influenza A viruses using soluble variants of the H7 and H9 hemagglutinins. *PloS one*, 9(2), e89529-e89529. doi:10.1371/journal.pone.0089529
- Savolainen-Kopra, C. (2006). Molecular epidemiology of human rhinoviruses. 86. Retrieved from <https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/78627/2006a02.pdf;sequence=1>
- Scientific, T. F. The Qubit 2.0 Fluorometer Retrieved from <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/bioprobes-issues-2011/bioprobes-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html>
- Sedlak, R. H., Nguyen, T., Palileo, I., Jerome, K. R., & Kuypers, J. (2017). Superiority of Digital Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) over Real-Time RT-PCR for

- Quantitation of Highly Divergent Human Rhinoviruses. *Journal of clinical microbiology*, 55(2), 442-449. doi:10.1128/JCM.01970-16
- SenGupta, D. J., & Cookson, B. T. (2010). SeqSharp: A general approach for improving cycle-sequencing that facilitates a robust one-step combined amplification and sequencing method. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 12(3), 272-277. doi:10.2353/jmoldx.2010.090134
- SigmaAldrich. (2016). RT-PCR - Reverse transcription PCR Retrieved from https://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/rt-pcr.html?gclid=Cj0KCQjw7pKFBhDUARIsAFUoMDYqnGldNkLn3N7TsETz_UAp9e5Qq-idBhtNwjCHF4MrzhJ21SeSQ8AaAtXnEALw_wcB
- SigmaAldrich. (2021a). cell culture fundamentals: the Do's and Don'ts of cell culture. (4th Edition). Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/basic-techniques.html>
- SigmaAldrich. (2021b). Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham. Retrieved from https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6421?lang=en®ion=NO&gclid=CjwKCAjw47eFBhA9EiwAy8kzNO01hOHLZvImuPnm6-erbYY5QSP3wAgUvcqkJJEqIb-Lnc3b6eBPFhoCb2kQAvD_BwE
- Signagen. (2019). What is ROX and why use it in qPCR. Retrieved from <https://signagen.com/blog/2019/05/20/what-is-rox-and-why-use-it-in-qpcr/>
- Silva, E. R., Watanabe, A. S., Carraro, E., Perosa, A. H., Granato, C. F., & Bellei, N. C. (2012). Rhinovirus detection using different PCR-based strategies. *Braz J Microbiol*, 43(2), 739-743. doi:10.1590/s1517-83822012000200038
- Stencel-Baerenwald, J. E., Reiss, K., Reiter, D. M., Stehle, T., & Dermody, T. S. (2014). The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 12(11), 739-749. doi:10.1038/nrmicro3346
- Sun, J., Hu, X.-Y., & Yu, X.-F. (2019). Current Understanding of Human Enterovirus D68. *Viruses*, 11(6), 490. doi:10.3390/v11060490
- Takahashi, T., Takano, M., Kurebayashi, Y., Masuda, M., Kawagishi, S., Takaguchi, M., . . . Suzuki, T. (2014). N-glycolylneuraminic acid on human epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess N-glycolylneuraminic acid binding ability. *Journal of virology*, 88(15), 8445-8456. doi:10.1128/JVI.00716-14
- Terry L Riss, P., Richard A Moravec, BS, Andrew L Nilsen, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor (2013). Assay

- Guidance Manual. Retrieved from
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=classic>
- ThermoFisher. Real-time PCR: understanding Ct Retrieved from
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>
- To, K. K. W., Yip, C. C. Y., & Yuen, K. Y. (2017). Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc*, *116*(7), 496-504. doi:10.1016/j.jfma.2017.04.009
- Tom, M. R., & Mina, M. J. (2020). To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clinical Infectious Diseases*, *71*(16), 2252-2254. doi:10.1093/cid/ciaa619
- Traving, C., & Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *54*(12), 1330-1349. doi:10.1007/s000180050258
- Uncapher, C. R., Dewitt, C. M., & Colonno, R. J. (1991). The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology*, *180*(2), 814-817. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90098-V](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90098-V)
- VanLeuven, J. T., Ridenhour, B. J., Gonzalez, A. J., Miller, C. R., & Miura, T. A. (2017). Lung epithelial cells have virus-specific and shared gene expression responses to infection by diverse respiratory viruses. *PloS one*, *12*(6), e0178408-e0178408. doi:10.1371/journal.pone.0178408
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*, *14*(8), 351-360. doi:10.1016/j.molmed.2008.06.002
- Varki A, S. R., Schauer R. (2017). Sialic acids and other nonulosonic acids. *Essentials of Glycobiology [Internet]*(3rd edition). doi:10.1101/glycobiology.3e.015
- Varki.A, S. R., Esko JD, et al., editors (2009). *Essentials of glycobiology*. 2nd edition. (2nd edition). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1920/>
- Viralzone. (2008). Enterovirus Retrieved from
https://viralzone.expasy.org/97?outline=all_by_species
- Wacker, M. J., & Godard, M. P. (2005). Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, *16*(3), 266-271. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16461951>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2291734/>

Warner, S. M., Wiehler, S., Michi, A. N., & Proud, D. (2019). Rhinovirus replication and innate immunity in highly differentiated human airway epithelial cells. *Respir Res*, 20(1), 150. doi:10.1186/s12931-019-1120-0

Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 85. doi:10.1186/1471-2105-7-85

Vedlegg.1

Utstyrliste: Materialer og metoder

A. In vitro celledyrking og cellesplitting

Materialer:

UTSTYR	FORHANDLER
Celleflasker 25cm ²	VWR
Inkubator	Nuaire™ DHD autoflow CO ₂ Air-Jacketed incubator; 37°C og 5% CO ₂
LAF benk	SAFE 2020, Thermo Scientific
Okularmikroskop	Motic® AE31

REAGENSER	FORHANDLER
DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	Gibco™, Thermofisher
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco™, Thermofisher
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Gibco™, Thermofisher
85 % etanol	
1x DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich
Trypsin/ EDTA: 0,25 %	Gibco™, Thermofisher

Metode:

1. Undersøker cellenes tetthet (konfluens) i celleflaske (25 cm²) med okularmikroskop. Ved konfluens > 75 % pipetteres supernatanten av (omtrent 10 ml)
2. Cellene tilsettes 2 ml 0,25 % trypsin-EDTA som virker i minimum 10 minutter ved de samme forutsetningene som ved vekst (37 °C og 5% CO₂)
3. Virkningen til trypsin kontrolleres ved å undersøke cellene i mikroskop. Ved fullstendig løst celler tilsettes 5 ml dyrkingsmedium som nøytraliserende trypsin.
4. 3,5 ml av cellesuspensjonen overføres til en ny 25 cm² celleflaske. Deretter etterfylles begge de to celleflaskene med 6,5 ml dyrkingsmedium.
5. Celleflaskene plasseres tilbake i inkubasjonsskap ved 37 °C og 5% CO₂ for videre dyrking.

B. Celletelling

Materialer:

UTSTYR	FORHANDLER
Fuchs-Rosenthal kammer (0.200mm, 0.0625mm ²)	Science service
96-plate-brett	Corning [®] , Sigma Aldrich
Dekkglass	VWR
Okularmikroskop	Motic AE31)
REAGENSER	FORHANDLER
Trypan blue, fargestoff	Sigma Aldrich

Metode:

1. Vurdere konfluens i celleflaske (25 cm²). Ved konfluens > 75 % pipetteres supernatanten av (ca. 10 ml)
2. 2 ml 0,25 % trypsin-EDTA tilsettes cellene, som får virke i minimum 10 minutter ved de samme forutsetningene som ved vekst (37 °C og 5 % CO₂)
3. Virkningen til trypsin kontrolleres ved å undersøke celleflaske i mikroskop. Ved fullstendig løsning blir 5 ml dyrkingsmedium tilsatt som nøytraliserende løsning for trypsineringen.
4. 10 µl homogenisert celleduspensjon overføres fra celleflaske til brønn på 96-plate oppsett. 10 µl trypan blue tilsettes til samme brønn. dette blandes godt.
5. 10 µl løsning overføres fra brønn til øvre og nedre kammer i et fuchs-rosenthal kammer dekket med dekkglass.
6. tellekammeret plasseres under okularmikroskopet hvor en levende celler telles i en kronologisk rekkefølge.

C. Viruskultivering

Materialer:

UTSTYR	FORHANDLER
25mm ² celleflasker	VWR

Sentrifugerør, 15ml	Falcon
Sentrifuge	SL 40 Centrifuge, Thermo Scientific™
Inkubator 37°C og 5% CO ₂	Nuaire™ DHD autoflow CO ₂ Air-Jacketed incubator
Inkubator 33°C	BINDER
LAF benk	SAFE 2020, Thermo Scientific

REAGENSER

FORHANDLER

A549 cellekultur

HRV87 (ATCC® VR-1197™)

DMEM/ F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)

Gibco™, Thermofisher

FBS (Fetal Bovine Serum)

Gibco™, Thermofisher

Antibiotic-Antimycotic (100X

Gibco™, Thermofisher

1X DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

Sigma Aldrich

Metode: se vedlegg.3

D. TCID₅₀:

Materialer:

UTSTYR	FORHANDLER
96-brønn plate	Corning®, Sigma Aldrich
Inkubator 37°C og 5% CO ₂	Nuaire™ DHD autoflow CO ₂ Air-Jacketed incubator
Inkubator 33 °C	BINDER
Kryorør, 4 ml	VWR
Plateleser	Multiskan® GO, Thermo Scientific
Sentrifugerør, 15 ml	Falcon

REAGENSER

FORHANDLER

Metanol

Crystal violet fargeløsning

Sigma Aldrich

Virusstock

ATCC

Cellekultur	ATCC
DMEM/ F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	Gibco™, Thermofisher
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco™, Thermofisher
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Gibco™, Thermofisher

Metode:

1. Tilsetter om lag 5000 celler tilsvarende 200 μ l til brønner i 96-plate oppsett før platen inkuberes i inkubasjonsskap ved 37 °C og 5% CO₂ over natten
2. stockløsning tas ut fra -80 °C fryser og tines. Forbereder åtte 4 ml kryorør. Fra stockløsning overføres 400 μ l overført til første fortynning som homogeniseres ved pipettering.
3. fortynningsrekke lages i 10x fortynninger ved å repetere trinn.2 med foregående fortynning. Dette gjøres med ni fortynninger fra 10⁻¹ til 10⁻⁸.
4. 96-plate brett med celler tas ut fra inkubasjonsskap og supernatanten fjernes (200 μ l).
5. 200 μ l virusfortynning tilsettes de enkelte brønnene. En fortynning tilsettes i alle brønner i en rad. Brettet inkuberes i 4 dager ved 33 °C
6. Etter 4 dager fjernes supernatanten i alle brønnene før cellene vaskes med 100 μ l 1 x DPBS og fikseres ved å tilsette 50 μ l metanol til hver brønn som får virke i et minutt.
7. metanol byttes ut med 100 μ l 0,1 % crystal blue fargeløsning i destillert vann som får virke i 20 minutt på cellene.
8. brønnene vaskes med 1 x DPBS og måles med mikro plateleser ved 570 nm. Målingene kalkuleres til TCID₅₀ verdi angir fortynningen som fører til 50 % infeksjon i cellene.

E. RNA ekstraksjon:

Materialer:

KIT	UTSENDER	INNHold
RNeasy mini kit	Qiagen	Rneasy mini spin kolonner
		Samle rør (1.5ml)
		Samle rør (2.0ml)
		RLT buffer
		RW1 buffer
		RPE buffer

	RNasefritt vann
UTSTYR	FORHANDLER
sentrifuge	Jouan A14 centrifuge
REAGENSER	FORHANDLER
Etanol	Sigma Aldrich
Nukleasefritt vann	Qiagen

Metode: se Vedlegg. 4

F. Qubit:

Materialer:

KIT	UTSENDER	REAGENSER
Qubit™ RNA HS Assay kit	Invitrogen	Qubit assay rør
		Qubit RNA HS buffer
		Qubit fargestoff
		Standard.1
		Standard.2

Metode: Se Vedlegg.5

G. Primer og probe optimalisering:

Materialer:

UTSTYR	FORHANDLER
PCR strips	0,2 ml, AXYGEN®
Mini sentrifuge	Microcentrifuge, MiniStar, VWR
Vortex-mikser	IKA® lab dance, Sigma Aldrich
MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
Plate sentrifuge	PlateSpin2, Thermofisher Scientific
REAGENSER	FORHANDLER

Nukleasefritt vann	Qiagen
--------------------	--------

Metode:

1. Primer konsentrasjoner 200-600 nM testes med standardisert probe konsentrasjon.
2. Beste konsentrasjonssammensetning mellom primerne blir brukt videre sammen med alle probe konsentrasjonene 200-500 nM.
3. Optimaliserte forhold baseres på Ct-verdi og formen på kurven.

H. RT-q PCR:

Materialer:

UTSTYR	FORHANDLER
MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
Optisk klar adhesive dekk skjerm	ThermoFisher
Plate sentrifuge	PlateSpin2, ThermoFisher Scientific
PCR system	7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems

REAGENSER	FORHANDLER
qScript™ XLT 1-step RT-qPCR	Quantabio
ToughMix® Low ROX	
MGB probe	Applied Biosystems
Forward primer	Invitrogen
Revers primer	Invitrogen
RNasefritt vann	Qiagen
Nukleasefritt vann	Qiagen
Viralt RNA	

Metode: se Vedlegg 7

I. Flowcytometri:

Materialer:

KIT	UTSENDER	REAGENSER

BD BrdU Flow-Kit	BD Pharming	BrdU
		DNase
		Fluorescens antistoff
		Staining buffer
		BD cytofix / cytoperm buffer
		BD perm /wash buffer
		BD cytoperm permabilization buffer
		Fluorochrome-conjugat anti-brdu antistoff
		7-AAD

UTSTYR	FORHANDLER
Stativ	
Glassrør	5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Falcon™
Kasse med is	
Sentrifugerør, 15 ml	Falcon
sentrifuge	DiaCent – 12, BioRad
sentrifuge	SL 40 Centrifuge, Thermo Scientific™
Inkubator	Termaks Incubator
Inkubator	Nuaire™ DHD autoflow CO ₂ Air-Jacketed incubator
Pinsett	

REAGENSER	FORHANDLER
Deionisert vann	
1x (DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich
Trypsin/ EDTA: 0,25 %	Gibco™, Thermofisher
Clean løsning	BD Accuri® C6 cytometers
Decont løsning	BD Accuri® C6 cytometers
dH ₂ O	
8 peak bead løsning	BD Accuri® cytometers

6 peak beads løsning

BD Accuri® cytometers

Metode: se Vedlegg. 8.

J. MTT assay:

Materialer:

KIT	UTSENDER	REAGENSER
The Cell Proliferation Kit I (MTT)	Sigma Aldrich	MTT Labeling Reagent
		Solubilization Solution
UTSTYR	FORHANDLER	
96-platebrett	Corning®, Sigma Aldrich	
Plateleser, 577 nm	Multiskan® GO, Thermo Scientific	
Inkubator 37°C og 5% CO ₂	Nuaire™ DHD autoflow CO ₂ Air-Jacketed incubator	
REAGENSER	FORHANDLER	
1x DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich	
DMEM/ F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	Gibco™, Thermofisher	
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco™, Thermofisher	
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Gibco™, Thermofisher	
Sialinsyre (Neu5Ac)	Viiral AS	

Metode:

1. Celler tilsettes i brønner på et 96-plate-oppsett med 2 x 10³ celler / brønn i 100 µl dyrkingsmedium tilsatt ulike sialinsyre konsentrasjoner
2. Cellene inkuberes i 4 dager ved 37°C og 5% CO₂.
3. etter inkubasjonsperioden tilsettes 10 µl MTT-merkingsreagens før cellene inkuberes i fem timer ved samme forhold.

4. 100 μ l oppløsningsvæske tilsettes hver brønn og platen inkuberes over natten i 37°C og 5% CO₂.
5. Dagen etter måles formazan krystallene med mikroplateleser (ELISA)
6. Bølgelengden for mål av absorbans (OD) er mellom 550 og 600 nm. Referansebølgelengden skal være 650 nm.

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Helleman,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

BACKGROUND: Currently, a lack of consensus exists on how best to perform and interpret quantitative real-time PCR (qPCR) experiments. The problem is exacerbated by a lack of sufficient experimental detail in many publications, which impedes a reader's ability to evaluate critically the quality of the results presented or to repeat the experiments.

CONTENT: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines target the reliability of results to help ensure the integrity of the scientific literature, promote consistency between laboratories, and increase experimental transparency. MIQE is a set of guidelines that describe the minimum information necessary for evaluating qPCR experiments. Included is a checklist to accompany the initial submission of a manuscript to the publisher. By providing all relevant experimental conditions and assay characteristics, reviewers can assess the validity of the protocols used. Full disclosure of all reagents, sequences, and analysis methods is necessary to enable other investigators to reproduce results. MIQE details should be published either in abbreviated form or as an online supplement.

SUMMARY: Following these guidelines will encourage better experimental practice, allowing more reliable and unequivocal interpretation of qPCR results.

© 2009 American Association for Clinical Chemistry

The fluorescence-based quantitative real-time PCR (qPCR)¹⁵ (1–3), with its capacity to detect and measure minute amounts of nucleic acids in a wide range of samples from numerous sources, is the enabling technology par excellence of molecular diagnostics, life sciences, agriculture, and medicine (4, 5). Its conceptual and practical simplicity, together with its combination of speed, sensitivity, and specificity in a homogeneous assay, have made it the touchstone for nucleic acid quantification. In addition to its use as a research tool, many diagnostic applications have been developed, including microbial quantification, gene dosage determination, identification of transgenes in genetically modified foods, risk assessment of cancer recurrence, and applications for forensic use (6–11).

This popularity is reflected in the prodigious number of publications reporting qPCR data, which invariably use diverse reagents, protocols, analysis methods, and reporting formats. This remarkable lack of consensus on how best to perform qPCR experiments has the adverse consequence of perpetuating a string of serious shortcomings that encumber its status as an independent yardstick (12). Technical deficiencies that affect assay performance include the following: (a) inadequate sample storage, preparation, and nucleic acid quality, yielding highly variable results; (b) poor choice of reverse-transcription primers and primers and probes for the PCR, leading to inefficient and less-than-robust assay performance;

¹ Centre for Academic Surgery, Institute of Cell and Molecular Science, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, London, UK; ² Genomics Core Facility, EMBL Heidelberg, Heidelberg, Germany; ³ Centre for Virology, Department of Infection, University College London, London, UK; ⁴ Department of Virology, UCL Hospitals NHS Foundation Trust, London, UK; ⁵ Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium; ⁶ Centre for Infectious Diseases, University College London, London, UK; ⁷ TATAA Biocenter, Göteborg, Sweden; ⁸ Institute of Biotechnology AS CR, Prague, Czech Republic; ⁹ Sequenom, San Diego, California, USA; ¹⁰ Sigma-Aldrich, Haverhill, UK; ¹¹ Physiology Weihenstephan, Technical University Munich, Freising, Germany; ¹² Quantitative Genomics Core Laboratory, Department of Integrative Biology and Pharmacology, University of Texas Health Science Center, Houston, Texas, USA; ¹³ Department of Pathology, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA; ¹⁴ ARUP Institute for Clinical and Experimental Pathology, Salt Lake City, Utah, USA.

* Address correspondence to this author at: 3rd Floor Alexandra Wing, The Royal London Hospital, London E1 1BB, UK. Fax +44-(0)20-7377 7283; e-mail s.a.bustin@qmul.ac.uk.

Received October 20, 2008; accepted January 27, 2009.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797

¹⁵ Nonstandard abbreviations: qPCR, quantitative real-time PCR; MIQE, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; RT-qPCR, reverse transcription-qPCR; FRET, fluorescence resonance energy transfer; C_q, quantification cycle, previously known as the threshold cycle (C_t), crossing point (C_p), or take-off point (TOP); RDML, Real-Time PCR Data Markup Language; LOD, limit of detection; NTC, no-template control.

and (c) inappropriate data and statistical analyses, generating results that can be highly misleading. Consequently, there is the real danger of the scientific literature being corrupted with a multitude of publications reporting inadequate and conflicting results (13). The publication (14) and retraction (15) of a *Science* “Breakthrough of the Year 2005” report provides a disquieting warning. The problem is exacerbated by the lack of information that characterizes most reports of studies that have used this technology, with many publications not providing sufficient experimental detail to permit the reader to critically evaluate the quality of the results presented or to repeat the experiments. Specifically, information about sample acquisition and handling, RNA quality and integrity, reverse-transcription details, PCR efficiencies, and analysis parameters are frequently omitted, whereas sample normalization is habitually carried out against single reference genes without adequate justification.

The aim of this document is to provide authors, reviewers, and editors specifications for the minimum information, set out in Table 1, that must be reported for a qPCR experiment to ensure its relevance, accuracy, correct interpretation, and repeatability. MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, pronounced *mykee*) is modeled on similar guidelines drawn up for DNA microarray analysis (16), proteomics experiments (17), genome sequence specification (18), and those under discussion for RNA interference work (19, 20) and metabolomics (21), all of which are initiatives coordinated under the umbrella of MIBBI (Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations, <http://www.mibbi.org>) (22). Compulsory inclusion of a common reporting language to allow data sharing is not proposed, although it is envisaged that a future update of these guidelines could include such a recommendation. Rather, these guidelines target the reliability of results to help ensure the integrity of the scientific literature, promote consistency between laboratories, and increase experimental transparency. They should be read in conjunction with recent publications that deal in depth with the issue of qPCR standardization (23–26).

1. Nomenclature

A few terms require standardization to ensure clarification:

- 1.1 We propose that the abbreviation qPCR be used for quantitative real-time PCR and that RT-qPCR be used for reverse transcription–qPCR. Applying the abbreviation RT-PCR to qPCR causes confusion and is inconsistent with its use for conventional (legacy) reverse transcription–PCR.
- 1.2 Genes used for normalization should be referred to as *reference genes*, not as *housekeeping genes*.
- 1.3 TaqMan probes should be referred to as *hydrolysis probes*.
- 1.4 The term *FRET probe* (fluorescence resonance energy transfer probe) refers to a generic mechanism in which emission/quenching relies on the interaction between the electron-excitation states of 2 fluorescent dye molecules. LightCycler-type probes should be referred to as *dual hybridization probes*.
- 1.5 The *Oxford English Dictionary* lists only *quantification*, not *quantitation*; therefore, the former is the proper word.
- 1.6 The nomenclature describing the fractional PCR cycle used for quantification is inconsistent, with *threshold cycle* (C_T), *crossing point* (C_P), and *take-off point* (TOP) currently used in the literature. These terms all refer to the same value from the real-time instrument and were coined by competing manufacturers of real-time instruments for reasons of product differentiation, not scientific accuracy or clarity. We propose the use of *quantification cycle* (C_q), according to the RDML (Real-Time PCR Data Markup Language) data standard (<http://www.rdml.org>) (27).

2. Conceptual Considerations

To explain and justify the guidelines, we find it useful to review a number of key issues surrounding qPCR experiments:

- 2.1 *Analytical sensitivity* refers to the minimum number of copies in a sample that can be measured accurately with an assay, whereas *clinical sensitivity* is the percentage of individuals with a given disorder whom the assay identifies as positive for that condition. Typically, sensitivity is expressed as the *limit of detection* (LOD), which is the concentration that can be detected with reasonable certainty (95% probability is commonly used) with a given analytical procedure. The most sensitive LOD theoretically possible is 3 copies per PCR (28), assuming a Poisson distribution, a 95% chance of including at least 1 copy in the PCR, and single-copy detection. Experimental procedures typically include sample-processing steps (i.e., extraction) and, when required, reverse transcription. If the volume changes and the efficiencies of these steps are accounted for, the most sensitive LOD theoretically possible can be expressed in units relevant to the experiment, such as copies per nanogram of tissue. Experimental results less than the theoretic-

Table 1. MIQE checklist for authors, reviewers, and editors.^a

Item to check	Importance	Item to check	Importance
Experimental design		qPCR oligonucleotides	
Definition of experimental and control groups	E	Primer sequences	E
Number within each group	E	RTPrimerDB identification number	D
Assay carried out by the core or investigator's laboratory?	D	Probe sequences	D ^d
Acknowledgment of authors' contributions	D	Location and identity of any modifications	E
Sample		Manufacturer of oligonucleotides	D
Description	E	Purification method	D
Volume/mass of sample processed	D	qPCR protocol	
Microdissection or macrodissection	E	Complete reaction conditions	E
Processing procedure	E	Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E
If frozen, how and how quickly?	E	Primer, (probe), Mg ²⁺ , and dNTP concentrations	E
If fixed, with what and how quickly?	E	Polymerase identity and concentration	E
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE ^b samples)	E	Buffer/kit identity and manufacturer	E
Nucleic acid extraction		Exact chemical composition of the buffer	D
Procedure and/or instrumentation	E	Additives (SYBR Green I, DMSO, and so forth)	E
Name of kit and details of any modifications	E	Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D
Source of additional reagents used	D	Complete thermocycling parameters	E
Details of DNase or RNase treatment	E	Reaction setup (manual/robotic)	D
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	Manufacturer of qPCR instrument	E
Nucleic acid quantification	E	qPCR validation	
Instrument and method	E	Evidence of optimization (from gradients)	D
Purity (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	D	Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E
Yield	D	For SYBR Green I, C _q of the NTC	E
RNA integrity: method/instrument	E	Calibration curves with slope and y intercept	E
RIN/RQI or C _q of 3' and 5' transcripts	E	PCR efficiency calculated from slope	E
Electrophoresis traces	D	CI _s for PCR efficiency or SE	D
Inhibition testing (C _q dilutions, spike, or other)	E	r ² of calibration curve	E
Reverse transcription		Linear dynamic range	E
Complete reaction conditions	E	C _q variation at LOD	E
Amount of RNA and reaction volume	E	CI _s throughout range	D
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	Evidence for LOD	E
Reverse transcriptase and concentration	E	If multiplex, efficiency and LOD of each assay	E
Temperature and time	E	Data analysis	
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	qPCR analysis program (source, version)	E
C _q s with and without reverse transcription	D ^c	Method of C _q determination	E
Storage conditions of cDNA	D	Outlier identification and disposition	E
qPCR target information		Results for NTCs	E
Gene symbol	E	Justification of number and choice of reference genes	E
Sequence accession number	E	Description of normalization method	E
Location of amplicon	D	Number and concordance of biological replicates	D
Amplicon length	E	Number and stage (reverse transcription or qPCR) of technical replicates	E
In silico specificity screen (BLAST, and so on)	E	Repeatability (intraassay variation)	E
Pseudogenes, retropseudogenes, or other homologs?	D	Reproducibility (interassay variation, CV)	D
Sequence alignment	D	Power analysis	D
Secondary structure analysis of amplicon	D	Statistical methods for results significance	E
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	Software (source, version)	E
What splice variants are targeted?	E	C _q or raw data submission with RDML	D

^a All essential information (E) must be submitted with the manuscript. Desirable information (D) should be submitted if available. If primers are from RTPrimerDB, information on qPCR target, oligonucleotides, protocols, and validation is available from that source.

^b FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; RIN, RNA integrity number; RQI, RNA quality indicator; GSP, gene-specific priming; dNTP, deoxynucleoside triphosphate.

^c Assessing the absence of DNA with a no-reverse transcription assay is essential when first extracting RNA. Once the sample has been validated as DNA free, inclusion of a no-reverse transcription control is desirable but no longer essential.

^d Disclosure of the probe sequence is highly desirable and strongly encouraged; however, because not all vendors of commercial predesigned assays provide this information, it cannot be an essential requirement. Use of such assays is discouraged.

cally possible LOD should never be reported. It also follows that results of “0” are meaningless and misleading. LOD estimates in qPCR analyses are complicated by the logarithmic nature of C_q , because C_q is undefined when the template concentration is zero. Appropriate determination and modeling of the LOD in the qPCR is the focus of continued research (26).

- 2.2 *Analytical specificity* refers to the qPCR assay detecting the appropriate target sequence rather than other, nonspecific targets also present in a sample. *Diagnostic specificity* is the percentage of individuals without a given condition whom the assay identifies as negative for that condition.
- 2.3 *Accuracy* refers to the difference between experimentally measured and actual concentrations, presented as fold changes or copy number estimates.
- 2.4 *Repeatability* (short-term precision or intraassay variance) refers to the precision and robustness of the assay with the same samples repeatedly analyzed in the same assay. It may be expressed as the SD for the C_q variance. Alternatively, the SD or the CV for copy number or concentration variance may be used. CVs should not be used with C_q s, however (29).
- 2.5 *Reproducibility* (long-term precision or interassay variance) refers to the variation in results between runs or between different laboratories and is typically expressed as the SD or CV of copy numbers or concentrations. C_q values generated from different runs are subject to inherent interrun variation (30); hence, reporting interrun C_q variation is not appropriate.

Publications describing mRNA concentrations for target genes should make it clear precisely what the targets are. The transcripts of most human genes and many genes in other multicellular organisms are alternatively spliced (31, 32), and these splicing variants specify alternative protein isoforms, with variation in splicing patterns reported in different tissues or at different developmental stages. Consequently, single exon–based RT-qPCR assays may detect a number of splice variants, whereas intron-spanning primers may be more selective but may miss some splice variants altogether. Most recently, autosomal nonimprinted genes that display allelic imbalance in their expression have been described (33). Taken together, these findings imply that use of an RT-qPCR assay that simply targets one or at most 2 exons of an mRNA is no longer sufficient to describe the expression level of a particular gene. Consequently, sequence information for primers must be provided together with an assessment of their specificity with respect to known splice variants and

single-nucleotide polymorphism positions documented in transcript and single-nucleotide polymorphism databases. For primer sets selected from the RTprimerDB database (34, 35), this is easily done by consulting the RTprimerDB Web site (<http://www.rtpriimerdb.org>), which contains all the relevant information. For commercial assays, lot information and the providers’ experimental validation criteria are required. The reporting of results for nonvalidated commercial assays and assays that have been validated only in silico are strongly discouraged.

It must be remembered that detection of the presence of an mRNA provides no information on whether that mRNA will be translated into a protein or, indeed, whether a functional protein is translated at all.

Immunohistochemistry, western blotting, or other protein-quantification methods are not always able to corroborate quantitative cellular mRNA data. It is now well established that there is frequently a lack of concordance between mRNA- and protein-concentration data (36), which is particularly true for mRNAs that specify proteins that are part of multi-function protein complexes (37). Finally, it has become clear that knowledge of the presence and function of specific microRNAs is as important to understanding gene expression as being able to quantify the mRNA species (38).

It is also necessary to be aware that most quantitative RNA data are not absolute, but relative. Thus, the reference genes or materials used for standardization are critical, and any assessment of the validity of an RT-qPCR experiment must also consider the appropriateness of the relative-quantification reference. Therefore, the development of universal reference DNA and RNA calibration materials, although very helpful (39, 40), will not be a universal panacea (41, 42).

Much of the variance in reported expression values produced in RT-qPCR experiments is not simply due to variation in experimental protocols but is caused by corrections applied by various data-processing algorithms, each of which makes its own assumptions about the data. Consequently, although qPCR has frequently been proclaimed a touchstone or a gold standard, in practice this “standard” is a variable one, and the reporting of results requires considerable sophistication of analysis and interpretation (43).

3. Research vs Diagnostic Applications

Applications of qPCR technology can be broadly divided into research and diagnostic applications. Research applications usually analyze a wide range of targets with a fairly low throughput and many different sample types. The main parameters that need to be addressed relate to assay analytical sensitivity

and specificity, which in this context refer to how many target copies the assay can detect and whether the no-template controls (NTCs) are reliably negative, respectively.

In contrast, diagnostic applications usually analyze a limited number of targets, but require high-throughput protocols that are targeted at only a few sample types. Although all of the considerations that apply to research applications also apply to diagnostic assays, clinical-diagnostic assays have a number of additional requirements that need to be considered. These requirements include information on analytical sensitivity and specificity that in this context refers to how often the assay returns a positive result when a target is present and how often it is negative in the absence of the target. Furthermore, the accuracy and precision within and between laboratories is often monitored by external QC programs. Additional clinical laboratory requirements include criteria for generating reportable results, whether repeated measurements are made on samples, data on the resolution of false-positive/false-negative data, and the similarity of results from multiple laboratories that use the same and different technologies. Thus far, only a couple of interlaboratory comparisons have been performed, and both of these studies emphasized the need for standardization of qPCR diagnostic assays (44, 45). Another interlaboratory exercise is planned within the European Framework 7 project: SPIDIA (Standardisation and Improvement of Generic Pre-analytical Tools and Procedures for In-Vitro Diagnostics; <http://www.spidia.eu>).

4. Sample Acquisition, Handling, and Preparation

Sample acquisition constitutes the first potential source of experimental variability, especially for experiments targeting RNA, because mRNA profiles are easily perturbed by sample-collection and -processing methods. There is some suggestion that fresh tissue can be stored on ice without major effects on RNA quality and concentration (46), but although this supposition may be true for some mRNAs and tissues, it may not be universally applicable. Hence, it is better to be cautious. Consequently, it is important to report in detail where the tissue sample was obtained and whether it was processed immediately. If the sample was not processed immediately, it is necessary to report how it was preserved and how long and under what conditions it was stored.

A brief description of the sample is also essential. For example, microscopical examination of a tumor biopsy will reveal what percentage of the biopsy is made up of tumor cells, and this information should be reported.

Nucleic acid extraction is a second critical step. Extraction efficiency depends on adequate homogenization, the type of sample (e.g., in situ tissue vs log-phase cultured cells), target density, physiological status (e.g., healthy, cancerous, or necrotic), genetic complexity, and the amount of biomass processed. Therefore, it is necessary that details of the nucleic acid-extraction method be provided and that the methods used for measuring nucleic acid concentration and assessing its quality be described. Such details are particularly crucial for RNA extracted from fresh frozen laser-microdissected biopsy samples, because variations in tissue-preparation procedures have a substantial effect on both RNA yield and quality (47).

5. QC of Nucleic Acids

5.1. RNA SAMPLES

Quantification of RNA in the extracted samples is important, because it is advisable that approximately the same amounts of RNA be used when comparing different samples. There are several quantification procedures in common use, however, including spectrophotometry (NanoDrop; Thermo Scientific), microfluidic analysis (Agilent Technologies' Bioanalyzer, Bio-Rad Laboratories' Experion), capillary gel electrophoresis (Qiagen's QIAxcel), or fluorescent dye detection (Ambion/Applied Biosystems' RiboGreen). The methods produce different results, making it unwise to try to compare data obtained with the different methods (48). The preferred method for quantifying RNA uses fluorescent RNA-binding dyes (e.g., RiboGreen), which are best for detecting low target concentrations. In any case, it is advisable to measure all samples with a single method only and to report this information.

It is also important to test for and report the extent of genomic-DNA contamination and to record the threshold cutoff criteria for the amounts of such contamination that are tolerable. It is essential to report whether the RNA sample has been treated with DNase (including the type of DNase used and the reaction conditions) and to report the results from a comparison of C_q s obtained with positive and no-reverse transcription controls for each nucleic acid target.

It is also essential to document the quality assessment of RNA templates. The only situation in which this requirement does not apply is when the quantity of total RNA extracted is too low to permit quality assessment. This situation arises when RNA is extracted from single cells, plasma, other cell-free body fluids, some laser-captured samples, or clarified tissue culture medium. It also applies in cases in which extraction and RT-qPCR steps are performed as a continuous, single-tube experiment. Key information to report includes data on RNA quantity, integrity, and the absence of

reverse transcription or PCR inhibitors. It is worth remembering that RNA degrades markedly *in vivo*, owing to the natural regulation of mRNAs in response to environmental stimuli (49). This source of RNA degradation is beyond the control of the researcher; one of its manifestations is that even high-quality RNA samples can show differential degradation of individual mRNAs.

The A_{260}/A_{280} ratio must be measured in a buffer at neutral pH, but such measurement is not sufficient if the nucleic acid is to be used for quantitative analysis, especially when the aim is to measure minor differences (<10-fold) in cellular mRNA concentrations. The absorbance ratio does provide an indication of RNA purity, because the presence of DNA or residual phenol alters the ratio. Instead, one should provide gel electrophoresis evidence at the least or, better yet, results from a microfluidics-based rRNA analysis (50) or a reference gene/target gene 3':5' integrity assay (51). The advantage of the use of a Bioanalyzer/Experion system to calculate an RNA integrity number or an RNA quality indicator number is that these measures provide quantitative information about the general state of the RNA sample. It is important to bear in mind, however, that these numbers relate to rRNA quality and cannot be expected to be an absolute measure of quality. Use of a 3':5' assay requires that the PCR efficiencies of both assays be virtually identical (51) and not be subject to differential inhibition. This assay also necessitates the establishment of a threshold criterion that delineates the RNA quality sufficient to yield reliable results. Ideally, the assay should target a panel of "integrity reference genes," probably without introns, with a 3':5' threshold ratio of approximately 0.2–5. Clearly, further work is required to generate a universally applicable, cost-effective, and simple protocol for assessing RNA integrity.

Inhibition of reverse-transcription activity or PCR should be checked by dilution of the sample (preferably) or use of a universal inhibition assay such as SPUD (52, 53). If the RNA sample is shown to be partially degraded, it is essential that this information be reported, because the assay's sensitivity for detecting a low-level transcript may be reduced and relative differences in the degradation of transcripts may produce incorrect target ratios.

5.2. DNA SAMPLES

In general, degradation is much less of an issue with DNA; however, it is important to be able to assess the extent of DNA degradation for forensic applications, *i.e.*, in cases in which harsh environmental conditions at scenes of crimes or mass disasters or at sites involving missing-person cases may have degraded the chemical structure of DNA. The small amplicon size of qPCR

assays helps to minimize assay-related problems, but methods have been developed that provide a quantitative measurement of DNA quality (54) and should be considered for such specialized purposes.

The potential for inhibition is a more generally applicable variable that must be addressed in a publication, and it is important to ensure that no inhibitors copurified with the DNA will distort results, *e.g.*, pathogen detection and their quantification (55). Although such approaches such as spiking samples with positive controls (52) can be used to detect inhibition, different PCR reactions may not be equally susceptible to inhibition by substances copurified in nucleic acid extracts (56, 57). Consequently, it is better to routinely use dilutions of nucleic acids to demonstrate that observed decreases in C_q s or copy numbers are consistent with the anticipated result and to report these data.

6. Reverse Transcription

The reverse-transcription step introduces substantial variation into an RT-qPCR assay (58, 59). Hence, it is essential that a detailed description of the protocol and reagents used to convert RNA into cDNA be provided. This documentation must include the amount of RNA reverse-transcribed, priming strategy, enzyme type, volume, temperature, and duration of the reverse-transcription step. It is recommended that the reverse-transcription step be carried out in duplicate or triplicate and that the total RNA concentration be the same in every sample (58).

7. qPCR

The following information must be provided for qPCR assays: database accession numbers of each target and reference gene, the exon locations of each primer and any probe, the sequences and concentrations of each oligonucleotide, including the identities, positions, and linkages of any dyes and/or modified bases. Also required are the concentration and identity of the polymerase, the amount of template (DNA or cDNA) in each reaction, the Mg^{2+} concentration, the exact chemical compositions of the buffer (salts, pH, additives), and the reaction volume. The investigators must also identify the instrument they used and document all of the PCR cycling conditions. Because the consumables used affect thermal cycling, it is necessary to identify the use of single tubes, strips, or plates, and their manufacturers. The degree of transparency of the plasticware used, *e.g.*, white or clear, is also important, because different plastics exhibit substantial differences in fluorescence reflection and sensitivity (60). When plates are used, the method of sealing (heat bonding

vs adhesives) can affect the evaporation of samples at the plate perimeter and should therefore be documented.

Because PCR efficiency is highly dependent on the primers used, their sequences must be published. This requirement is perfectly feasible even with commercial primers, because there is a precedent for companies to make their primer and probe sequences available (http://www.primerdesign.co.uk/research_with_integrity.asp).

In addition, submission to public databases such as RTprimerDB is strongly encouraged; over time, these databases could become universal clearinghouses.

7.1. SECONDARY STRUCTURE

The structure of the nucleic acid target (e.g., stem and loop secondary RNA structure) has a substantial impact on the efficiency of reverse transcription and the PCR. Therefore, the positions of primers, probes, and PCR amplicons must take the folding of RNA templates into consideration. Sequences should be checked with nucleic acid–folding software, e.g., mfold for DNA (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) or RNA (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi>). Ideally, the folding structures should be made available to reviewers.

7.2. SPECIFICITY

In silico tools such as BLAST or equivalent specificity searches are useful for assay design. Any appreciable homology to pseudogenes or other unexpected targets should be documented and provided as aligned sequences for review; however, specificity must be validated empirically with direct experimental evidence (electrophoresis gel, melting profile, DNA sequencing, amplicon size, and/or restriction enzyme digestion).

Algorithms for predicting an oligonucleotide's melting temperature (T_m) are useful for initial design, but the practical optimum temperature for annealing must be determined experimentally. Although primer optimization has become unfashionable, it is clear that poor annealing optimization has a large effect on assay quality (51). A marked presence of primer dimers produces a lower PCR efficiency in probe-based assays and may generate false positives in assays based on SYBR Green I. Some evidence for primer optimization should be provided to reviewers, ideally in the form of annealing temperature or Mg^{2+} gradients, and be presented as C_q values, plots of fluorescence vs cycle number, and/or melting curves (61).

7.3. CONTROLS AND QUANTIFICATION CALIBRATORS

In addition to the no–reverse transcription control in RT–qPCR assays mentioned above, additional controls

and/or quantification calibrators are required for all qPCR reactions. NTCs detect PCR contamination when probes are used and can also distinguish unintended amplification products (e.g., primer dimers) from the intended PCR products in SYBR Green I reactions. NTCs should be included on each plate or batch of samples, and conditions for data rejection be established. For example, NTCs with $C_{qs} \geq 40$ could be ignored if the C_q for the lowest concentration unknown is 35.

Positive controls in the form of nucleic acids extracted from experimental samples are useful for monitoring assay variation over time and are essential when calibration curves are not performed in each run.

Quantification calibrators may be purified target molecules, such as synthetic RNA or DNA oligonucleotides spanning the complete PCR amplicon, plasmid DNA constructs, cDNA cloned into plasmids, RNA transcribed in vitro, reference RNA pools, RNA or DNA from specific biological samples, or internationally recognized biological standards (as they become available). Dilutions should be carried out into defined concentrations of carrier tRNA (yeast or *Escherichia coli* at 10–100 ng/ μ L). For detection of human pathogens, calibrators can be diluted into negative control sample RNA or DNA, or they can be diluted into healthy human plasma, after which lysis may be carried out in the presence of carrier tRNA. Serial dilutions of a particular template can be prepared as stock solutions that resist several freeze–thaw cycles. A fresh batch should be prepared when a C_q shift of 0.5–1.0 is detected. Alternatively, solutions for calibration curves can be stored for a week at 4 °C and then discarded.

For diagnostic assays, the qPCR should include an independently verified calibrator, if available, that lies within the linear interval of the assay. Positive and negative extraction controls are also recommended.

7.4. ASSAY PERFORMANCE

The following assay performance characteristics must be determined: PCR efficiency, linear dynamic range, LOD, and precision.

7.4.1. PCR efficiency. Robust and precise qPCR assays are usually correlated with high PCR efficiency. PCR efficiency is particularly important when reporting mRNA concentrations for target genes relative to those of reference genes. The $\Delta\Delta C_q$ method is one of the most popular means of determining differences in concentrations between samples and is based on normalization with a single reference gene. The difference in C_q values (ΔC_q) between the target gene and the reference gene is calculated, and the ΔC_{qs} of the different samples are compared directly. The 2 genes must be amplified with comparable efficiencies for this com-

parison to be accurate. The most popular method is not necessarily the most appropriate, however, and alternative, more generalized quantitative models have been developed to correct for differences in amplification efficiency (62) and to allow the use of multiple reference genes (30).

PCR amplification efficiency must be established by means of calibration curves, because such calibration provides a simple, rapid, and reproducible indication of the mean PCR efficiency, the analytical sensitivity, and the robustness of the assay. Amplification efficiency should be determined from the slope of the log-linear portion of the calibration curve. Specifically, PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$, when the logarithm of the initial template concentration (the independent variable) is plotted on the x axis and C_q (the dependent variable) is plotted on the y axis. The theoretical maximum of 1.00 (or 100%) indicates that the amount of product doubles with each cycle. Ideally, the CIs or SEs of the means of estimated PCR efficiencies are reported from replicated calibration curves.

Calibration curves for each quantified target must be included with the submitted manuscript so that this information can be made available to the reviewers; slopes and y intercepts derived from these calibration curves must be included with the publication. Differences in PCR efficiency will produce calibration curves with different slopes. As a consequence, differences between the C_q values of the targets and the references will not remain constant as template amounts are varied, and calculations of relative concentrations will be inaccurate, yielding misleading results.

C_q values >40 are suspect because of the implied low efficiency and generally should not be reported; however, the use of such arbitrary C_q cutoffs is not ideal, because they may be either too low (eliminating valid results) or too high (increasing false-positive results) (26).

7.4.2. Linear dynamic range. The dynamic range over which a reaction is linear (the highest to the lowest quantifiable copy number established by means of a calibration curve) must be described. Depending on the template used for generating calibration curves, the dynamic range should cover at least 3 orders of magnitude and ideally should extend to 5 or 6 \log_{10} concentrations. The calibration curve's linear interval must include the interval for the target nucleic acids being quantified. Because lower limits of quantification are usually poorly defined, the variation at the lowest concentration claimed to be within the linear interval should be determined. Correlation coefficients (r^2 values) must be reported, and, ideally, CIs should be provided through the entire linear dynamic range.

7.4.3. LOD. The LOD is defined as the lowest concentration at which 95% of the positive samples are detected. In other words, within a group of replicates containing the target at concentrations at the LOD, no more than 5% failed reactions should occur. Low-copy PCRs are stochastically limited, and LODs of <3 copies per PCR are not possible. If multiple reactions are performed, however, accurate quantification of lower concentrations can be obtained via digital PCR (29, 63, 64). Indeed, concentration calibrators can be checked by limiting dilution to show that the percentage of failed and successful reactions follows a Poisson distribution.

7.4.4. Precision. There are many explanations for variation in qPCR results, including temperature differences affecting the completion of annealing and/or denaturation, concentration differences introduced by pipetting errors, and stochastic variation. Precision in qPCR typically varies with concentration, decreasing with the copy number. Ideally, intraassay variation (repeatability) should be displayed in figures as SD error bars or as CIs on calibration curves with replicate samples. CVs should not be used with C_q s (29) but can be used to express the variance in copy numbers or concentrations. This technical variation should be distinguished from biological variation. Biological replicates can directly address the statistical significance of differences in qPCR results between groups or treatments. For diagnostic assays, it may also be necessary to report interassay precision (reproducibility) between sites and different operators.

7.5. MULTIPLEX qPCR

The ability to multiplex greatly expands the power of qPCR analysis (65, 66), particularly when applied to the simultaneous detection of point mutations or polymorphisms (67). Multiplexing requires the presentation of evidence demonstrating that accurate quantification of multiple targets in a single tube is not impaired, i.e., that assay efficiency and the LOD are the same as when the assays are run in uniplex fashion. This concern is of particular importance when targets of appreciably lower abundance are coamplified with highly abundant targets.

8. Data Analysis

Data analysis includes an examination of the raw data, an evaluation of their quality and reliability, and the generation of reportable results. Various data-collection and -processing strategies have been described, and a systematic evaluation has revealed that qPCR data-analysis methods differ substantially in their performance (68).

Detailed information on the methods of data analysis and confidence estimation is necessary, together with specification of the software used. The methods of identifying outliers and the disposition of such data must be specified. Documenting assay precision requires identification of the statistical methods used to evaluate variances (e.g., 95% CIs) and presentation of the corresponding concentrations or C_q values. Such information should include both repeatability and reproducibility data, if available. As discussed above, reporting of CVs for C_q s is inappropriate (29), because C_q s will always be lower (and therefore potentially misleading) than CVs calculated for copy numbers. Information must be provided on the methods used for assessing accuracy, including the statistical significance of reported differences between groups.

8.1. NORMALIZATION

Normalization is an essential component of a reliable qPCR assay because this process controls for variations in extraction yield, reverse-transcription yield, and efficiency of amplification, thus enabling comparisons of mRNA concentrations across different samples. The use of reference genes as internal controls is the most common method for normalizing cellular mRNA data; however, although the use of reference genes is commonly accepted as the most appropriate normalization strategy (69), their utility must be experimentally validated for particular tissues or cell types and specific experimental designs. Unfortunately, although there is an increased awareness of the importance of systematic validation and although the potentially highly misleading effects of the use of inappropriate reference genes for normalization are widely known, these considerations also are still widely disregarded (70). Consequently, many molecular analyses still contain qPCR data that are poorly normalized.

Normalization involves reporting the ratios of the mRNA concentrations of the genes of interest to those of the reference genes. Reference gene mRNAs should be stably expressed, and their abundances should show strong correlation with the total amounts of mRNA present in the samples.

Normalization against a single reference gene is not acceptable unless the investigators present clear evidence for the reviewers that confirms its invariant expression under the experimental conditions described. The optimal number and choice of reference genes must be experimentally determined and the method reported (71–73).

8.2. VARIABILITY

The inherent variability of biological systems may rival or exceed experimental differences between groups. This variation is often observed when many biological

replicates are used to increase the statistical significance of the experiment. Although differences between biological replicates may be large, sufficient numbers may allow smaller experimental differences to be discerned. A recent publication provides a textbook example for handling such data and how to salvage biologically meaningful data from assays subject to high biological variation (74). Many factors contribute to experimental variation and influence the number of biological replicates necessary to achieve a given statistical power. Consequently, power analysis is useful for determining the number of samples necessary for valid conclusions.

8.3. QUALITATIVE ANALYSIS

The use of the PCR to detect merely the presence of a nucleic acid template, rather than to quantify it accurately, is referred to as qualitative PCR, which is widely used in pathogen diagnostics. The problem with qualitative/quantitative stratification of PCR methods is that an accurate yes/no answer requires information about the low-end sensitivity of the PCR assay. Consequently, even a qualitative assay should provide information about the assay's performance characteristics, especially with respect to the points discussed in sections 7.4.2. and 7.4.3.

Conclusions

The necessity for ensuring quality-assurance measures for qPCR and RT-qPCR assays is well recognized (25, 44, 75–86). The main difference between qPCR and conventional (legacy) PCR assays is the expectation of the former's potential to quantify target nucleic acids accurately. This difference must be clearly recognized, and one cannot assume that legacy PCR assays can translate directly into the qPCR format. Table 1 provides a checklist for authors preparing a report of a qPCR study. Items deemed essential (E) are required to allow reviewers to evaluate the work and other investigators to reproduce it. Items considered desirable (D) are also important and should be included if possible, but they may not be available in all cases. Certainly, it is important to apply common sense: Compliance with all items on the checklist is not necessary for initial screening of expression signatures targeting hundreds of targets. Once a more limited set of targets (fewer than 20) has been identified, however, assay performance should be described as detailed by the checklist, which is hosted on <http://www.rdml.org/miqe/>.

In summary, the purpose of these guidelines is 3-fold:

1. To enable authors to design and report qPCR experiments that have greater inherent value.

2. To allow reviewers and editors to measure the technical quality of submitted manuscripts against an established yardstick.
3. To facilitate easier replication of experiments described in published studies that follow these guidelines.

As a consequence, investigations that use this widely applied technology will produce data that are more uniform, more comparable, and, ultimately, more reliable.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the Disclosures of Potential Conflict of Interest form. Potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: J. Hellems, Biogazelle; J. Vandesompele, Biogazelle; C.T. Wittwer, Idaho Technology.

Consultant or Advisory Role: R. Mueller, DermTech International.

Stock Ownership: R. Mueller, Sequenom; C.T. Wittwer, Idaho Technology.

Honoraria: None declared.

Research Funding: S.A. Bustin, Bowel and Cancer Research, registered charity number 1119105; J. Hellems, Fund for Scientific Research Flanders; M. Kubista, grant agency of the Academy of Sciences, Czech Republic (grants IAA500520809 and AV0250520701); C.T. Wittwer, ARUP Institute for Clinical and Experimental Pathology and Idaho Technology.

Expert Testimony: None declared.

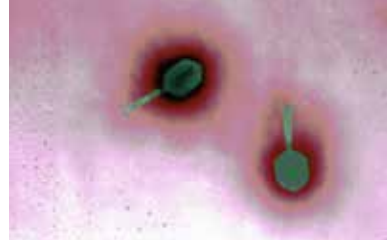
Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

References

1. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10:413–7.
2. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026–30.
3. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22: 130–8.
4. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169–93.
5. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95–125.
6. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002;48: 1178–85.
7. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292–305.
8. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190–212.
9. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;109: 365–79.
10. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 2006;27: 192–223.
11. van den Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schulin T, van der Vorm ER, Kuijper EJ. Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol* 2007;56:36–42.
12. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15:155–66.
13. Garson JA, Huggett JF, Bustin SA, Pfaffl MW, Benes V, Vandesompele J, Shipley GL. Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-W (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Forthcoming 2009.
14. Huang T, Bohlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O. The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 2005;309:1694–6.
15. Bohlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O. Retraction. *Science* 2007;316:367.
16. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Spellman G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29:365–71.
17. Taylor CF, Paton NW, Lilley KS, Binz PA, Julian RK Jr, Jones AR, et al. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nat Biotechnol* 2007;25:887–93.
18. Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P, et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat Biotechnol* 2008;26:541–7.
19. Echeverri CJ, Beachy PA, Baum B, Boutros M, Buchholz F, Chanda SK, et al. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods* 2006;3:777–9.
20. Haney SA. Increasing the robustness and validity of RNAi screens. *Pharmacogenomics* 2007;8: 1037–49.
21. Sansone SA, Fan T, Goodacre R, Griffin JL, Hardy NW, Kaddurah-Daouk R, et al. The metabolomics standards initiative. *Nat Biotechnol* 2007;25:846–8.
22. Taylor CF, Field D, Sansone SA, Aerts J, Apweiler R, Ashburner M, et al. Promoting coherent minimum reporting guidelines for biological and biomedical investigations: the MIBBI project. *Nat Biotechnol* 2008;26:889–96.
23. Burns MJ, Valdivia H, Harris N. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Anal Bioanal Chem* 2004;378: 1616–23.
24. Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* 2005;5:31.
25. Ellison SL, English CA, Burns MJ, Keer JT. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol* 2006;6:33.
26. Burns MJ, Valdivia H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur Food Res Technol* 2008;226:1513–24.
27. Lefever S, Hellems J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* [Epub ahead of print 2009 Feb 17]. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/gkp056>.
28. Wittwer CT, Kusakawa N. Real-time PCR. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang JW, Unger ER, Remlan DA, White TJ, eds. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. Washington: ASM Press; 2004. p 71–84.
29. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
30. Hellems J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007;8:R19.
31. de la Grange P, Dutertre M, Correa M, Auboeuf D. A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics* 2007;8:180.
32. Ben-Dov C, Hartmann B, Lundgren J, Valcarcel J. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2008;283:1229–33.
33. Bjornsson HT, Albert TJ, Ladd-Acosta CM, Green RD, Rongione MA, Middle CM, et al. SNP-specific array-based allele-specific expression analysis. *Genome Res* 2008;18:771–9.
34. Pattyn F, Robbrecht P, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. RTPPrimerDB: the real-time PCR

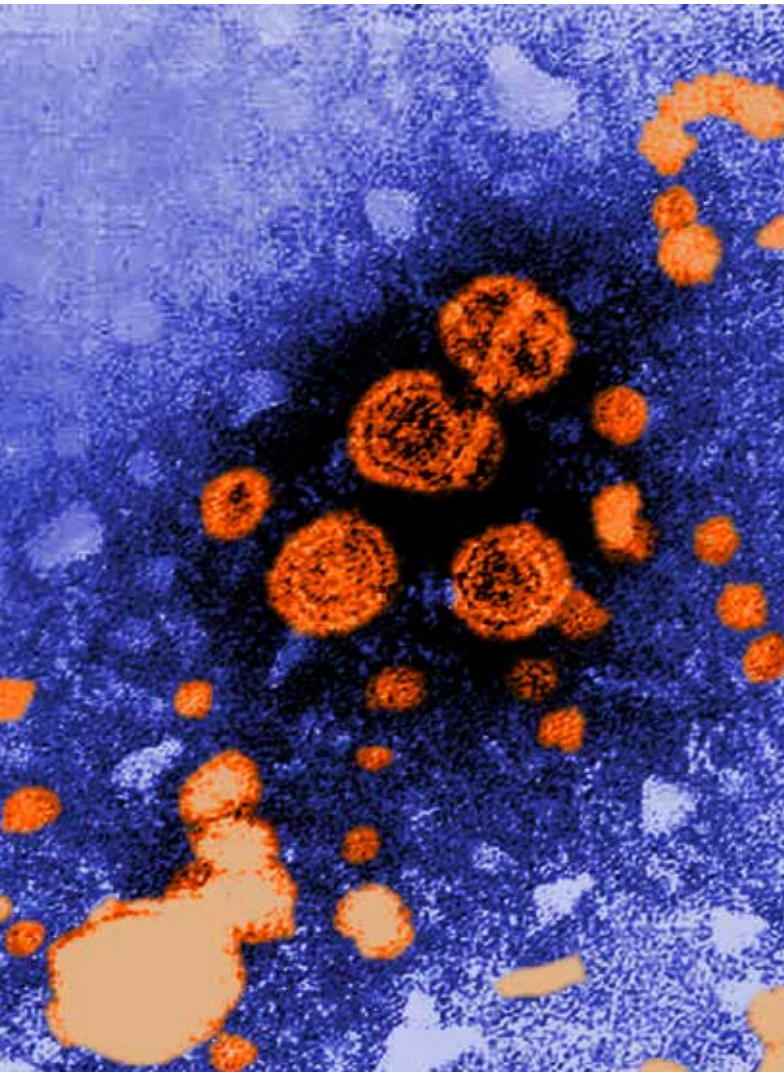
- primer and probe database, major update 2006. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D684–8.
35. Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, Vandesompele J. RPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res* 2003;31:122–3.
 36. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19:1720–30.
 37. Schmidt MW, Houseman A, Ivanov AR, Wolf DA. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Syst Biol* 2007;3:79.
 38. Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2008;29:579–84.
 39. Cronin M, Ghosh K, Sistare F, Quackenbush J, Vilker V, O'Connell C. Universal RNA reference materials for gene expression. *Clin Chem* 2004;50:1464–71.
 40. Novoradovskaya N, Whitfield ML, Basehore LS, Novoradovsky A, Pesich R, Usary J, et al. Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* 2004;5:20.
 41. Gingeras TR. RNA reference materials for gene expression studies. Difficult first steps. *Clin Chem* 2004;50:1289–90.
 42. Joseph LJ. RNA reference materials for gene expression studies. RNA metrology: forecast calls for partial clearing. *Clin Chem* 2004;50:1290–2.
 43. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34:597–601.
 44. Ramsden SC, Daly S, Geilenkeuser WJ, Duncan G, Hermitte F, Marubini E, et al. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin Chem* 2006;52:1584–91.
 45. Damond F, Benard A, Ruelle J, Alabi A, Kupfer B, Gomes P, et al. Quality control assessment of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) viral load quantification assays: results from an international collaboration on HIV-2 infection in 2006. *J Clin Microbiol* 2008;46:2088–91.
 46. Micke P, Ohshima M, Tahmasebpoor S, Ren ZP, Ostman A, Ponten F, Botling J. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest* 2006;86:202–11.
 47. Morrogh M, Olvera N, Bogomolny F, Borgen PI, King TA. Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. *Biotechniques* 2007;43:41–2, 4, 6 passim.
 48. Bustin SA. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5:493–8.
 49. Doma MK, Parker R. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 2007;131:660–8.
 50. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;27:126–39.
 51. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1:1559–82.
 52. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade BW, Bustin SA. SPUD: a qPCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal Biochem* 2006;351:308–10.
 53. Ferns RB, Garson JA. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a brome mosaic virus internal control. *J Virol Methods* 2006;135:102–8.
 54. Swango KL, Hudlow WR, Timken MD, Buoncristiani MR. Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int* 2007;170:35–45.
 55. Garson JA, Grant PR, Ayliffe U, Ferns RB, Tedder RS. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J Virol Methods* 2005;126:207–13.
 56. Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, Zumla A. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes* 2008;1:70.
 57. Ståhlberg A, Aman P, Ridell B, Mostad P, Kubista M. Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of κ and λ immunoglobulin light chain expression. *Clin Chem* 2003;49:51–9.
 58. Ståhlberg A, Hakanson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 2004;50:509–15.
 59. Ståhlberg A, Kubista M, Pfaffl M. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem* 2004;50:1678–80.
 60. Reiter M, Pfaffl M. Effects of plate position, plate type and sealing systems on real-time PCR results. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2008;22:824–8.
 61. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154–60.
 62. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E45.
 63. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS ONE* 2008;3:e2876.
 64. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9236–41.
 65. Elifiro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559–70.
 66. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 2001;25:430–42.
 67. Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Wittwer CT, King TC. Multiplex PCR by multicolor fluorimetry and fluorescence melting curve analysis. *Nat Med* 2001;7:249–53.
 68. Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C, Mermoud N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 2007;8:131.
 69. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6:279–84.
 70. Gutierrez L, Mauriat M, Guenin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* 2008;6:609–18.
 71. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
 72. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
 73. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245–50.
 74. Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem* 2008;379:127–9.
 75. Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-house nucleic acid amplification assays in research: How much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol* 2005;43:5835–41.
 76. Ciabatti I, Froiio A, Gatto F, Amaddeo D, Marchesi U. In-house validation and quality control of real-time PCR methods for GMO detection: a practical approach. *Dev Biol (Basel)* 2006;126:79–86; discussion 324–5.
 77. de Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, Vignaud S, Boudou E, Asselain B, et al. Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrine Relat Cancer* 2004;11:489–95.
 78. de Vries TJ, Fourkour A, Punt CJ, van de Locht LT, Wobbes T, van den Bosch S, et al. Reproducibility of detection of tyrosinase and MART-1 transcripts in the peripheral blood of melanoma patients: a quality control study using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer* 1999;80:883–91.
 79. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318–57.
 80. Lemmer K, Donoso Mantke O, Bae HG, Groen J, Drosten C, Niedrig M. External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections. *J Clin Virol* 2004;30:291–6.
 81. Marubini E, Verderio P, Raggi CC, Pazzagli M, Orlando C. Statistical diagnostics emerging from external quality control of real-time PCR. *Int J Biol Markers* 2004;19:141–6.
 82. Raggi CC, Verderio P, Pazzagli M, Marubini E, Simi L, Pinzani P, et al. An Italian program of external quality control for quantitative assays based on real-time PCR with Taq-Man probes. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:542–8.
 83. Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J. Assessing quality and functionality of DNA from fresh and archival dried blood spots and recommendations for quality control guidelines. *Clin Chem* 2007;53:1401–7.

84. Wang X, Jia S, Meyer L, Xiang B, Chen LY, Jiang N, et al. Comprehensive quality control utilizing the prehybridization third-dye image leads to accurate gene expression measurements by cDNA microarrays. *BMC Bioinformatics* 2006; 7:378.
85. Winters MA, Tan LB, Katzenstein DA, Merigan TC. Biological variation and quality control of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA quantitation by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31: 2960–6.
86. van der Velden VH, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007;21:706–13.



ATCC® VIROLOGY GUIDE

Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs



ATCC®

THE ESSENTIALS OF
LIFE SCIENCE RESEARCH
GLOBALLY DELIVERED™

CoolCell[®] LX Container

We've taken cryopreservation
to the next level of "cool"

The CoolCell[®] LX container is the definitive cryopreservation tool, providing:

- Ample sample space to create working stocks
- Durable, alcohol-free construction
- Dependable freezing rate

An easy-to-use device designed to support cell, viral, bacterial, protozoan, and fungal cultures using a slow freezing rate of -1°C per minute in a standard -80°C freezer.

Trust the leader in cryopreservation techniques, with over 85 years of experience, and order your CoolCell[®] LX Container (ATCC[®] No. ACS-6000[™]) today!

www.atcc.org/CoolCell



CoolCell[®] is a registered trademark of BioCision, LLC.
ATCC[®] is a registered trademark of the American
Type Culture Collection.

Table of Contents

This guide contains general technical information for viral growth, propagation, preservation, and application. Additional information on viral culturing can be requested from ATCC Technical Services at tech@atcc.org or can be found in *A Manual of Basic Virological Techniques*¹.

Getting Started with an ATCC Viral Strain... 1	Biosafety and Disposal21
Product Sheet1	Biosafety 21
Viral Taxonomy1	Disposal of Infectious Materials 21
Viral Replication1	Viral Authentication and Viability Testing 22
Preparation of Propagation Host and	Viability Testing 22
Reagents2	Viral Authentication 23
Opening Glass Ampoules Containing Frozen	Viral Applications24
Material2	Cell Transformation 24
Initiating Frozen Cultures2	Phage Therapy..... 24
Initiating Lyophilized Cultures3	Nanotechnology..... 24
Viral Replication and Propagation 4	Recombinant Vectored Vaccines 25
Propagation Host Range4	Glossary26
Viral Propagation.....5	Appendix.....27
Propagation of Common Viruses and	References.....28
<i>Chlamydia</i>7	ATCC Reagents for Virus Expansion31
Viral Titering9	
Growth Media for Tissue Culture-Adapted	
Viruses 12	
Media for Culturing Propagation Hosts 12	
Media Formulations 13	
Media Supplements 13	
Preservation 15	
Cryopreservation..... 15	
Lyophilization 18	
Preservation of Specific Strains20	
Special Hazards20	

Getting Started with an ATCC Viral Strain

ATCC viral strains are predominantly shipped either frozen on dry ice in plastic cryopreservation vials, or as lyophilized materials within glass ampoules or serum vials. Upon receipt of frozen material, either thaw and transfer the viral agent to an appropriate propagation host, or briefly store the frozen material between -70°C and -80°C to allow time to seed host cells. However, please note that the viability of some materials may decline at temperatures above -120°C. Upon receipt of freeze-dried strains, reconstitute cultures with sterile, double-distilled water and add the rehydrated material to an appropriate propagation host. If this is not possible, store the vials in liquid nitrogen vapor phase (below -120°C).

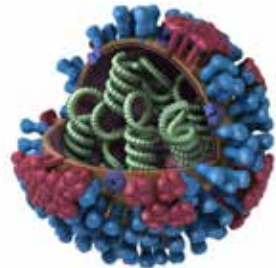
Product Sheet

ATCC viral strains are shipped with a product sheet that contains information on the production host and recommendations for infection. The product sheet and additional information can be found on the ATCC website or can be requested from the ATCC Technical Service Department.

Viral Taxonomy

Viruses are placed into taxonomic groups based on characteristics including morphology, genome type, and host organism. Viral agents can significantly vary in size, often ranging between 20 and 300 nanometers in diameter. They also vary in structure, including **helical**, **icosahedral**, **prolate**, **enveloped**, and **complex** morphologies.

In addition to unique morphological structures, viruses also vary in genomic structure. Unlike other microorganisms that have double stranded DNA as genomic material, viral genomes can be composed of double-stranded DNA, single-stranded DNA, double-stranded RNA, or single-stranded RNA. Single-stranded RNA viruses can be further described as **positive sense**, **negative sense**, or **ambisense**. For more detailed information on the various morphological and genomic types, please refer to the glossary.



Influenza ultra-structure courtesy of Jordan Douglas, CDC

Changes in taxonomy or further analysis of viral strains may lead to a change in nomenclature. Taxonomic nomenclature as well as the common name can be found on the product sheet. Further information on viral nomenclature is available online at <http://ictvonline.org/>.

Viral Replication

Viruses are pathogenic intracellular organisms requiring living cells in order to multiply. The virus life-cycle can be divided into three major steps: attachment, assembly, and release. Generally, infection is established when the virus binds to a specific cellular receptor and enters the host cell. Upon cellular entry, host proteins are recruited to assist with viral replication. Once viral structural proteins are generated, new viruses assemble within the cell. Depending on the nature of the viral agent, the replication and assembly process can vary in cellular location and process. Following viral assembly, new infectious particles either remain cell-associated or exit the cell via lysis or virus shedding.

Preparation of Propagation Host and Reagents

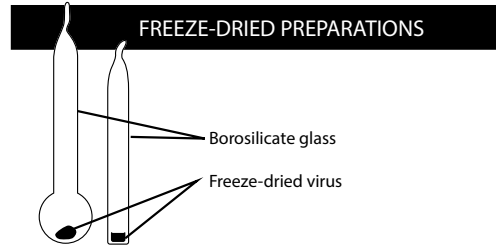
In advance, prepare the propagation host and associated reagents necessary for viral propagation. Information for the preparation of these products is available on the provided product sheet.

Opening Glass Ampoules Containing Frozen Material

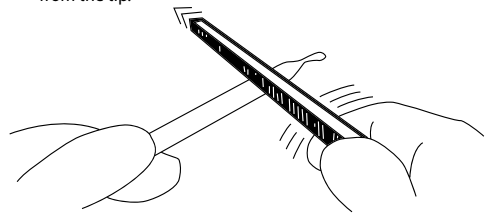
Overview

All cultures should be considered potentially hazardous and should be opened by individuals trained in microbiological techniques. Work should only be carried out in facilities with containment requirements appropriate for the biosafety level of the cultures. The handling or opening of glass ampoules containing virus material must be performed in a biological safety cabinet. Ensure that all empty vials are sterilized before disposal.

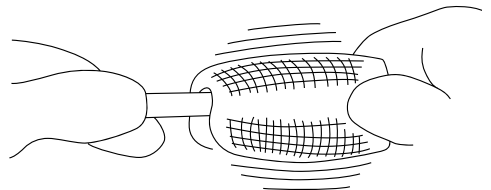
1. Disinfect the outside of the ampoule with freshly prepared 70% ethanol or dip it into a beaker of freshly prepared 70% ethanol.
2. To recover the material from the glass ampoule, score the neck of the ampoule with a sterile, small file.
3. Wrap the ampoule within several folds of a sterile towel or gauze to dry residual ethanol.
4. Working in a biological safety cabinet, hold the vial upright and snap open the vial. Ensure that your gauze does not become too wet with ethanol, or ethanol could be sucked into the culture when the vacuum is broken. Propagate the virus immediately.



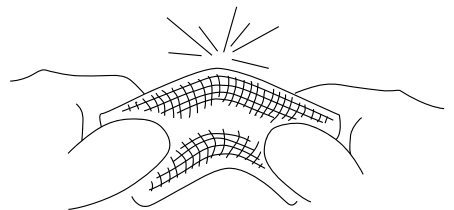
- 1 These preparations may be enclosed in a thin skin of cellulose; this skin must be removed (either with a sharp blade or by soaking in water for a few minutes). Score the ampule once briskly with a sharp file about one inch from the tip.



- 2 Disinfect the ampule with alcohol-dampened gauze



- 3 Wrap gauze around the ampule, and break at the scored area. Care should be taken not to have the gauze too wet, or alcohol could be sucked into the culture when the vacuum is broken. Rehydrate material at once.



Initiating Frozen Cultures

Tissue Culture-Adapted Strains

1. In advance, prepare the cell growth medium for growing the host cell line. Additionally, prepare the virus growth medium for virus propagation as noted on the product sheet. Viral growth medium is usually supplemented with a lower percentage of serum than cell growth medium, often ranging between 2-10% depending on the virus (See NOTE 1). Ensure that both the cell and viral growth media are equilibrated for temperature and pH.
2. Initiate the recommended production host, and

Getting Started with an ATCC Viral Strain



grow the monolayer to an appropriate confluency.

3. Prior to thawing the frozen virus stock, check the virus titer listed on the lot specific certificate of analysis to determine the amount of virus needed. Thaw the vial of frozen virus via gentle agitation in a water bath set at 37°C. Thawing will be rapid (approximately 2 minutes or until all ice crystals have melted).
4. Remove the vial from the water bath and decontaminate the outer surface using 70% ethanol. Follow strict aseptic conditions in a biological safety cabinet for all further manipulations.
5. Prepare the viral stock in base medium (without serum) unless specified.
6. Remove the cell growth medium from the cell culture, wash the monolayer of cells once or twice with PBS, and inoculate with the prepared viral stock to provide an optimal multiplicity of infection (MOI) as indicated on the product sheet, if applicable.
7. Propagate the virus according to the recommended infection conditions as described on the product sheet. For additional information, refer to the chapter Viral Growth and Propagation.

NOTE 1:

Viral growth medium prepared for tissue culture-adapted strains of Influenza should not be supplemented with FBS.

Strains Propagated in Chicken Eggs

1. In advance, prepare chicken eggs by incubating eggs under the recommended temperature and atmospheric conditions. Additionally, all eggs should be candled to ensure viability and properly developed embryos. Healthy embryos will have an air sac, well-developed blood vessels, and observable movement.
2. Prior to thawing the frozen viral preparation, check the certificate of analysis for lot specific titer information. Thaw the frozen virus vial via gentle agitation in a water bath set at 37°C. Thawing will be rapid (approximately 2 minutes or until all ice crystals have melted).
3. Remove the vial from the water bath and decontaminate the outer surface using 70% ethanol. Follow strict aseptic conditions in a biological safety cabinet for all further manipulations.
4. Inoculate eggs using the inoculation procedure described in the chapter Viral Growth and Propagation.

Initiating Lyophilized Cultures

1. Open vial according to enclosed instructions. Instructions are also available on the ATCC website, www.atcc.org, within the technical bulletin, "How to Revive Cultures".
2. Aseptically add an appropriate volume of sterile double-distilled water at room temperature. Mix well.
3. Dilute the sample in base medium (without serum) unless specified, and inoculate host cells to provide an optimal MOI as indicated on the product sheet, if applicable.

Viral Replication and Propagation

Propagation Host Range

For tissue culture-adapted strains, the appropriate selection and processing of cell cultures is important for successful viral isolation, titer, and infectivity². Typically, viruses can only infect a limited number of hosts, known as the host range. This is best explained by a “lock and key” mechanism as certain proteins on the viral surface must fit specific receptor sites on the host cell surface. When using ATCC viral strains, the recommended host is indicated on the provided product sheet. For customer convenience, ATCC Cell Biology holdings include cell lines for the propagation of viruses (Table 1, Appendix).

Table 1: Examples of propagation hosts for tissue culture-adapted viruses

ATCC [®] No.	Product Name	ATCC [®] No.	Propagation host
53592 [™]	<i>Chlamydomphila pneumonia</i> *	CCL-23 [™]	HEp-2
VR-129B [™]	Encephalomyocarditis	CCL-81 [™]	Vero
VR-1492 [™]	Human herpesvirus 4 (Epstein-Barr virus)	N/A	B95-8
VR-260 [™]	Humans herpesvirus 1	CCL-81 [™]	Vero
VR-734 [™]	Human herpesvirus 2	CCL-81 [™]	Vero
VR-1367 [™]	Human herpes 3	CCL-171 [™]	MRC-5
VR-538 [™]	Human herpesvirus 5	CCL-171 [™]	MRC-5
VR-93 [™]	Human parainfluenza	CCL-7.1 [™]	LLC-MK2 Derivative
VR-26 [™]	Human respiratory syncytial virus	CCL-23 [™]	HEp-2
VR-1540 [™]	Human respiratory syncytial virus	CCL-23 [™]	HEp-2
VR-1580 [™]	Human respiratory syncytial virus	CCL-23 [™]	HEp-2
VR-283 [™]	Human rhinovirus 16	CRL-1958 [™]	H1-HeLa
VR-95 [™]	Influenza A virus (H1N1)	N/A	SPF CE
VR-897 [™]	Influenza A virus (H1N1)	N/A	SPF CE
VR-1469 [™]	Influenza A virus (H1N1)	CCL-34 [™]	MDCK
VR-1520 [™]	Influenza A (H1N1)	CCL-34 [™]	MDCK
VR-544 [™]	Influenza A virus (H3N2)	N/A	SPF CE
VR-1679 [™]	Influenza A virus (H3N2)	CCL-34 [™]	MDCK
VR-1535 [™]	Influenza B virus	CCL-34 [™]	MDCK
VR-1583 [™]	JC polyomavirus	CRL-1651 [™]	COS-7

*For historical reasons and because of similar requirements for handling, *Chlamydia* and *Rickettsia* are included in this guide

Viral Propagation

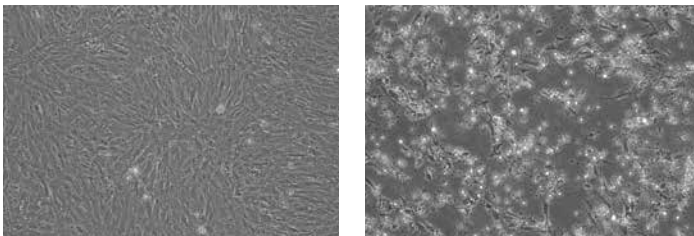
Propagation in Cell Culture

A number of ATCC viruses are propagated in cell culture. Typically, propagation hosts are grown in tissue culture vessels (such as T flasks) using media and reagents specified for the host cell line. Most cell lines are seeded the day prior to setting up an infection and should not be seeded more than two days in advance, nor passaged more than 9 times prior to infection. In addition to setting up cells for infection, negative control cells should also be set up to monitor cellular health.

1. Identify the recommended propagation host as indicated on the product sheet. Plan to use the propagation host.
2. Prepare the cell growth medium for growing the host cell line.
3. Prepare the virus growth medium as recommended on the product sheet.
4. One to two days prior to inoculation seed the host cells. Be sure to include a vessel that will not be inoculated with virus to serve as a negative control.
5. Allow cells to reach the appropriate confluency. (See NOTE 2)
6. Prior to thawing the frozen virus stock check the virus titer listed on the certificate of analysis. Quickly thaw the virus in a 37°C water bath.
7. Dilute the virus stock in the appropriate volume of viral growth medium.
8. Remove the cell growth medium from the cell culture flasks.
9. Inoculate the diluted virus to provide an optimal MOI as indicated on the product sheet.
10. Incubate tissue cultures under the appropriate temperature and atmospheric conditions for the recommended incubation period.
11. After the recommended incubation time period, check the flask for cytopathic effects (CPE) when applicable.

NOTE 2:

The required confluency of the host cell line will differ between viruses.



Propagation of Feline infectious peritonitis virus (ATCC® No. VR-2004™) in CRFK cells (ATCC® No. CCL-94™). The panel on the left are uninfected CRFK cells. The panel on the right are infected CRFK cells exhibiting CPE.

Propagation in Chicken eggs

Several ATCC virus holdings, such as influenza, are propagated in embryonated chicken eggs. There are many advantages to culturing in eggs, including easy care, quick viral replication, and an inherently aseptic environment. When culturing in embryonated eggs, ensure that eggs are viable, have properly developed blood vessels and air sacs and are obtained from pathogen-free flocks. Depending on the virus, different inoculation routes and/or organs may be used to cultivate the agent. These include the allantoic cavity, the amniotic cavity, the chorioallantoic membrane (CAM), and the yolk sac (Table 2). Below, we describe the procedures for allantoic cavity, amniotic cavity, and CAM inoculation. For the following procedures, ATCC

recommends performing viral inoculation and harvest within a biological safety cabinet. For additional information on the inoculation or propagation of embryonated eggs, contact ATCC technical services.

A. Allantoic Cavity Inoculation

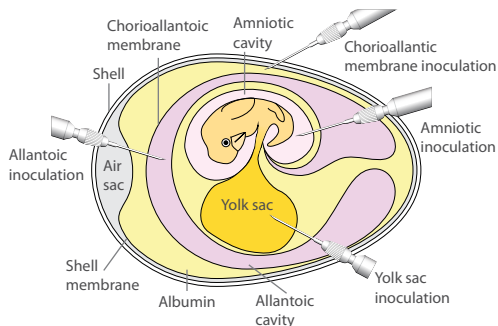
1. For allantoic cavity inoculation, most viruses require 10-day old embryos. While candling the eggs, draw a pencil line around the air sac. Using an 18.5 gauge needle, poke a hole into the air sac.
2. Using a 1.0 mL syringe fitted with a 22.5 gauge needle, inject the viral inoculum through the hole, into the allantoic cavity, being careful not to stick the embryo.
3. Seal the hole with tape or wax.
4. Incubate the inoculated eggs under conditions recommended for viral replication. Candle eggs 12-18 hours after inoculation and discard eggs that are non-viable.
5. To harvest allantoic fluid, refrigerate eggs for at least 2 hours post-incubation. Once the embryo is no longer viable, open the egg by tapping on the shell just above the air sac until the shell breaks.
6. Use sterile scissors to cut away the shell around the air sac.
7. Aspirate the allantoic fluid with a syringe or a pipette. Usually 5 mL can be harvested from each egg; this is considered infectious material.

B. Amniotic Cavity Inoculation

1. While candling the eggs, make a small hole in the side of the egg. Create the hole slowly as it is easy to accidentally stick the embryo.
2. Using a 1.0 mL syringe, insert the needle and syringe containing the viral inoculum into the egg until the amniotic sac moves slightly. The needle is then thrust through the membrane and the fluid is injected slowly.
3. Immediately seal the hole in the shell with tape or wax.
4. Incubate the inoculated eggs under conditions recommended for viral replication.
5. Candle eggs 12-18 hours after inoculation and discard eggs that are non-viable.
6. To harvest amniotic fluid, refrigerate eggs for at least 2 hours post-incubation. Once the embryo is no longer viable, open the egg by tapping on the shell just above the air sac until the shell breaks.
7. A needle and syringe must be used to aspirate the fluid. The needle may be inserted directly into the amniotic sac, or the embryo may be carefully removed from the egg and placed in a petri dish. Typically, one embryo will yield about 1.0 mL of fluid.

C. Chorioallantoic Membrane (CAM) Inoculation

1. Mark an area free from large blood vessels on the side where the embryo is located and the area over the air sac.
2. Make one hole on the side and one over the air sac. Puncture the shell taking care not to damage the CAM.
3. Gently apply suction to the hole over the air sac. Do this over an egg candler to see the CAM drop and the new air sac form.



Viral Replication and Propagation

4. Add 1.0 mL of the viral inoculum on the dropped membrane and rotate the egg to distribute the inoculum over the membrane.
5. Seal the hole with nail polish.
6. Candle inoculated eggs daily. Any embryos that die within 24 hours should be discarded.
7. To harvest, refrigerate eggs for at least 2 hours. Once the embryo is no longer viable, make a tape handle over the area of inoculation. To do so, cut a piece of tape, without joining either end, join the middle of the piece together leaving both ends free to adhere to the egg shell with a middle piece that is no longer sticky, forming a handle sticking up from the egg shell.
8. Cut off the top half of the eggshell, including the infected area, and gently remove the CAM, which is attached to the shell.
9. Place the infected CAM in a tissue culture dish with PBS, spread the membrane flat against the dish, and place the dish on a dark surface to facilitate counting of pocks.

Table 2: Examples of ATCC viruses propagated in embryonated chicken eggs

Product Name	Egg Age (Days)	Inoculation Route	Incubation (Days)	Optimal Temperature (°C)	Death of Embryo
Influenza A virus	10-11	Allantoic	2-3	33-35	-
Influenza B virus	10-11	Allantoic	2-3	33-35	-
Sendai virus	10-11	Allantoic	2-3	35-37	+
Rabies virus	7	Yolk	9-10	36.5	-

Propagation of Common Viruses and *Chlamydia*

Human herpesvirus 4 (Epstein-Barr Virus)

Epstein-Barr virus (EBV) is a universal human pathogen commonly transmitted via saliva³. Primary infections among adolescents and young adults result in mononucleosis, a condition characterized by fever and the swelling of lymph tissues. Following infection, EBV remains in a latent stage in most adults. In rare cases, the virus may reactivate and contribute to neoplastic disorders such as Burkitt's lymphoma or post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD)⁴. To propagate EBV, the virus is often harvested from tumors growing on patients with Burkitt's lymphoma, or obtained from a biological resource center such as ATCC, and further grown in human lymphoblastoid cells.

ATCC® No. VR-1492™, VR-603™, VR-602™

Recommended Host: Human lymphoblastoid cells

Preparation: Infected tissue culture with DMSO and FBS

Incubation: 5-15 days at 37°C

Atmosphere: 5% CO₂ in an air atmosphere

Effect: Polykaryocyte formation and cell swelling

Influenza

Influenza viruses are highly contagious, enveloped, airborne pathogens that cause acute febrile illness, fatigue, and respiratory infection. There are three types of influenza including influenza A, B, and C, which are distinguished by the presence of specific, core nucleoproteins. Of these viral types, influenza A is considered the most pathogenic. To propagate influenza, the virus is often cultured in the allantoic fluid of

embryonated chicken eggs. However, some strains are propagated in amniotic fluids or have been adapted for growth in tissue culture.

ATCC[®] No. VR-1469[™], VR-95[™], VR-1520[™], VR-544[™], VR-897[™], VR-1679[™], VR-1807[™], VR-1811[™], VR-1813[™]

Recommended Host: Pathogen-free embryonated chicken egg, 10-11 days old, or MDCK cells (ATCC[®] No. CCL-34[™])

Preparation: Infected chicken egg allantoic fluid, infected tissue culture

Incubation: 2-3 days at 34°C for influenza propagated in chicken eggs (CE), 33-35°C for influenza propagated in tissue culture (TC). Harvest when CPE has progressed throughout the monolayer.

Atmosphere: An air atmosphere for CE, 5% CO₂ atmosphere for TC. CO₂ level is determined by media formulation.

Effect: Hemagglutination of chicken red blood cells, cell rounding sloughing in tissue culture.



Image of Influenza courtesy of Dr. Erskine L Palmer and ML Martini, CDC

Respiratory Syncytial Virus

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of respiratory illness in young children, resulting in pneumonia and bronchiolitis. In adults, RSV often manifests symptoms similar to the common cold. This virus is commonly transmitted when droplets containing the virus are aerosolized by coughing or sneezing.

ATCC[®] No. VR-1540[™], VR-1540P[™], VR-26[™], VR-1580[™], VR-1803[™]

Recommended Host: HEp-2 (ATCC[®] No. CCL-23[™]) and HeLa (ATCC[®] No. CCL-2[™]) cells

Preparation: Infected tissue culture fluid and cell lysate

Incubation: 5-12 days at 37°C

Atmosphere: 5% CO₂ in an air atmosphere

Effect: Syncytia formation

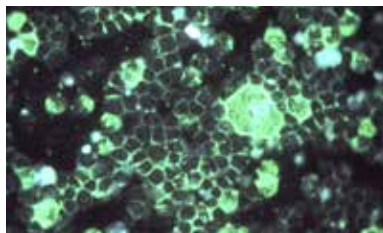


Image of Respiratory Syncytial Virus courtesy of Dr. Craig Lyerla, CDC

Chlamydia

Species within the *Chlamydia* genus are obligate intracellular bacterial pathogens commonly transmitted through sexual activity. Common symptoms associated with *Chlamydia* species include conjunctivitis, pelvic inflammatory disease, and infection of the reproductive organs. These bacterial species are commonly categorized with viruses as they have similar propagation properties. Often it is recommended that the *Chlamydia* stock be sonicated first before inoculating cells, and infection may be enhanced by centrifugation after inoculation. Follow the specific instructions on the product sheet for preparing the cells.

ATCC[®] No. VR-123[™], VR-346[™], VR-347[™], VR-573[™], VR-879[™], VR-885[™], VR-886[™], VR-887[™]

Recommended host: McCoy cells (ATCC[®] No. CRL-1696[™])

Preparation: Infected tissue culture fluid and cell lysate

Incubation: 2-3 days at 35-37°C

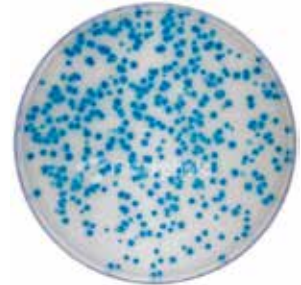
Atmosphere: 5% CO₂ in an air atmosphere

Effect: Intracellular inclusion bodies visualized by fluorescent staining with genus or species specific conjugated monoclonal antibodies.

Viral Titering

Plaque Assay

Calculating viral titer is necessary in order to determine viral infectivity. This can be determined by a plaque assay or through calculating the infectious dose. The plaque assay was initially developed to count and measure the infectivity level of bacteriophages. This technique has since been modified for use in animal virology, and has been a reliable determination of titer for a number of tissue culture-adapted viruses. The basis of this assay is to measure the ability of a single infectious virus to form a plaque on a cell culture monolayer. A plaque is developed as part of the viral infection cycle, where following viral replication, the host cell dies⁵.



Plaque assay of a tissue culture-adapted viral strain.

1. Grow the host cells in wells with the recommended growth medium for the cell line. Allow the cells to reach the appropriate confluency.
2. Remove the growth medium and wash with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS). Add diluted virus to each well, using multiple wells per dilution.
3. Incubate dishes for 1-2 hours to allow for viral adsorption.
4. Remove the inoculum and wash with basal medium, if applicable.
5. Overlay the cells with overlay medium. Incubate for a length of time appropriate for infection. Remove overlay, if applicable.
6. Observe the cell monolayers daily for the presence of foci or plaques
7. Count the number of plaques on plates with 20 or more plaques. The average amount of plaques per Petri dish multiplied by the virus dilution gives the number of plaque forming units (PFU) per volume of inoculum. This number may be expressed as the titer of the virus. (See NOTE 3)

NOTE 3:

This is a general procedure used to determine the potency of a virus. Please refer to the following references for more details on this procedure: *A Manual of Basic Virological Techniques*, published by Prentice-Hall Inc.¹, or *Virology Methods Manual*, published by Academic Press. (1996)⁵.

Tissue Culture Infectious Dose (TCID)

Viral titer can be determined *in vitro* by calculating the infectious dose. For tissue culture-adapted strains, this calculation is ascertained through an endpoint dilution assay in cell culture. The most reproducible endpoint of the dilution assay is the dilution of the virus that will produce a pathological change in 50% of the cell cultures inoculated. This number is expressed as 50% the infectious dose, or TCID₅₀, which is analogous to the calculation for lethal dose 50. The accuracy of this method is related to the number of replicates at each dilution⁵.

1. Prepare a cell culture plate with the recommended cell line for viral propagation (preferably the same cells that the virus being tested was grown in).
2. Incubate the plate under the appropriate conditions for cell growth until cells reach an optimum density for infection.
3. Prepare viral dilutions in base medium.
4. Remove cell growth medium from plate, the monolayer may be washed with remove any inhibitory agents.
5. Inoculate at least 3 wells with each dilution. Be sure to inoculate wells with base medium to serve as negative controls. Use a fresh, sterile pipette for each dilution.
6. Allow the plate to incubate for 1 to 2 hours under conditions suitable for virus adsorption.

7. Add viral growth medium and incubate the plate under conditions suitable for the virus and observe all wells daily. Record results for each well daily.
8. The endpoint is determined when the CPE or immunofluorescence assay (IFA) read-out appear the same per dilution for 3 separate readings.
9. The titer is calculated using the method of Reed and Muench⁶. A titer expressed as $10(3.0)TCID_{50}/0.2\text{ mL}$ in 3 days in XXXX cell line may be translated as: 0.2 mL of virus diluted at 1:1000 will infect 50% of the cells in 3 days when using XXXX cell line. (See NOTE 3)

The $TCID_{50}$ can be converted to plaque forming units (PFU) using the Poisson distribution. This conversion is an estimate based on the rationale that the limiting dilution, which would infect 50% of the cell layers challenged, would be expected to produce a single plaque in a cell monolayer. However, ATCC recommends that the actual number of PFUs be determined empirically.

To estimate PFU from $TCID_{50}$, the Poisson distribution can be applied; $P(o)$ is the proportion of negative tubes and 'm' is the mean number of infectious units per volume (PFU/mL), $P(o)=e(-m)$. For any titer expressed as $TCID_{50}$, $P(o)=0.5$. Thus, $e(-m)=0.5$ and $m=-\ln 0.5$, which is ≈ 0.7 . Therefore, one could multiply the $TCID_{50}$ titer (per mL) by 0.7 to predict the mean number of PFU/mL. For example, one can assume that material with a $TCID_{50}$ of $1 \times 10^5\text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ will produce approximately $0.7 \times 10^5\text{ PFU}/\text{mL}$. When applying this calculation, remember that the estimated mean will only be valid if the changes in the protocol required to visualize plaques do not alter viral expression as compared to conditions used to determine $TCID_{50}$.

Chicken Embryo Infectious Dose (CEID)

For viruses normally propagated in chicken eggs, such as influenza virus, viral titer is calculated as the chicken embryo infectious dose (CEID). Viral cultures are serially diluted and are used to inoculate embryonated chicken eggs. Following incubation, allantoic fluid is harvested from each egg at all dilutions and virus titer is determined by the appearance of hemagglutination. A positive hemagglutination reaction indicates the virus is present at that dilution.

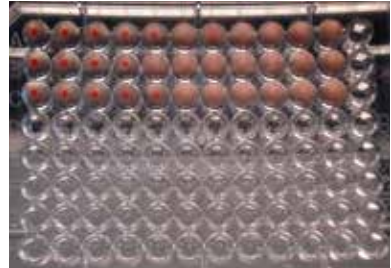
1. Order embryonated chicken eggs of the proper age, 8-12 days old depending on the virus. When the eggs arrive, place them in an incubator at an appropriate temperature with a dish of water close by to provide moisture to prevent the eggs from drying out.
2. When you are ready to inoculate, candle the eggs to locate the air sac and embryo. Using a pencil, outline the air sac area and indicate where the embryo's eye is located. In a biological safety cabinet, punch a hole into the shell within the defined air sac area, on the opposite side of the egg from the embryo's eye. Inoculate the allantoic fluid of each egg with the serial dilution of virus. Seal the hole with nail polish and incubate the eggs near a pan of water at the proper temperature as recommended on the provided product sheet. (See NOTE 4)
3. Candle the eggs 24 hours post-inoculation to check for viral-induced death. Place any of the dead eggs into a biohazard bag, seal the bag with autoclave indicator tape and refrigerate to await autoclaving. Return the rest of the eggs to the incubator.
4. Following the recommended incubation period, harvest the virus. Depending upon the virus, death of the embryo may have occurred. By this time, a viable embryo will have grown much larger, will be more active, and the network of blood vessels will be more visible. A dead embryo will not move and the egg may or may not be as transparent and the blood vessels will have mostly disappeared. For viable embryos, sacrifice the embryo prior to viral harvesting by placing the egg at 4°C for at least 2 hours.
5. Prepare a 0.5% suspension of chicken red blood cells using phosphate buffered saline (PBS) while the infected eggs are chilling in a biological safety cabinet. Use sterile forceps to break the top of the shell

NOTE 4:

A viable egg has a series of small blood vessels within the allantoic membrane, which can be seen during candling. Additionally, the embryo's eye will look like a black spot, which will move.

open and pull back the allantoic membrane. Place all egg fragments, including parts of the shell into a double biohazardous materials bag. Harvest the allantoic fluid from each egg by using a pipette to collect the fluid into a different well of a rounded-bottom 96 well plate for each egg, being sure to use a new pipette for each dilution.

6. Add a 1:1 ratio of the 0.5% red blood cell suspension to allantoic fluid in each tube. Mix by gently tapping and allow the red blood cells to settle to the bottom of the wells. After 30-45 minutes at room temperature, read the hemagglutination assay by recording the presence of a button of cells or the presence of a lattice formation at the bottom of the tube. A negative result is seen by the button of red blood cells at the bottom of the rounded well. A positive result is seen by the formation of the lattice formation at the bottom of the rounded well. Once the results are properly recorded, place the plate in a biohazard bag to await proper decontamination.
7. The end point is taken to be the highest dilution of virus suspension that produces a positive result. HA = 1:640 means that the virus was titered by a hemagglutination assay (HA) and the endpoint for the assay was a dilution of 1:640. (See NOTE 3)



Hemagglutination assay depicting Influenza B virus (ATCC® No. VR-295™) at dilutions varying from 10^{-9} to 10^{-1} .

Left column = Negative control
Columns 2-10 = Dilutions 10^{-9} to 10^{-1}
Column 11 = Positive control

Growth Media for Tissue Culture-Adapted Viruses

Media for Culturing Propagation Hosts

For the propagation of tissue culture-adapted viruses, it is important to grow and maintain the host cell line in an appropriate medium. The recommended media for all host cells is indicated on the product sheet for the host cell line and can also be found online at www.atcc.org.

Cell culture media are complex mixtures of salts, carbohydrates, vitamins, amino acids, metabolic precursors, growth factors, hormones, and trace elements. The requirements for these components vary among cell lines. Carbohydrates are supplied primarily in the form of glucose. In some instances, glucose is replaced with galactose to decrease lactic acid build-up, as galactose is metabolized at a slower rate. Other carbon sources include amino acids (particularly L-glutamine) and pyruvate.

In addition to nutrients, the medium helps maintain the pH and osmolality in a culture system. The pH is maintained by one or more buffering systems; CO₂/sodium bicarbonate, phosphate, and HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) are the most common. Sera will also buffer a complete medium. Phenol red, a pH indicator, is added to the medium to colorimetrically monitor changes in pH. Media commonly used in the propagation of tissue culture-adapted strains include the following:

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (EMEM) ATCC's modification of EMEM (ATCC® No. 30-2003) contains Earle's balanced salt solution, non-essential amino acids, L-glutamine, and sodium pyruvate. It is formulated with a reduced sodium bicarbonate concentration (1,500 mg/L) for use with 5% CO₂. Because EMEM is a simple medium, it is often fortified with additional supplements or higher levels of serum.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (DMEM) has roughly twice the concentration of amino acids and four times the amount of vitamins as EMEM, as well as ferric nitrate, sodium pyruvate, and some supplementary amino acids (though not all nonessential amino acids). The original formulation contained 1,000 mg/L of glucose, but in the more commonly used variations this amount was increased to 4,500 mg/L. ATCC DMEM (ATCC® No. 30-2002) has 4,500 mg/L of glucose and a reduced sodium bicarbonate concentration (1,500 mg/L) for use with 5% CO₂.

RPMI-1640 ATCC's RPMI-1640 (ATCC® No. 30-2001) was modified to contain higher amounts of glucose (4,500 mg/L), sodium pyruvate, and HEPES buffer. It also contains a reduced concentration of sodium bicarbonate (1,500 mg/L) for use with 5% CO₂.

Leibovitz's L-15 Medium (ATCC® No. 30-2008) is formulated for free gas exchange with atmospheric air. The standard sodium bicarbonate/CO₂ buffering system is replaced by a combination of phosphate buffers, free-base amino acids, higher levels of sodium pyruvate, and galactose. A CO₂ and air mixture is detrimental to cells when using this medium for cultivation. However, cell cultures can be grown in CO₂ incubators with L-15 medium provided there is no exchange between the air in the culture vessel with that of the incubator (i.e., caps of flasks are tightly closed).

VeroPlus SFM (ATCC® No. ACS-4001) is a defined, serum-free, animal component-free medium that contains inorganic salts, vitamins, amino acids, glucose, and phenol red. VeroPlus SFM should be supplemented with L-glutamine (ATCC® No. 30-2214) prior to use.



Media Formulations

The formulations for media used by ATCC can be found online. Please note that there are cell lines in the collection used for viral propagation that may require media that is not currently sold by ATCC.

Media Supplements

The growth media recommended for host propagation may require the addition of components not already available in the base medium. These components may include hormones, growth factors, or serum.

After supplements have been added to the base medium, the shelf life of the medium should be determined on a case-by-case basis. Media containing serum, antibiotics, and/or antimycotics tend to degrade faster than base media alone. Media containing supplements should not be frozen as this may cause certain compounds to precipitate out of solution; media should be stored at 2°C to 8°C. For additional information regarding the preparation, storage, or usage of specific additives, contact your local supplier or consult with the manufacturer's product information sheet.

Serum

Serum can serve as a source of growth factors, proteins, vitamins, hormones, carbohydrates, lipids, amino acids, minerals, and trace elements. The exact composition of serum is unknown and varies from lot to lot, although lot-to-lot consistency has improved in recent years.

Sera from fetal bovine sources are commonly used to maintain cell cultures in preparation for viral infection. Fetal serum is a rich source of growth factors and is appropriate for the growth of fastidious cells. It is often supplied at a concentration of 2-10%. (See NOTE 5)

Unfortunately, naturally derived products from animals, such as sera, may contain adventitious microorganisms. All reputable suppliers routinely test their products for infectious viruses by several methods including fluorescent antibody labeling, cytopathic effect, and hemadsorption. These products are also screened for the standard microbial contaminants such as bacteria, fungi, and mycoplasma. To reduce the risk of any possible contamination, ATCC recommends that all serum should be triple filtered through 0.1 µm sterile filters before use.

ATCC offers the following types of animal sera:

- Fetal Bovine Serum (also known as fetal calf) – ATCC® No. 30-2020
- Fetal Bovine Serum qualified for embryonic stem cells – ATCC® No. SCRR-30-2020
- Iron-supplemented Calf Bovine Serum – ATCC® No. 30-2030
- Horse Serum – ATCC® No. 30-2040

These products are rigorously tested for adventitious infective agents and sourced only from U.S. herds. Further, each lot is tested for its ability to support cell culture growth and is the same sera used in ATCC labs.



NOTE 5:

For viral inoculation, ATCC recommends decreasing the percentage of serum to 2% as it can interfere with viral attachment. This can vary from strain to strain, and is not applicable for influenza viruses.

A. Storage

Do not store serum at temperatures above -20°C for any length of time. Avoid any repeated freeze-thaws by dispensing and storing sera in aliquots. Additionally, ensure that sera are stored away from direct light.

B. Thawing

The following procedure is used to thaw serum:

1. Place the frozen serum in a refrigerator at 2°C to 8°C overnight.
2. Put the bottles in a 37°C water bath and gently agitate occasionally to mix the solutes that tend to concentrate at the bottom of the bottle.

Do not keep the serum at 37°C any longer than necessary to thaw it, and do not thaw the serum at higher temperatures. Thawing serum in a bath above 40°C without mixing may lead to the formation of a precipitate inside the bottle.

C. Turbidity and precipitates

All sera may retain some fibrinogen. Because external factors may initiate the conversion of fibrinogen to fibrin, flocculent material or turbidity may be observed after the serum is thawed. The presence of this material does not alter the serum's performance. If the presence of flocculent material or turbidity is a concern, it can be removed by filtration through a 0.45 µm filter.

A precipitate can form in serum when incubated at 37°C or higher for prolonged periods. This is often mistaken for microbial contamination. This precipitate may include crystals of calcium phosphate, but this does not alter the performance of the serum as a supplement. Heat inactivation of sera can also cause the formation of precipitates.

Additives and Cryoprotectants

To preserve viral strains by cryopreservation, ATCC may use a mixture of FBS and DMSO (ATCC[®] No. 4-X) or glycerol. Some viruses require a specialized mixture of cryoprotectants or additives. For more information, refer to the cryopreservation section of the chapter entitled Preservation.

Preservation

There is no single procedure that is optimal for the preservation of all animal viruses. Both the type of agent and recommended growth conditions of the culture influence the method of cryopreservation, and the determination of these ideal conditions may require some experimentation. There are many advantages of preservation that far outweigh the required investment in equipment and reagents for continuous *in vitro* expansion. These advantages include:

- Overall safety of viral stocks against loss due to equipment failure or contamination by other microbial organisms.
- Elimination of time, energy, and material costs associated with the maintenance of viral strains not currently in use.
- Insurance against phenotypic drift due to genetic instability and/or selective pressures.
- Creating a standard reagent that can be used for a series of experiments.

The methodologies used at ATCC have proven successful for a large number of organisms. Currently, ATCC only uses cryopreservation methods to preserve viral strains. However, several viral strains in the collection are available as freeze-dried (lyophilized) cultures. The basic methodology for the cryopreservation and lyophilization of viruses are described in the subsequent sections. For historical reasons and because of similar requirements for handling and preservation, *Chlamydia* and *Rickettsia* species are also included here.

Cryopreservation

Overview

Freezing a viral suspension often results in a decrease in viability and titer^{11,12}. For cell-associated pathogens, such as *Chlamydia* and *Rickettsia*, as the suspension is cooled below the freezing point, ice crystals begin to form and the concentration of solutes in the suspension increases resulting in damage of host cell structures. This can be minimized if water within the cells is allowed to escape by osmosis during the cooling process; a slow cooling rate, generally -1°C to -10°C per minute, facilitates this progression. However, as host cells lose water, they shrink in size and will quickly lose viability if they surpass a minimum threshold volume. The addition of cryoprotectant agents, such as glycerol or dimethylsulfoxide (DMSO), will mitigate these effects^{13,14}.

The viability of viruses that are not cell-associated is best maintained by rapid freezing. In this method, samples are quickly frozen in a dry ice slurry and stored in liquid nitrogen vapor or within a mechanical freezer at -80°C .

Overall, there are numerous factors that can affect the viability of recovered viruses. These critical parameters can include the composition of the cryoprotectant and the viral titer. For cell-associated viruses, obtain optimal cell viability upon recovery by modifying the cryopreservation procedure for each viral strain. Contact ATCC for more information on the cryopreservation of viral strains.

Freeze Medium

Glycerol and DMSO are the most common cryoprotectant agents. To preserve viral strains, ATCC commonly uses a mixture of FBS and DMSO or glycerol. When employing these cryoprotectants, use only reagent-grade DMSO or glycerol. Store both in aliquots protected from light. ATCC offers DMSO (ATCC® No. 4-X) that has been thoroughly tested for use.

Some viruses require specialized preservation methods. Several representative strains with unique preparations are listed in Table 3; however, these examples and methods may not be applicable to all members of the group. Overall, the optimum formulations for individual viral strains must be determined empirically.

Table 3: Examples of Frozen Preparations

ATCC [®] No.	Product Name	Preparation
VR-1 [™]	Human adenovirus 1	Infected culture medium
VR-343 [™]	Japanese encephalitis virus	Infected culture medium diluted 1:1 with calf serum
VR-977 [™]	Human herpesvirus 5	Infected culture medium (EMEM + 10% FBS + 7% DMSO)
VR-897 [™]	Influenza A virus (H1N1)	Infected allantoic medium
VR-955 [™]	Human respiratory syncytial virus	Infected culture medium (EMEM + 2% FBS)
VR-129B [™]	Encephalomyocarditis virus	Infected culture medium (MEM + 2% FBS)
VR-838 [™]	Raccoonpox virus	Infected culture medium (EMEM + 2% FBS)
VR-156 [™]	Vaccinia virus	Infected culture medium (L-15 + 2% FBS + L-glut)
VR-659 [™]	Rous sarcoma virus	Infected culture medium (M199)
VR-137 [™]	Rabies street virus	10% infected mouse brain suspension in PBS + 10% horse serum
VR-612 [™]	<i>Rickettsia akari</i>	Infected yolk sac diluted 1:1 in sucrose-phosphate glutamate

Equipment

A. Cryopreservation vials

There are two materials to choose from for cryopreservation vials: glass or plastic. Glass vials are more difficult to work with: they need to be sterilized before use, they need to be sealed with a hot flame, and they can be difficult to open. However, they are considered fail-safe once properly sealed.

If cryopreservation in glass ampoules is not possible, plastic vials can be used. Plastic vials come in two varieties: those with an internal thread and silicone gasket, and those with an external thread. Vials with an internal-thread were the first commercially available, but have some disadvantages over the external-thread version. For example, while the silicone gasket provides an excellent seal, it needs to be tightened just right; the vial will leak if the seal is too tight or too loose.

B. Controlled-rate freezing chambers

For cell-associated viruses, there are several means to achieve a cooling rate of -1°C per minute. The best method involves the use of a computer controlled, programmable electronic freezing unit (such as Thermo Scientific[®] CryoMed Freezers), which rigorously maintains this rate of cooling. This is the method used exclusively at ATCC. Such equipment is relatively expensive and necessary for only the most sensitive strains.

A less costly approach is to place the cryopreservation vials into an insulated chamber and cool for 24 hours in a mechanical freezer at -70°C or colder. There are several commercially available freezing chambers, which achieve a cooling rate very close to the ideal -1°C per minute (CoolCell[®] LX; ATCC[®] ACS-6000). Alternatively, the vials can be placed into a polystyrene box, with 15 mm (3/4 inch) thick walls and 1 L capacity that is packed with paper, cotton wool, or foam peanuts for insulation.

Liquid Nitrogen Freezing Storage

The ultra-low temperatures (below -120°C) required for long-term storage can be maintained by specialized electric freezers, or more commonly, by liquid nitrogen freezers. There are two basic types of liquid nitrogen storage systems: immersing vials in the liquid or holding vials in the vapor phase above the liquid. The liquid-phase system holds more nitrogen and thus requires less maintenance. However, there is always a chance that some liquid will enter improperly sealed vials, which may then explode when retrieved. For this reason, ATCC strongly recommends storage in the vapor-phase.



Vapor-phase storage systems create a vertical temperature gradient within the container. The temperature in the liquid nitrogen at the bottom will be -196°C , whereas the temperature at the top will vary depending upon the amount of liquid nitrogen at the bottom and the length of time the container is opened. To ensure the safe storage of cells, maintain sufficient levels of liquid nitrogen in the container so that the temperature at the top is -120°C or colder. All storage systems should be equipped with temperature alarms.

Cryopreservation Procedure

A. Uncontrolled Freezing

The viability of most viruses is best maintained by fast freezing after harvesting. Dispense the material into ampoules, place the ampoules in a rack, and dip in a dry ice/ethanol bath. Store the frozen material in liquid nitrogen vapor or in a mechanical freezer at -80°C .

B. Controlled Freezing

To preserve cell-associated pathogens, such as *Chlamydia* and *Rickettsia*, a controlled freeze is preferred.

1. Incubate the viral agent under the recommended conditions until a maximum yield is obtained (maximum cytopathic effect if applicable).
2. Add a cryoprotective agent to the viral suspension. For many viral strains, this will be a mixture of FBS and DMSO or glycerol. Some strains may require specialized conditions, examples of these can be found in Table 1.
3. Within a biological safety cabinet, dispense 0.5 to 1.0 mL of the above mixture into sterile plastic cryovials or glass ampoules. Store the filled glass ampoules on ice prior to sealing. Glass ampoules can be sealed using a gas-oxygen torch, pulling the neck of the ampoules as it is rotated in the flame. Following sealing, disinfect glass ampoules by spraying with disinfectant.
4. Place the vials into a pre-cooled (4°C), controlled-rate freeze chamber and place the chamber in a mechanical freezer at -70°C (or colder) for at least 24 hours. Alternately, use a pre-cooled (4°C) programmable freezer unit set to cool the vials at -1°C per minute until a temperature below -40°C is achieved and then set the temperature to abruptly drop to -120°C .
5. Quickly transfer the vials to a liquid nitrogen or -120°C freezer. Frozen material will warm up above -50°C .
6. Record the location and details of the freeze.
7. After 24 hours at -120°C , remove one vial, appropriately restore the viral strain, and determine the viability and sterility.

Recovery of Cryopreserved Viruses

1. In advance, grow the recommended production host in a prepared culture vessel that contains growth medium equilibrated for both temperature and pH.
2. Remove the vial of frozen virus from the liquid nitrogen freezer and thaw by gentle agitation in a 37°C water bath.
3. Thaw the strain rapidly until all ice crystals have melted (approximately 2 minutes).
4. Remove the vial from the water bath and decontaminate it by dipping in or spraying with 70% ethanol. Follow strict aseptic conditions in a biological safety cabinet for all further manipulations.
5. Unscrew the top of the vial and inoculate the propagation host with the recommended infection conditions as described on the supplied product sheet.
6. Examine the cultures after an appropriate length of time.

Lyophilization

Overview

Freeze-drying is a process where water and other solvents are removed from a frozen product via sublimation¹⁵. Sublimation occurs when a frozen liquid goes directly to a gaseous state without entering a liquid phase. The freeze-drying process results in a stable, readily rehydrated product. This process consists of three steps: pre-freezing the product to form a frozen structure, primary drying to remove most water, and secondary drying to remove bound water.

During the initial freezing process, ice crystals begin to form and the concentration of solutes in the suspension increases. The method used during freezing can greatly affect the ability to freeze-dry the material. Slow cooling rates are recommended as this will result in the formation of vertical ice crystal structures and allow for more efficient water sublimation from the frozen product.

Freeze-dried products are hygroscopic and must be protected from moisture during storage. Additionally, these products are sensitive to other factors including oxygen and temperature, which can significantly decrease the shelf life. It is important to store freeze-dried material in a manner that protects the product from exposure to moisture and oxygen and at refrigerated temperatures (4°C).

Generally, the lyophilization of viruses is not currently used by ATCC. This is because the methods for lyophilization vary depending on the type of virus, and some viruses cannot be successfully preserved by freeze-drying due to loss of viability. Strongly cell-associated viruses, including certain members of the herpes virus family, such as varicella-zoster, lose viability outside the host. Therefore, these viruses cannot be preserved by this method. Though ATCC does not currently freeze-dry any virus preparations, it was done fairly extensively in the past. The methods of lyophilization that were previously used by ATCC are described below. For additional information, contact ATCC technical services.

Equipment

A. Lyophilization Vials

For the storage of lyophilized viruses, ATCC uses sterile funnel-tipped glass ampoules (Wheaton) and glass serum vials. Generally, during the lyophilization process, material is freeze-dried in a glass ampoule, disinfected, and sealed.

B. Lyophilization Apparatuses

For the lyophilization of viruses, ATCC previously employed a commercial freeze-dryer. In this freeze-drying procedure, samples are mixed with a suitable preservative, dispensed into the appropriate ampoule, and allowed to slowly freeze into a solid mass. The preservative used for lyophilization can vary between viral agents; several examples are listed below in Table 4. Once

frozen, samples are lyophilized within a freeze-drying system (Virtis Genesis®, Millrock® Max 85, and LD 85).

During the primary drying phase, water is removed from the frozen product via sublimation. This is accomplished through the use of a vacuum pump, which allows water molecules to migrate from the frozen product and condense on a moisture trap called a condenser. For this to be possible the temperature of the condenser must be colder than the product temperature; the difference in these temperatures will affect the rate of sublimation. When primary drying is complete, all residual moisture is removed by directly heating the product. During this secondary drying phase, water must be desorbed to a residual moisture content of 1% or less. This process requires a low pressure, low condenser temperature system. Once dried, the ampoules are properly sealed and stored at refrigerated temperatures (4°C).

Table 4: Examples of Freeze-Dried Preparations

ATCC® No.	Product Name	Preparation
VR-343™	Japanese encephalitis virus	Infected primary hamster kidney cells + 50% calf serum
VR-90™	Colorado tick fever virus	Infected mouse brain (10% suspension in normal saline) diluted 1:1 in rabbit serum
VR-897™	Influenza A virus	Infected allantoic fluid + 10% sucrose

Storage and Viability of Lyophilized Strains

To maximize the recovery of viable cells, viral cultures must be in optimum condition before the lyophilization process¹⁶. Viruses should be propagated under the recommended conditions for infection as indicated on the product sheet.

Because lyophilized products are hygroscopic, they must be stored under moisture-free conditions. Additionally, other factors such as oxygen content and temperature can affect the shelf-life of freeze-dried strains. Oxygen can chemically react with the product, negatively affecting culture viability. This reactivity is directly proportional to storage temperature. Therefore, lyophilized products should be stored long-term in liquid nitrogen.

Lyophilization Procedure

1. Grow the virus according to usual procedures
2. For freeze-drying viral suspensions, glucose, skim milk, or Sucrose-Phosphate-Glutamate-Albumin (SPGA) should be added before dispensing. The lyophilization of some viruses may require specific preservation preparations; examples are listed in Table 4.
3. In a biological safety cabinet, dispense the suspension into either sterile funnel-tipped ampoules or serum vials. Plug the ampoules loosely with slotted silicon rubber stoppers, and place the ampoules in a freeze-dryer tray. Set an acrylic plate on top of the stoppers.
4. Freeze-dry the material in a commercial freeze-dryer. Hold the material at -30°C for 18-48 hours, depending on the additive. Then raise the shelf temperature to 10°C per hour until the product temperature is 25°C.
5. When the cycles are complete, backfill the system with sterile nitrogen and press the caps into place. Disinfect the outside of the ampoules and return them to the biological safety cabinet.



6. Seal the vials. Funnel-tipped ampoules will need to be sealed by an oxygen-gas torch.

Recovery of Lyophilized Cells

1. To rehydrate freeze-dried strains, add sterile double-distilled water.
2. Mix well, dilute with culture medium, and add the virus to the propagation host cell culture.
3. Incubate strains under the recommended temperature and atmospheric conditions. Optimal conditions are listed for each strain in the ATCC Catalogue of Animal Viruses & Antisera.

Preservation of Specific Strains

All viral strains can be cryopreserved and maintained in liquid nitrogen vapor, whereas only some strains can be lyophilized. In preparation for cryopreservation or lyophilization, viral strains should be grown under optimal conditions. This can include growth in chicken eggs or within tissue culture. Below, we provide information on the preservation of common viral strains.

Adenoviruses

The less labile virus suspensions, such as human adenovirus, are harvested in their culture media then dispensed into ampoules for freezing.

Herpesviruses

Certain members of the herpes family, such as cytomegalovirus or varicella-zoster, lose viability outside the host. Therefore, keep infected cells intact prior to preservation.

Viruses grown in Chicken Embryos

Viruses harvested from chicken eggs as allantoic fluid or yolk sac preparations can be frozen or lyophilized. The high-protein content of the egg serves as a cryoprotectant, and other additives may not be necessary.

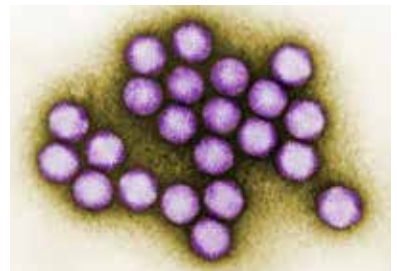


Image of Adenovirus courtesy of Dr. G. William Gary, Jr., CDC

Viruses grown *in vivo*

Viruses grown *in vivo* and harvested in organ suspensions are preserved by freezing. Add sterile 50% glycerol or 10-50% serum as a cryoprotectant.

Special Hazards

Care must be taken during the cryopreservation or lyophilization of animal viruses. Problems such as contamination, breakage of glass ampoules during handling and storage, dispersal of freeze-dried virus when opening glass ampoules, and the handling of liquid nitrogen must all be considered. To prevent contamination and the dispersal of viruses, aseptic technique must be followed. This can include the decontamination of all equipment and vials as well as performing all preparations in a biological safety cabinet. Additionally, protective clothing should be worn during preparation to prevent contamination as well as to guard against harm due to contact with liquid nitrogen.

Biosafety and Disposal

Biosafety

The need for precautions when experimenting with viral cultures depends upon the source and nature of the biological material, the experimental procedure, and the laboratory/containment conditions. Since every situation is different, the risks need to be identified for each individual strain and the appropriate precautions need to be taken before any work begins.

More information on risk assessment and precautions can be found in the Center for Disease Control (CDC) publication *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁷. The text of this publication is available in its entirety online at www.cdc.gov.

A biosafety level (BSL) is assigned to each viral strain for the purposes of packaging for safe shipment. ATCC follows federal biosafety guidelines and takes several factors into consideration when assessing a potential hazard, and in some cases the ATCC assigned biosafety level is more restrictive. Generally, ATCC only ships and stores viruses with a biosafety level assignment of 1, 2, or 3.

Biosafety Level 1

- Work involving well-characterized viral strains not known to consistently cause disease in immunocompetent adult humans.
- Work can be conducted on the bench top using aseptic technique, no special containment equipment or facility is required.

Biosafety Level 2

- Work involving viral strains that pose a moderate hazard to health adult humans.
- Work should be conducted in designated biological safety cabinets within laboratories with restricted access.

Biosafety Level 3

- Work involving indigenous or exotic agents that may cause serious or potentially lethal disease via inhalation.
- Work should be conducted in biological safety cabinets localized inside a specialized BSL-3 containment facility within laboratories with restricted access.

As the recipient of an ATCC virus, take into account not only the nature of the material but also the manipulations employed during its handling when assessing the potential laboratory risk. Keep in mind that there will be situations where the intended use of an agent may require more stringent precautions than associated with the assigned biosafety level¹⁷.

Disposal of Infectious Materials

All viral cultures, stocks, and potentially infectious materials need to be properly decontaminated prior to disposal. The written method for proper decontamination should be available in the laboratory and BSL facility. Several methods of sterilization include use of an autoclave, chemical disinfection, incineration, or any other validated decontamination method. More information on the disposal of viral cultures can be found in the Center for Disease Control (CDC) publication *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁷.

Viral Authentication and Viability Testing

When preparing a viral strain for distribution, ATCC performs numerous quality control (QC) assays to guarantee that the product is of the highest standard before it reaches the consumer. All viral strains grown in-house undergo viability testing as well as genotypic examinations to ensure that the strain identification is accurate and the viral agent is sustainable. Described below are several tests used by ATCC for the authentication and viability testing of animal viruses.

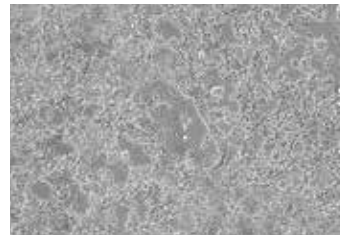
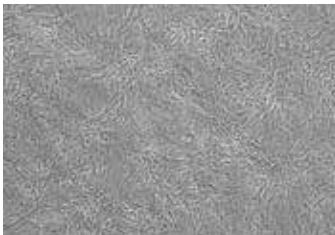
Viability Testing

Cytopathic effects (CPE)

For tissue-culture adapted viruses, viability is primarily monitored by observing host cell appearance. During the synthesis of viral components, the host cell undergoes morphological and biochemical changes. These deviations often result in degenerative changes known as **cytopathic effect**. The degree of visible cell damage varies between viral species and host cell lines. Some viruses cause little to no CPE in host cells, while others can destroy the host cell population. Characteristic CPE is best observed by analyzing cultures daily¹⁸. (See NOTE 6)

NOTE 6:

During early viral infection, cells may become rounded or appear more refractive. More severe CPE include focal degeneration, vacuolization, cellular fusion, or host cell death.



Propagation of Human herpes virus 1 (ATCC® No. VR-260™) in Vero cells (ATCC® No. CCL-81™). The left panel depicts uninfected CCL-81™ cells. The right panel depicts infected CCL-81™ cells exhibiting CPE.

Hemagglutination

Many viruses can attach to molecules present on the surface of red blood cells. At certain concentrations, a viral suspension may cause red blood cells to clump together. This natural phenomenon, known as hemagglutination, prevents red blood cells from settling out of suspension and has been adapted for use in viability testing and CEID viral titering. In a hemagglutination assay, chicken red blood cell suspensions are incubated with a serially diluted virus and monitored for the formation of a red blood cell lattice. The endpoint is taken to be the highest dilution of the virus suspension that produces a positive result.

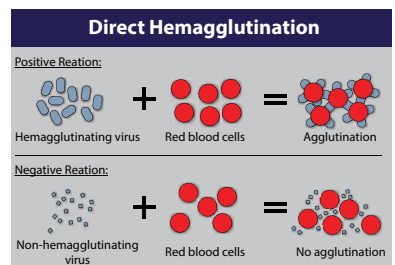


Image of Hemagglutination assay courtesy of Dr. F.T. Forrester., CDC

Hemadsorption Assay

The phenomenon of hemadsorption is dependent on the attachment of red blood cells to the surface of cell monolayers infected with enveloped, hemagglutinin-producing viruses. This natural process can be adapted as a general procedure to determine viral potency. In a hemadsorption assay, a red blood cell suspension is incubated with an infected cell culture. If the cell monolayer is infected with a hemagglutinin-producing virus, hemagglutinin is inserted into the cell plasma membrane during viral reproduction in preparation for viral maturation. It is at these modified areas of the cell surface that red blood cells will specifically bind. Thus, hemadsorption is indicative of the presence of viruses that produce hemagglutinin, such as influenza, measles, mumps, and parainfluenza.

Viral Infectivity

Viral infectivity is often measured by calculating titer. Depending on the required host for viral propagation, infectivity can be analyzed using a plaque assay or by determining the infectious dose in tissue culture or embryonated chicken eggs. The basis of these assays is to measure the ability of an infectious viral suspension to produce a pathological change in the host environment. For additional information on plaque assays or calculating infectious dose, refer to the chapter entitled “Viral Replication and Propagation”.

Viral Authentication

Sequencing

The ATCC Virology collection utilizes sequencing to authenticate our holdings as they are accessioned or come up for replenishment. ATCC sequences approximately ≥ 500 bp of the viral genome that is characteristic of the species or virus type.

Enzyme Linked Immunosorbant Assay

All viruses have at least one unique surface antigen. Through an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), these antigens can be used as a biological marker to authenticate a viral species. There are two forms of this assay, the direct and indirect ELISA.

Both assays employ enzyme-conjugated monoclonal detection antibodies that tightly bind a specific viral antigen. With a direct ELISA, one is testing for the presence of the virus, while an indirect ELISA assay detects specific viral antibody rather than the virus itself. The presence of a specific virus is analyzed by assessing the conjugated enzyme activity via incubation with a substrate that is converted into a measurable colored product. When using an ELISA for authentication purposes, a colorimetric change indicates the viral sample was correctly identified.



Viral Applications

Cell Transformation

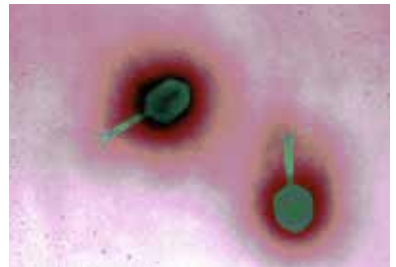
Cancerous cells emerge due to discrete changes in the cellular genome. These genomic deviations can arise due to viral **transformation**. During the infection of **non-permissive** cells, viral genetic material can become covalently integrated into the host genome. If viral integration induces the aberrant expression of a **proto-oncogene**, cell growth can become unrestricted, resulting in an immortal cell state.

This natural process has been adapted by cell biologists for use in the immortalization of mammalian cells in tissue culture. Immortalized cell lines offer the possibility of an inexhaustible supply of cells, allowing for more consistent and reproducible research. Viral genes such as the simian virus 40 (SV40) T antigen have been used as a simple, reliable agent for the immortalization of a variety of cell types^{19,20}. SV40 is believed to induce immortalization by suppressing the transcription of p53, a tumor suppressor protein responsible for initiating apoptosis following cell damage.

In addition to their use in cell immortalization, viral strains can be used to introduce nucleic acids into cells. This process, termed **transduction**, allows scientists to analyze the function of specific genes, to examine the effects of gene silencing, or to introduce therapeutic genes.

Phage Therapy

Bacteriophages are viruses that infect bacterial cells, often resulting in the lysis and subsequent death of the bacterial host. Since the early 20th century, European scientists have taken advantage of this natural process to treat bacterial infections in a process known as phage therapy. Because the host range of a bacteriophage is very narrow, often specific to one species, they are considered more effective than antibiotic treatment and result in less harm to the human microflora²². Though phage therapy has many benefits, it was abandoned by many countries due to the antigenic properties and unpredictable behavior of bacteriophages in addition to the wide-spread production and use of antibiotics. However, with the recent emergence of antibiotic-resistant bacteria, scientists are now forced to re-evaluate the beneficial properties of the application of phage therapy²³.



Nanotechnology

Cancer treatments have commonly employed surgery, radiation, chemotherapy, and hormone therapy²⁴. Though these treatments have helped millions of patients go into remission, they come at a cost. Most cancer treatments attack both healthy and cancerous cells, often leaving patients nauseous, fatigued, and immunocompromised. To combat these negative side effects, viral nanoparticles are being engineered and analyzed as a potential form of drug delivery.

Viral nanoparticles are viruses whose genomic material has been removed and replaced with therapeutic drugs. Because viruses have naturally evolved the ability to cross the host cell membrane, they are an ideal candidate for drug packaging and targeted delivery. To minimize toxic side effects, infection, and induced

immune response, human viruses are not used in the production of viral nanoparticles. Rather, these drug delivery systems are engineered from plant, insect, and animal viruses²⁵. Plant viruses, such as the Cowpea mosaic virus, are ideal candidates for nanotechnology as they are easy to produce in large quantities, can self-assemble around a nanoparticle, and hold a substantial volume of cancer drugs²⁶.

One of the major benefits to using viral nanoparticles for drug delivery is that targeting molecules can be easily attached to the viral surface, allowing for the directed binding to cancer cells. This specific binding prevents the harm or death of surrounding healthy cells, thus reducing possible side effects. Though viral nanoparticles have the potential to be a beneficial treatment, there are several complications associated with their use as a drug delivery system including immune rejection and potential toxicity. Regardless, viral nanoparticles have the capability to revolutionize the treatment of cancer, creating a safe and specific form of drug delivery.

Recombinant Vectored Vaccines

Vaccines are the most effective prophylactic tool for the prevention of disease. Viral-based vaccines are traditionally employed as live attenuated viruses or as chemically inactivated viruses. Though these types of preparations have been shown to induce protective immunity in animal models, incomplete viral attenuation or inactivation poses a serious risk to those who are vaccinated^{27, 28}. Recombinant vectored vaccines, however, offer a live-vaccine approach that does not employ the complete pathogen. Instead, genetic material from the microbial target strain is inserted into the genome of harmless viral strains, allowing for the safe expression of microbial antigens.

Newcastle disease virus (NDV), a negative-sense RNA avian virus, is a common template used for the development of recombinant vectored vaccines. Not only does NDV grow to high titers in many cell lines and eggs, it can elicit a strong immune response *in vivo*, is harmless to humans, and is commercially available. Additionally, NDV replicates in the cytoplasm of infected cells, thus eliminating the problem of genetic integration²⁹. To create a viral vaccine vector from NDV, genes encoding foreign target proteins are inserted into the NDV genome through recombination. Upon vaccination with the live virus, the foreign target protein is expressed within the host cell cytoplasm where it is then available for processing by the cellular antigen-processing machinery for immune presentation. As a result, cellular immunity is activated and neutralizing antibodies are generated^{30,32}.

Glossary

Ambisense. A term applied to single-stranded RNA viral genomes. Part of the nucleotide sequence is positive-sense and part is negative-sense.

Complex morphology. A virus that possesses a capsid that is neither truly helical nor icosahedral. This morphology may have additional structures such as a protein tail or a complex outer wall.

Cytopathic effect (CPE). CPE refers to the degenerative changes in association with viral infection.

Effect. Degenerative changes in the product host as a result of viral infection.

Enveloped morphology. Viral envelopes are commonly derived from portions of the host cell membranes that have incorporated viral glycoproteins. Envelopes surround the viral capsid and assist in viral entry of host cells.

Helical morphology. Viral morphology composed of a single type of capsomer stacked around a central axis to form a helical structure.

Hemagglutination. This term refers to the agglutination, or clumping, of red blood cells.

Icosahedral morphology. Viral structures built from repeated identical protein subunits to form a nearly spherical structure with rotational symmetry.

Multiplicity of infection (MOI). The ratio of agents (e.g. viruses, bacteriophages, bacteria) to infection targets (e.g. propagation host)

Negative sense. Negative-sense RNA (3' to 5') forms the complementary strand and must be converted to positive-sense by an RNA polymerase prior to translation.

Non-permissive. Being or relating to a cell or environmental condition that does not support the replication of a virus or bacteriophage.

Positive sense. Positive-sense RNA (5' to 3') signifies that a particular sequence can be directly translated into protein.

Production host. The host strain used for the propagation of viruses.

Prolate morphology. Viral morphology composed of a cylinder with a cap at either end forming an elongated icosahedron structure along a fivefold axis. This is a common arrangement of bacteriophage heads.

Proto-oncogene. This term defines a normal gene that can become an oncogene due to mutations or increased expression. These genes commonly code for proteins involved in the regulation of cell growth or differentiation.

Sense. Sense is a concept used to compare the polarity of nucleic acids.

Transfection. This term refers to the process of deliberately introducing nucleic acids into cells.

Transformation. This term refers to the cellular alteration resulting from the uptake, integration, and expression of exogenous genetic material taken up from the environment.

Appendix

Propagation hosts and recommended basal media

ATCC® No.	Product Description	ATCC® No.	Media
CCL-81.5™	Vero-SF-ACF	ACS-4001	VeroPlus Serum-Free Medium
CCL-22™	MDBK (NBL-1)	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-34™	MDCK (NBL-2)	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CRL-1590™	SL-29	30-2002	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CCL-10™	BHK-21	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-61™	CHO-K1	30-2004	F-12K Medium
CRL-1573™	293 (HEK-293)	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-2™	HeLa	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-23™	Hep-2	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-171™	MRC-5	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-75™	WI-38	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CRL-1721™	Sf9	30-2001	RPMI-1640 Medium
CRL-1651™	COS-7	30-2002	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CCL-81™	Vero	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CRL-1586™	VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6]	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CRL-1587™	VERO 76	30-2002	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CCL-7.1™	LLC-MK2 Derivative	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CL-160™	DBS-FRHL-2	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium
CCL-33™	PK(15)	30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium

References

1. Rovozzo, G. & Burke, C. A Manual of Basic Virological Techniques (Prentice-Hall, 1973).
2. Leland, D. & Ginocchio, C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin Microbiol Rev* **20**, 49-78 (2007).
3. Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* **343**, 481-92 (2000).
4. Gotoh, K. et al. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* **6**, e25490.
5. Mahy, B. & Kangro, H. Virology Methods manual (Academic Press, 1996).
6. Reed, L. & Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**, 493-497 (1938).
7. McLimans, W. (eds. Rothblat, G. & Cristofalo, V.) (Academic Press, New York, 1972).
8. Shipman, C., Jr. Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Proc Soc Exp Biol Med* **130**, 305-10 (1969).
9. Giandomenico, A.R., Cerniglia, G.E., Biaglow, J.E., Stevens, C.W. & Koch, C.J. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **23**, 426-34 (1997).
10. Jacoby, W. & Pasten, I. (Academic Press, New York, 1979).
11. Mazur, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* **14**, 251-72 (1977).
12. Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* **168**, 939-49 (1970).
13. Fahy, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* **23**, 1-13 (1986).
14. Meryman, H.T. Cryoprotective agents. *Cryobiology* **8**, 173-83 (1971).
15. Rowe, T.W. Optimization in freeze-drying. *Dev Biol Stand* **36**, 79-97 (1976).
16. Heckly, R. Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Dev Ind Microbiol* **26**, 379-395 (1985).
17. United States Department of Health and Human Services, C.f.D.C., and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (U.S. Government Printing Office, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Washington DC, 2009).
18. Enders, J.F. Cytopathology of virus infections: particular reference to tissue culture studies. *Annu Rev Microbiol* **8**, 473-502 (1954).
19. Jha, K.K., Banga, S., Palejwala, V. & Ozer, H.L. SV40-Mediated immortalization. *Exp Cell Res* **245**, 1-7 (1998).
20. Kirchhoff, C. et al. Immortalization by large T-antigen of the adult epididymal duct epithelium. *Mol Cell Endocrinol* **216**, 83-94 (2004).
21. Mancheno-Corvo, P. & Martin-Duque, P. Viral gene therapy. *Clin Transl Oncol* **8**, 858-67 (2006).
22. Miedzybrodzki, R. et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res* **83**, 73-121.
23. Kropinski, A.M. Phage Therapy - Everything Old is New Again. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**, 297-306 (2006).
24. Institute, N.C. (2011).
25. Singh, P., Destito, G., Schneemann, A. & Manchester, M. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J Nanobiotechnology* **4**, 2 (2006).
26. Franzen, S. & Lommel, S.A. Targeting cancer with 'smart bombs': equipping plant virus nanoparticles for a 'seek and destroy' mission. *Nanomedicine (Lond)* **4**, 575-88 (2009).
27. Brown, F. Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses. *Dev Biol Stand* **81**, 103-7 (1993).

References

28. Nathanson, N. & Langmuir, A.D. The Cutter Incident. Poliomyelitis Following Formaldehyde- Inactivated Poliovirus Vaccination in the United States during the Spring of 1955. Ii. Relationship of Poliomyelitis to Cutter Vaccine. *Am J Hyg* **78**, 29-60 (1963).
29. Huang, Z., Elankumaran, S., Panda, A. & Samal, S.K. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poult Sci* **82**, 899-906 (2003).
30. Huang, J.L. et al. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol* **65**, 553-60 (2001).
31. Krishnamurthy, S., Huang, Z. & Samal, S.K. Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology* **278**, 168-82 (2000).
32. Nakaya, T. et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol* **75**, 11868-73 (2001).

ATCC Reagents for Virus Expansion

ATCC Cell Lines for virus expansion

ATCC® No.	Product Name	Organism	Tissue Source
CCL-22™	MDBK	Bovine	Kidney
CCL-34™	MDCK (NBL-2)	Canine	Kidney
CRL-1590™	SL-29	Chicken	Embryo
CCL-10™	BHK-21	Hamster	Kidney
CCL-61™	CHO-K1	Hamster	Ovary
CRL-1573™	293 (HEK-293)	Human	Kidney
CRL-1573.3™	HEK-293.2sus	Human	Kidney
CCL-2™	HeLa	Human	Cervix
CCL-23™	Hep-2	Human	Cervix
CCL-171™	MRC-5	Human	Lung
CCL-75™	WI-38	Human	Lung
CRL-1721™	Sf9	Insect	Ovary
CRL-1651™	COS-7	Monkey	Kidney
CCL-81.5™	Vero-SF-ACF	Monkey	Kidney
CCL-81™	Vero	Monkey	Kidney
CRL-1586™	VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6]	Monkey	Kidney
CRL-1587™	VERO 76	Monkey	Kidney
CCL-7.1™	LLC-MK2 Derivative	Monkey	Kidney
CL-160™	DBS-FRHL-2	Monkey	Lung
CCL-33™	PK(15)	Pig	Kidney

ATCC Media product list

ATCC® No.	Product Name	Volume
30-2002	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 mL
ACS-4001	VeroPlus SFM (serum-free media)	500 mL
ACS-4002	HEKPlus SFM (serum-free medium)	500 mL
30-2006	DMEM:F12 Medium (1:1 Ratio)	500 mL
30-2003	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	500 mL
30-2004	F12K Medium	500 mL
30-2005	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	500 mL
30-2008	Leibovitz's L-15 Medium	500 mL
30-2007	McCoy's 5A Medium, Modified	500 mL
30-2001	RPML-1640 Medium	500 mL

Animal Sera product list

ATCC® No.	Product Name	Volume
30-2020	Fetal Bovine Serum	500 mL
30-2030	Calf Bovine Serum	500 mL
30-2040	Horse Serum	500 mL

Cell Culture Supplements

ATCC® No.	Product Name
-----------	--------------

AMINO ACID SOLUTIONS

30-2214	L-Glutamine Solution, 200 mM
30-2116	MEM Non-Essential Amino Acid Solution, 100x

SUBCULTURE REAGENTS

30-2101	Trypsin EDTA Solution
30-2103	Non-Enzymatic Cell Dissociation Solution
30-2104	Soybean Trypsin Inhibitor

BUFFERS, STAINS & WATER

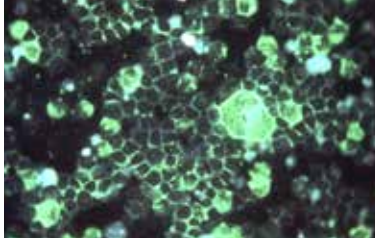
30-2200	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)
30-2404	Erythrosin B Stain Solution, 40 mL
30-2205	Water, Cell Culture Grade

CRYOPRESERVATION REAGENTS AND TOOLS

4-X	Dimethylsulfoxide (DMSO)
30-2600	Serum-Free Cell Freezing Medium
ACS-6000	CoolCell LX Alcohol-free Freezing Container

Cell Proliferation Assays and Mycoplasma Detection

ATCC® No.	Product Name
30-1010K	ATCC MTT Cell Proliferation Assay
30-1011K	XTT Cell Proliferation Assay Kit
30-1012K	Universal Mycoplasma Detection Kit



10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110

Tel 800.638.6597
703.365.2700
Fax 703.365.2750
Email tech@atcc.org
Web www.atcc.org

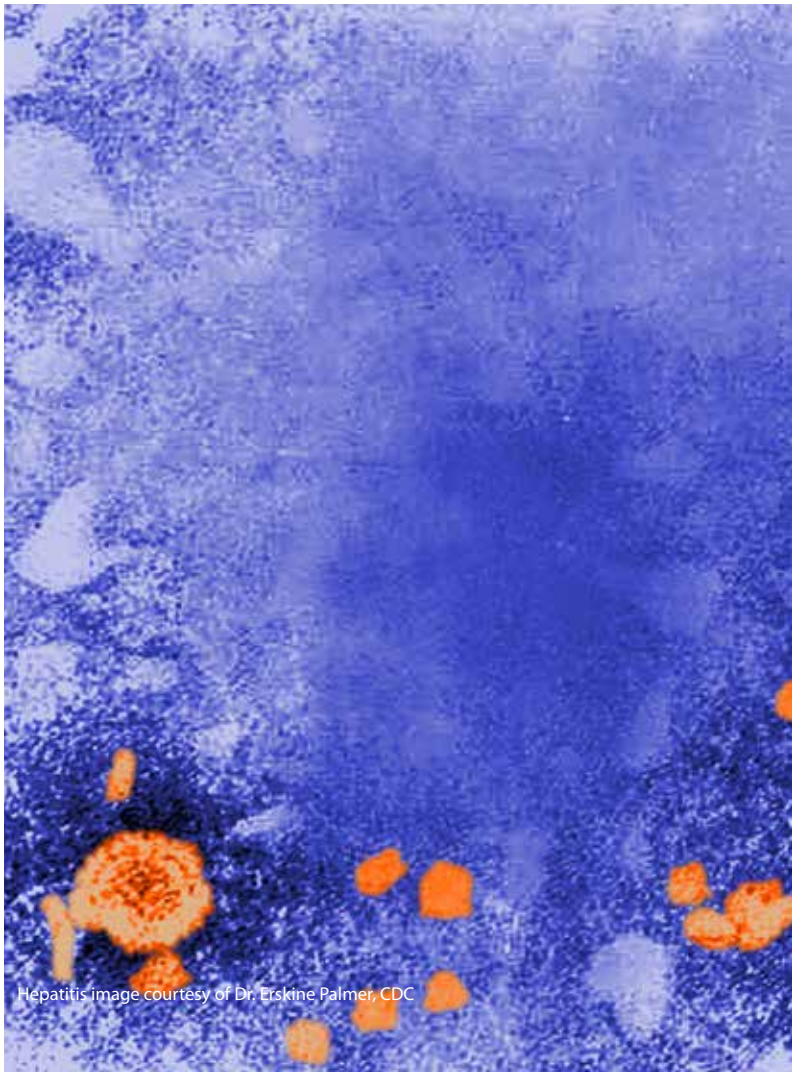
Or contact your local distributor at
www.atcc.org/distributor

V-0716-04

© 2016 American Type Culture Collection.
The ATCC trademark and trade name, and any
other trademarks listed in this publication are
trademarks owned by the American Type Culture
Collection unless indicated otherwise.

CoolCell® (BioCision, LLC); VirTis® (SP Industries,
Inc.); and Millrock Technology® (Millrock
Technology, Inc.)

Top front image of Respiratory Syncytial Virus
courtesy of Dr. Craig Lyerla, CDC.



Hepatitis image courtesy of Dr. Erskine Palmer, CDC

RNeasy[®] Plus Mini Kit

The RNeasy Plus Mini Kit (cat. nos. 74134 and 74136) can be stored at room temperature (15–25°C) for at least 9 months if not otherwise stated on label.

Further information

- *RNeasy Plus Mini Handbook*: www.qiagen.com/HB-0405
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- If purifying RNA from cell lines rich in RNases, or tissue, add either 10 µl β-mercaptoethanol (β-ME), or 20 µl 2 M dithiothreitol (DTT), to 1 ml Buffer RLT Plus before use. Buffer RLT Plus containing DTT or β-ME can be stored at room temperature for up to 1 month.
- Add 4 volumes of ethanol (96–100%) to Buffer RPE for a working solution.
- Foaming can be reduced by adding Reagent DX (cat. no. 19088) at a final concentration of 0.5% (v/v) before disruption and homogenization.*

* This option not included in handbook; handbook to be updated.

1. **Cells:** Harvest a maximum of 1×10^7 cells, either as a cell pellet, or lysed directly in the vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 1). Vortex for 30 s, or homogenize.

Tissues: Disrupt the tissue (≤ 30 mg) and homogenize the lysate in the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 1). Centrifuge the lysate for 3 min at maximum speed.

Carefully remove the supernatant by pipetting and use it in step 2.

2. Transfer the homogenized lysate to a gDNA Eliminator spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied).

3. Centrifuge for 30 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the column, and save the flow-through. Add 1 volume (usually 350 μ l or 600 μ l) of 70% ethanol to the flow-through, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 4.
4. Transfer up to 700 μ l of the sample, including any precipitate, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
5. Add 700 μ l Buffer RW1 to the RNeasy Mini spin column (in a 2 ml collection tube). Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
6. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
7. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm).

Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge at full speed for 1 min to further dry the membrane.

8. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 μ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid, and centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ to elute the RNA.

Optional: Repeat elution with another volume of water or with RNA eluate.

Table 1. Volumes of Buffer RLT Plus for sample disruption and homogenization

Sample	Amount	Dish	Buffer RLT Plus	Disruption and homogenization
Pelleted cells	$<5 \times 10^6$	<6 cm	350 μ l	Add Buffer RLT Plus, vortex ($\leq 1 \times 10^6$ cells); or use QIAshredder, TissueRuptor [®] , or needle and syringe
	$\leq 1 \times 10^7$	6–10 cm	600 μ l	
Animal tissues	<20 mg	–	350 μ l	TissueLyser LT; TissueLyser II; TissueRuptor, or mortar and pestle followed by QIAshredder or needle and syringe
	20–30 mg	–	600 μ l	

* Use 600 μ l Buffer RLT Plus for tissues stabilized in RNAlater[®] Reagent, or for difficult-to-lyse tissues.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. Trademarks: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], RNeasy[®], TissueRuptor[®] (QIAGEN Group). "RNAlater[™]" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents. 1101300 03/2016 HB-0574-002 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

Qubit[®] RNA HS Assay Kits Online Specials

For use with the Qubit[®] Fluorometer (all models)

Catalog nos. Q32852, Q32855

Table 1. Contents and storage

Material	Amount		Concentration	Storage	Stability
	Q32852 (100 assays)	Q32855 (500 assays)			
Qubit [®] RNA HS Reagent (Component A)	250 μ L	1.25 mL	200X concentrate in DMSO	<ul style="list-style-type: none"> • Room temperature • Desiccate • Protect from light 	When stored as directed, kits are stable for 6 months.
Qubit [®] RNA HS Buffer (Component B)	50 mL	250 mL	Not applicable	Room temperature	
Qubit [®] RNA HS Standard #1 (Component C)	1 mL	5 mL	0 ng/ μ L in TE buffer	$\leq 4^{\circ}\text{C}$	
Qubit [®] RNA HS Standard #2 (Component D)	4 \times 250 μ L	10 \times 500 μ L	10 ng/ μ L in TE buffer		

Introduction

The Qubit[®] RNA HS (High Sensitivity) Assay Kits make RNA quantitation easy and accurate. The kits include concentrated assay reagent, dilution buffer, and prediluted RNA standards. Simply dilute the reagent using the buffer provided, add your sample (any volume from 1–20 μ L is acceptable), then read the concentration using the Qubit[®] Fluorometer. The assay is highly selective for RNA over double-stranded DNA (dsDNA) (Figure 1, page 7) and is accurate for initial sample concentrations from 250 pg/ μ L to 100 ng/ μ L. The assay is performed at room temperature, and the signal is stable for 3 hours. Common contaminants such as salts, free nucleotides, solvents, detergents, or protein are well tolerated in the assay (Table 2, page 8). The Qubit[®] RNA HS assay is intended for total RNA, rRNA, or large mRNA. For small RNA (~20 nt or bp), we recommend the Qubit[®] microRNA Assay Kit (Cat. nos. Q32880, Q32881). In addition to the Qubit[®] RNA HS Assay Kits described here, we also offer other kits for assaying DNA and protein (Table 3, page 9).

To determine the purity of your sample, use the Qubit[®] RNA HS Assay Kit together with the Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit. These measurements give you a much better indication of sample purity than that produced by measuring the A_{260}/A_{280} ratio. To measure protein contamination in nucleic acid samples, simply run 1–20 μ L of the sample in the Qubit[®] Protein Assay.

Note: This Qubit[®] assay kit can be used with any Qubit[®] Fluorometer.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Before You Begin

Materials required but not provided

- Plastic container (disposable) for mixing the Qubit[®] working solution (step 1.3, page 3)
- Qubit[®] assay tubes (500 tubes, Life Technologies, Cat. no. Q32856) or Axygen[®] PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830)

Storing the Qubit[®] assay kits

The Qubit[®] RNA HS Reagent and Buffer are designed for room temperature storage. The Qubit[®] RNA HS Reagent is supplied in DMSO, which freezes at temperatures lower than room temperature. Store the RNA standards at 4°C.

Critical assay parameters

Assay temperature

The Qubit[®] RNA HS Assay delivers optimal performance when all solutions are at room temperature (22–28°C). The Qubit[®] assays are designed to be performed at room temperature, as temperature fluctuations can influence the accuracy of the assay (Figure 2, page 7). To minimize temperature fluctuations, store the Qubit[®] RNA HS Reagent and Buffer at room temperature and insert all assay tubes into the Qubit[®] Fluorometer only for as much time as it takes for the instrument to measure the fluorescence; the Qubit[®] Fluorometer can raise the temperature of the assay solution significantly, even over a period of a few minutes. Do not hold the assay tubes in your hand before reading because this warms the solution and results in a low reading.

Incubation time

To allow the Qubit[®] assay to reach optimal fluorescence, incubate the tubes for the DNA and RNA assays for 2 minutes after mixing the sample or standard with the working solution. After this incubation period, the fluorescence signal is stable for 3 hours at room temperature.

Photobleaching of the Qubit[®] reagents

The Qubit[®] reagents exhibit high photostability in the Qubit[®] Fluorometer, showing <0.3% drop in fluorescence after 9 readings and <2.5% drop in fluorescence after 40 readings. However, if the assay tube remains in the Qubit[®] Fluorometer for multiple readings, a temporary reduction in fluorescence will be observed as the solution increases in temperature (Figure 2, page 7). Note that the temperature inside the Qubit[®] Fluorometer may be as much as 3°C above room temperature after 1 hour. For this reason, if you want to perform multiple readings of a single tube, remove the tube from the instrument and let it equilibrate to room temperature for 30 seconds before taking another reading.

Calibrating the Qubit[®] Fluorometer

For each assay, you have the choice to run a new calibration or use the values from the previous calibration. When you first use the instrument, perform a new calibration each time. As you become familiar with the assays, the instrument, your pipetting accuracy, and significant temperature fluctuations within your laboratory, you can decide how comfortable you are using the calibration data stored from the last time the instrument was calibrated. Additionally, remember that the fluorescence signal in the tubes containing standards and samples is stable for no longer than 3 hours. See Figure 3 (page 8) for an example of the calibration curve used to generate the quantification results.

RNase-free handling	The calibration standards included in the Qubit® RNA HS Assay Kit are high-quality rRNA standards. The integrity and concentration of these standards is critical to the optimal performance of the Qubit® RNA HS Assay. As such, we highly recommend treating the rRNA standards as you would any other precious RNA. Use appropriate RNase-free handling techniques, including RNase-free gloves, pipette tips, and tubes. Keep the tube lids closed whenever possible; do not touch the pipette to the inside wall of the tube when withdrawing a sample; and return the rRNA standard to the refrigerator as soon as possible after use.
Handling and disposal	No data are currently available that address the mutagenicity or toxicity of the Qubit® RNA HS Reagent (Component A). This reagent is known to bind nucleic acid and is provided as a solution in DMSO. Treat the Qubit® RNA HS Reagent with the same safety precautions as all other potential mutagens and dispose of the dye in accordance with local regulations.

Preparing samples and standards

This protocol assumes that you are preparing standards for calibrating the Qubit® Fluorometer. If you plan to use the last calibration performed on the instrument (see “Calibrating the Qubit® Fluorometer” on page 2), you need fewer tubes (step 1.1) and less working solution (step 1.3). For sample purity determinations, it is possible to use the Qubit® Fluorometer to calculate the amount of dsDNA and RNA in the same sample — simply perform each assay for your sample.

- 1.1 Set up the required number of 0.5-mL tubes for standards and samples. The Qubit® RNA HS Assay requires 2 standards.

Note: Use only thin-wall, clear, 0.5-mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit® assay tubes (Cat. no. Q32856) or Axygen® PCR-05-C tubes (part no. 10011-830).

- 1.2 Label the tube lids.

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

- 1.3 Prepare the Qubit® working solution by diluting the Qubit® RNA HS Reagent 1:200 in Qubit® RNA HS Buffer. Use a clean plastic tube each time you prepare Qubit® working solution. **Do not mix the working solution in a glass container.**

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

For example, for 8 samples, prepare enough working solution for the samples and 2 standards: ~200 µL per tube in 10 tubes yields 2 mL of working solution (10 µL of Qubit® reagent plus 1990 µL of Qubit® buffer).

- 1.4 Add 190 µL of Qubit® working solution to each of the tubes used for standards.

- 1.5 Add 10 µL of each Qubit® standard to the appropriate tube, then mix by vortexing 2–3 seconds. Be careful not to create bubbles.

Note: Careful pipetting is critical to ensure that exactly 10 µL of each Qubit® standard is added to 190 µL of Qubit® working solution.

- 1.6 Add Qubit[®] working solution to individual assay tubes so that the final volume in each tube after adding sample is 200 μ L.

Note: Your sample can be anywhere from 1–20 μ L. Add a corresponding volume of Qubit[®] working solution to each assay tube: anywhere from 180–199 μ L.

- 1.7 Add each sample to the assay tubes containing the correct volume of Qubit[®] working solution, then mix by vortexing 2–3 seconds. The final volume in each tube should be 200 μ L.
- 1.8 Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes.

Proceed to “Reading standards and samples”; follow the procedure appropriate for your instrument:

- “Qubit[®] 3.0 Fluorometer” below
- “Qubit[®] 2.0 Fluorometer” on page 5

Reading standards and samples

Qubit[®] 3.0 Fluorometer

- 2.1 On the Home screen of the Qubit[®] 3.0 Fluorometer, press **RNA**, then select **RNA: High Sensitivity** as the assay type. The “Read standards” screen is displayed. Press **Read Standards** to proceed.

Note: If you have already performed a calibration for the selected assay, the instrument prompts you to choose between reading new standards and running samples using the previous calibration. If you want to use the previous calibration, skip to step 2.4. Otherwise, continue with step 2.2.

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

The instrument displays the results on the Read standard screen. For information on interpreting the calibration results, refer to the *Qubit[®] 3.0 Fluorometer User Guide*.

- 2.4 Press **Run samples**.

- 2.5 On the assay screen, select the sample volume and units:

- a. Press the + or – buttons on the wheel to select the sample volume added to the assay tube (from 1–20 μ L).
- b. From the dropdown menu, select the units for the output sample concentration.

- 2.6 Insert a sample tube into the sample chamber, close the lid, then press **Read tube**. When the reading is complete (~3 seconds), remove the sample tube.

The instrument displays the results on the assay screen. The top value (in large font) is the concentration of the original sample. The bottom value is the dilution concentration. For information on interpreting the sample results, refer to the *Qubit[®] 3.0 Fluorometer User Guide*.

- 2.7 Repeat step 2.6 until all samples have been read.

Qubit® 2.0 Fluorometer

- 3.1 On the Home screen of the Qubit® 2.0 Fluorometer, press **RNA**, then select **RNA: High Sensitivity** as the assay type. The “Standards” screen is displayed.

Note: If you have already performed a calibration for the selected assay, the instrument prompts you to choose between reading new standards and running samples using the previous calibration. If you want to use the previous calibration, press **No** and skip to step 3.5. Otherwise, continue with step 3.2.

- 3.2 On the Standards screen, press **Yes** to read the standards.
- 3.3 Insert the tube containing Standard #1 into the sample chamber, close the lid, then press **Read**. When the reading is complete (~3 seconds), remove Standard #1.
- 3.4 Insert the tube containing Standard #2 into the sample chamber, close the lid, then press **Read**. When the reading is complete, remove Standard #2.

When the calibration is complete, the instrument displays the Sample screen.

- 3.5 Insert a sample tube into the sample chamber, close the lid, then press **Read**. When the reading is complete (~3 seconds), remove the sample tube.

The instrument displays the results on the Sample screen. The value displayed corresponds to the concentration after your sample was diluted into the assay tube. To find the concentration of your original sample, you can record this value and perform the calculation yourself (see “Calculating the sample concentration”, below) or the instrument can perform this calculation for you (see “Dilution Calculator” on page 6).

- 3.6 Repeat step 3.5 until all samples have been read.

Calculating the sample concentration – Qubit® 2.0 Fluorometer

Note: The Qubit® 3.0 Fluorometer performs this calculation automatically.

The Qubit® 2.0 Fluorometer gives values for the Qubit® RNA HS Assay in ng/mL. This value corresponds to the concentration after your sample was diluted into the assay tube. To calculate the concentration of your sample, use the following equation:

$$\text{Concentration of your sample} = \text{QF value} \times \frac{200}{x}$$

where QF value = the value given by the Qubit® 2.0 Fluorometer
x = the number of microliters of sample added to the assay tube

This equation generates a result with the same units as the value given by the Qubit® 2.0 Fluorometer. For example, if the Qubit® 2.0 Fluorometer gave a concentration in ng/mL, the result of the equation is in ng/mL.

Dilution Calculator – Qubit® 2.0
Fluorometer

The Dilution Calculator feature of the Qubit® 2.0 Fluorometer calculates the concentration of your original sample based on the volume of sample you added to the assay tube. To have the Qubit® 2.0 Fluorometer perform this calculation for you, follow the instructions below.

- 4.1 After the sample measurement is complete, press **Calculate Stock Conc.** The “Dilution Calculator” screen is displayed.
- 4.2 Using the volume roller wheel, select the volume of your original sample that you added to the assay tube. When you stop scrolling, the Qubit® 2.0 Fluorometer calculates the original sample concentration based on the measured assay concentration.
- 4.3 To change the units in which the original sample concentration is displayed:
 - a. Press **ng/mL**.
 - b. On the unit selection pop-up window, select a unit for your original sample concentration.
 - c. Touch anywhere on the screen to close the pop-up window. The Qubit® 2.0 Fluorometer automatically converts the units to your selection.
- 4.4 To save the data from your calculation to the Qubit® 2.0 Fluorometer, press **Save** on the Dilution Calculator screen. The last calculated value of your measurement is saved in the *.csv file and tagged with a time and date stamp.
- 4.5 To exit the Dilution Calculator screen, press any navigator button on the bottom of the screen or press **Read Next Sample**.

Note: When you navigate away from the Dilution Calculator screen, the Qubit® 2.0 Fluorometer saves the last values for the sample volume and units on the Dilution Calculator screen only. Returning to the Dilution Calculator screen displays these last selected values.

Appendix

Selectivity of the Qubit® RNA HS Assay

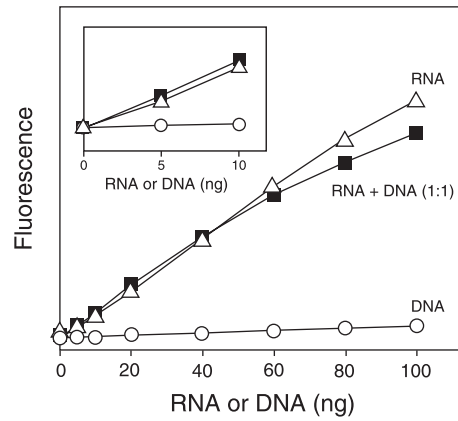


Figure 1. RNA selectivity and sensitivity of the Qubit® RNA HS Assay (Q32852, Q32855). Triplicate 10- μ L samples of *E. coli* rRNA (Δ), λ DNA (O), or a 1:1 mixture of RNA and DNA (\blacksquare) were assayed in the Qubit® RNA HS Assay. Fluorescence was measured at 630/680 nm and plotted versus the mass of nucleic acid for the RNA alone or DNA alone, or versus the mass of the RNA component in the 1:1 mixture. The variation (CV) of replicate RNA determinations was $\leq 10\%$. The inset is an enlargement of the graph to show the sensitivity of the assay for RNA. Background fluorescence has not been subtracted.

Effect of temperature on the Qubit® RNA HS Assay

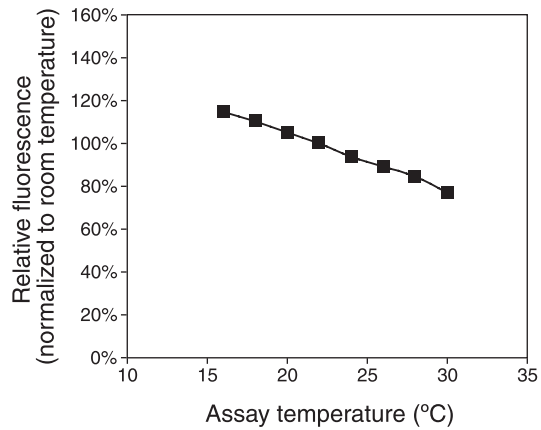


Figure 2. Plot of fluorescence vs. temperature for the Qubit® RNA HS Assay. The Qubit® assays are designed to be performed at room temperature, as temperature fluctuations can influence the accuracy of the assay.

How the Qubit® Fluorometer calculates concentration

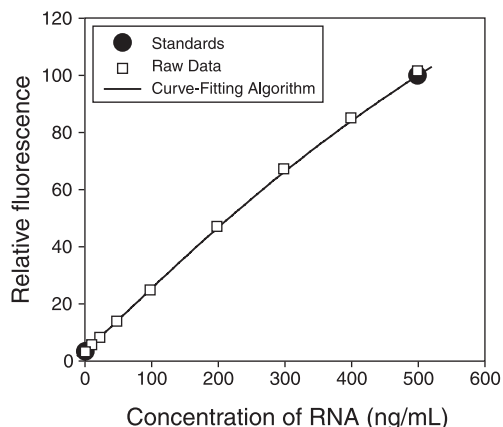


Figure 3. The curve-fitting algorithm used to determine concentration in the Qubit® RNA HS Assay. The Qubit® Fluorometer generates concentration data based on the relationship between the two standards used in the calibration. This plot shows the line corresponding to the curve-fitting algorithm (a modified Hill plot) used in the calculation of concentration data for the Qubit® RNA HS Assay. For reference, the positions of the standards and a set of data points from an actual experiment are shown superimposed onto the line, demonstrating that the curve-fitting algorithm gives accurate values for quantitation.

Contaminants tolerated by the Qubit® RNA HS Assay

Table 2. Effect of contaminants in the Qubit® RNA HS Assay, tested over a range of 25–500 ng/mL*

Contaminant	Final concentration in the assay	Concentration in 20-µL sample	Concentration in 10-µL sample	Result
Sodium chloride	10 mM	100 mM	200 mM	OK
Magnesium chloride	2 mM	20 mM	40 mM	OK†
Sodium acetate	10 mM	100 mM	200 mM	OK†
Ammonium acetate	10 mM	100 mM	200 mM	OK
Potassium phosphate, pH 7.4	5 mM	50 mM	100 mM	OK
Ethanol	1%	10%	20%	OK
Phenol	0.1%	1%	2%	OK†
Chloroform‡	0.2%	2%	4%	OK
SDS	0.01%	0.1%	0.2%	NR
Triton® X-100	0.001%	0.01%	0.02%	OK
dNTPs§	100 µM	1 mM	2 mM	OK
BSA	20 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	OK
IgG	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	OK
NTPs	1X°	1X°	1X°	OK
ssDNA	1X°	1X°	1X°	OK
Oligos	1X°	1X°	1X°	OK
dsDNA	1X°	1X°	1X°	OK

**E. coli* rRNA standards were assayed in the presence or absence of contaminants at the indicated final concentrations. Equivalent concentrations (approximate) in 20-µL or 10-µL sample volumes are also listed. Results are given either as OK, usually less than 10% perturbation, or as NR, not recommended.

† An acceptable result, but with some distortion of the standard curve; for best results, add the same amount of contaminant to the standard samples.

‡ Immiscible.

§ A mixture of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP.

° 1X indicates a concentration equal to the concentration of rRNA.

**Qubit® assay kits compatible
with the Qubit® Fluorometer**

A number of fluorescence-based quantitation kits are available for use with the Qubit® Fluorometer. Use Table 3 to choose a kit based on the target molecule being measured and the number of assays you require.

Table 3. Qubit® assay kits for use with the Qubit® Fluorometer

Product	Cat. no.	Number of assays*	Target	Notes
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Q32850	100	dsDNA	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 0.01 µg/mL to 5 µg/mL† • Extended range (moderate confidence): 5 µg/mL to 10 µg/mL† • Useful for quantitation of genomic and miniprep DNA samples • Accurate in the presence of RNA, salts, solvents, proteins, and free nucleotides
	Q32853	500		
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Q32851	100	dsDNA	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 1 ng/mL to 500 ng/mL† • Extended ranges (moderate confidence): 0.5 ng/mL to 1 ng/mL and 500 ng/mL to 600 ng/mL† • Useful for quantitation of PCR products, viral DNA, and samples for subcloning • Accurate in the presence of RNA, salts, solvents, proteins, and free nucleotides
	Q32854	500		
Qubit® ssDNA Assay Kit	Q10212	100	ssDNA	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 5 ng/mL to 1000 ng/mL† • Extended ranges (moderate confidence): 1 ng/mL to 5 ng/mL and 1000 ng/mL to 1200 ng/mL† • Useful for quantitation of oligos, primers, denatured DNA, PCR products • Accurate in the presence of salts, urea, solvents, proteins, ATP, and agarose
Qubit® RNA HS Assay Kit	Q32852	100	RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 25 ng/mL to 500 ng/mL† • Extended ranges (moderate confidence): 20 ng/mL to 25 ng/mL and 500 ng/mL to 1000 ng/mL† • Useful for quantitation of samples for microarray, RT-PCR, and Northern blot procedures • Accurate in the presence of DNA, salts, solvents, proteins, and free nucleotides
	Q32855	500		
Qubit® RNA BR Assay Kit	Q10210	100	RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 0.1 µg/mL to 5 µg/mL† • Extended ranges (moderate confidence): 0.05 µg/mL to 0.1 µg/mL and 5 µg/mL to 6 µg/mL† • Useful for quantitation of samples for microarray, RT-PCR, and Northern blot procedures • Accurate in the presence of DNA, salts, solvents, proteins, and free nucleotides
	Q10211	500		
Qubit® microRNA Assay Kit	Q32880	100	RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 5 ng/mL to 500 ng/mL† • Extended ranges (moderate confidence): 2.5 ng/mL to 5 ng/mL and 500 ng/mL to 750 ng/mL† • Useful for quantification of samples for qRT-PCR and sequencing applications • Accurate in the presence of rRNA, large mRNA (>1000 bp), salts, solvents, proteins, and free nucleotides
	Q32881	500		
Qubit® Protein Assay Kit	Q33211	100	Protein	<ul style="list-style-type: none"> • Core range (high confidence): 1.25 µg/mL to 25 µg/mL† • Extended ranges (moderate confidence): 1 µg/mL to 1.25 µg/mL and 25 µg/mL to 26 µg/mL† • Little protein-to-protein difference in signal • Accurate in the presence of DTT, β-mercaptoethanol, amino acids, and DNA • Signal is stable for 3 hours
	Q33212	500		

*Based on an assay volume of 200 µL.

†Concentration ranges refer to the concentration of sample after dilution in the assay tube.

Product List Current prices may be obtained from our website or from our Customer Service Department.

Cat. no.	Product name	Unit size
Q32852	Qubit [®] RNA HS Assay Kit, 100 assays *5–100 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32855	Qubit [®] RNA HS Assay Kit, 500 assays *5–100 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Related products		
Q32850	Qubit [®] dsDNA BR Assay Kit, 100 assays *2–1000 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32853	Qubit [®] dsDNA BR Assay Kit 500 assays *2–1000 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32851	Qubit [®] dsDNA HS Assay Kit, 100 assays *0.2–100 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32854	Qubit [®] dsDNA HS Assay Kit, 500 assays *0.2–100 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q10210	Qubit [®] RNA BR Assay Kit, 100 assays *20–1000 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q10211	Qubit [®] RNA BR Assay Kit, 500 assays *20–1000 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q10212	Qubit [®] ssDNA Assay Kit, 100 assays *1–200 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32880	Qubit [®] microRNA Assay Kit, 100 assays *1–100 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32881	Qubit [®] microRNA Assay Kit, 500 assays *1–100 ng* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q33211	Qubit [®] Protein Assay Kit, 100 assays *0.25–5 µg* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q33212	Qubit [®] Protein Assay Kit, 500 assays *0.25–5 µg* *for use with the Qubit [®] Fluorometer*	1 kit
Q32856	Qubit [®] assay tubes *set of 500*	1 set

Purchaser Notification

These high-quality reagents and materials must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Read the Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Obtaining Support

For the latest services and support information for all locations, go to www.lifetechnologies.com.

At the website, you can:

- Access worldwide telephone and fax numbers to contact Technical Support and Sales facilities
- Search through frequently asked questions (FAQs)
- Submit a question directly to Technical Support (techsupport@lifetech.com)
- Search for user documents, SDSs, vector maps and sequences, application notes, formulations, handbooks, certificates of analysis, citations, and other product support documents
- Obtain information about customer training
- Download software updates and patches

SDS

Safety Data Sheets (SDSs) are available at www.lifetechnologies.com/sds.

Certificate of Analysis

The Certificate of Analysis provides detailed quality control and product qualification information for each product. Certificates of Analysis are available on our website. Go to www.lifetechnologies.com/support and search for the Certificate of Analysis by product lot number, which is printed on the product packaging (tube, pouch, or box).

Limited Product Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.lifetechnologies.com/termsandconditions. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.lifetechnologies.com/support.

Disclaimer

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

Important Licensing Information

These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries, unless otherwise specified.

©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.



Vedlegg.6

NCBI Primer design

Primer pair 1

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	GCGCTCTTATGAGCAAGCAC	55.00	8.00	2.00	Plus 20	127	146 59.97
Reverse primer	ACACGGGTTAGTGTGCTGAG	55.00	4.00	3.00	Minus 20	283	264 59.97
Internal oligo	TCTGTCTCCCCGGTGCGGTT				Plus 20	148	167 59.83 65.00

Product length157

Primer pair 2

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	TACGCACCACTTTACGCAGT	50.00	3.00	2.00	Plus 20	4297	4316 59.97
Reverse primer	TCCTGGGGAGCCGTGTATTA	55.00	3.00	3.00	Minus 20	4425	4406 60.03
Internal oligo	TCCAAATCTCGCATTGAACCGGT	47.83			Plus 23	4375	4397 57.05

Product length129

Primer pair 3

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	TGTCCACACGGAGTGATTGG	55.00	5.00	1.00	Plus 20	3628	3647 59.97
Reverse primer	GGCCTGTTGTTGCTCTGTTG	55.00	4.00	0.00	Minus 20	4254	4235 59.97
Internal oligo	ACAGCAGGAGGGGGTGGGAT				Plus 20	3655	3674 58.86 65.00

Product length627

Primer pair 4

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	TAATACACGGCTCCCCAGGA	55.00	3.00	3.00	Plus 20	4406	4425 60.03
Reverse primer	GCCCTGAATGCCAGCAAAAA	50.00	4.00	0.00	Minus 20	5289	5270 59.96
Internal oligo	CACACCAGCCCCTGATGCCA				Plus 20	5064	5083 58.97 65.00

Product length884

Primer pair 5

Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	TGTCCCCACGGTTGAAAACA	50.00	3.00	1.00	Plus 20	176	195 60.03

Reverse primer	AACCCACTGGTTTGTGAGCA	Minus	20	482	463	60.03	
50.00	7.00	2.00					
Internal oligo	ACCCCACTGGCGACAGTGGT	Plus	20	311	330	60.04	65.00
Product length307							
Primer pair 6							
Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	ATGTTGGGCACTCACATCGT	Plus	20	2101	2120	59.96	
50.00	4.00	2.00					
Reverse primer	TGCTCTCCACCTGATAGGCT	Minus	20	2410	2391	60.03	
55.00	4.00	3.00					
Internal oligo	TGCAGACCAACCTGATAGTCCCA	Plus	24	2246	2269	59.09	
54.17							
Product length310							
Primer pair 7							
Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	GACACCAGCGGACAAAGGTA	Plus	20	6951	6970	59.97	
55.00	3.00	2.00					
Reverse primer	GCAGGTAGTGTCAATGCCCT	Minus	20	7235	7216	60.04	
55.00	5.00	3.00					
Internal oligo	CCTTGTGTTACCTGGCGTGGCA	Plus	22	7136	7157	59.61	
59.09							
Product length285							
Primer pair 8							
Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	GGGAAGTCACGCCTGATTGA	Plus	20	6400	6419	60.04	
55.00	6.00	2.00					
Reverse primer	TACCTTTGTCCGCTGGTGTC	Minus	20	6970	6951	59.97	
55.00	3.00	1.00					
Internal oligo	CCAGGCACAGCAACTGGTAGTGC	Plus	23	6493	6515	60.24	
60.87							
Product length571							
Primer pair 9							
Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	TGGAGCTCAGGGATTTGCAG	Plus	20	5847	5866	60.03	
55.00	6.00	2.00					
Reverse primer	TCAATCAGGCGTGA CTCCC	Minus	20	6419	6400	60.04	
55.00	6.00	2.00					
Internal oligo	AACCACCAGTGCGGGCTTCC	Plus	20	6225	6244	59.55	65.00
Product length573							
Primer pair 10							
Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self
complementarity	Self 3' complementarity						
Forward primer	AGCAAGCACTTCTGTCTCCC	Plus	20	138	157	59.96	
55.00	4.00	0.00					

Reverse primer CACTGTAGCCACAAGCCTCA Minus 20 946 927 59.96
 55.00 6.00 1.00
Internal oligo ACCCACTGGCGACAGTGGT Plus 20 311 330 60.04 65.00

Product length: 809

Sequence:

Enterovirus D68 isolate EVD68/Homo sapiens/XXX/ATCC VR-1197/XXXX, complete genome
GenBank: KT725431.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS KT725431 7319 bp ss-RNA linear VRL 03-OCT-2015
DEFINITION Enterovirus D68 isolate EVD68/Homo sapiens/XXX/ATCC VR-1197/XXXX, complete genome.
ACCESSION KT725431
VERSION KT725431.1
DBLINK BioProject: PRJNA270340
KEYWORDS .
SOURCE Enterovirus D68 (EV-D68)
 ORGANISM Enterovirus D68
 Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
 Picornavirales; Picornaviridae; Enterovirus; Enterovirus D.
REFERENCE 1 (bases 1 to 7319)
 AUTHORS Das,S.R., Halpin,R.A., Lin,X., Akopov,A., Fedorova,N., Puri,V.,
 Stockwell,T., Amedeo,P., Katzel,D., Schobel,S. and Shrivastava,S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (09-SEP-2015) J. Craig Venter Institute, 9704 Medical
 Center Drive, Rockville, MD 20850, USA
COMMENT This work was supported by the National Institute of Allergy and
 Infectious Diseases (NIAID), Genome Center for Infectious Diseases
 (GCID) program.
 Sequence data was generated using next-generation sequencing
 platforms. Primers and barcodes were trimmed before assembly unless
 otherwise stated in the feature section.

##Genome-Assembly-Data-START##

Current Finishing Status :: Finished

Assembly Method :: clc_ref_assemble_long v. 3.22.55705

Genome Coverage :: 222.4x

Sequencing Technology :: Ion Torrent

##Genome-Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..7319

 /organism="Enterovirus D68"

 /mol_type="genomic RNA"

 /isolate="EVD68/Homo sapiens/XXX/ATCC VR-1197/XXXX"

 /host="Homo sapiens"

 /culture_collection="ATCC:VR-1197/XXXX"

```

/db_xref="taxon:42789"
/PCR_primers="fwd_name: Ampl_1_Forward, fwd_seq:
ttaaacagcctggggtgtcc, rev_name: Ampl_1_Reverse,
rev_seq: ggcccccaagtggccaaaatttac"
/PCR_primers="fwd_name: Ampl_2_Forward, fwd_seq:
ttaaacagcctggggtgtcc, rev_name: Ampl_2_Reverse,
rev_seq: ggtcccaagtagccaaaatttac"
/PCR_primers="fwd_name: Ampl_3_Forward, fwd_seq:
ggccgccgggtatttttaaacagcctggggtgtcc, rev_name:
Ampl_3_Reverse, rev_seq:
ccgaagtgggggggttttttttttttttttttttttt"
misc_feature 1..7319
/db_xref="ViPR:ENTSP_XENTERO_00001.MAIN"
gene 709..7275
/gene="POL"
/locus_tag="RR33_53477gpPOL"
CDS 709..7275
/gene="POL"
/locus_tag="RR33_53477gpPOL"
/codon_start=1
/product="polyprotein"
/protein_id="ALG02131.1"

1 cacccaaggg cccacgtggc ggctagtact ctggtatctt ggtaccttg tacgcctgtt
61 ttaatccct cccaaccta acttagaagc ttcaaacca aagctcaata ggtggagcgc
121 aaaccagcgc tttatgagc aagcactct gtctccccgg tgcggtgca tagactgtcc
181 ccacggtga aaacaacta tccgtaacc gctatagtac ttcgagaac ctagtatcac
241 ctteggagtg tcatgctgtt gcgtcagca cactaacccg tgtgtagctt gggtcgatga
301 gtctggacgt acccactgg cgacagtggc ccaggctgcg ttggcggcct actcatgggt
361 aaaacctga gacgtagac atgaacaagg tgtgaagagt ttattgagct actatagagt
421 cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcctaa ccatggagca agtgctaca aaccagtggg
481 ttgctgtcg taacgcgcaa gtccgtggcg gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgttca
541 cttttactt ttatgactgc taatggtgac aatttaatat tgtaccatt tggctgtca
601 aattgatcac ataagatcta tagtttgtt tactgagtta tttgaagta atcttacctc
661 aaaacctcca gtacataaca ttaaagagt taaacttaa ttataataat ggggtctcaa
721 gttactagac agcaaactgg aactcacgag aatgctaaca ttgccacaaa tgggtcccat
781 attacataca atcagataaa ttttacaag gatagttatg cagcttcagc cagcaagcaa
841 gactttcac aggatccatc aaaattcact gagccagtgc tggaggcctt aaaagcaggg
901 gcaccagttt tgaatctcc tagcgtgag gcttgtggct acagtgatag agtactacaa
961 ctcaaattgg gcaactcagc tattgtcact caagaagcag caaattactg ttgcgcttat
1021 ggtgaatggc ctaattattt accagatcat gaagcagtgg ctattgataa acctacacaa
1081 ccagaaactt ctacagacag attttatact ttaagatcag tgaatggga gatcaacagc
1141 acaggatggg ggtggaaact acctgatgca ttaataaca taggcatgtt tggacaaaat
1201 gtacaatac actaccttta tagatctggc ttcttaattc atgtgcaatg taacgccaca
1261 aagtccatc aaggcgcgct gttagtggta gcaataccag agcatcagag aggagcacat
1321 gacaccacca ctagtccagg attaatgac atcatgaaag gtgaaagagg agggacgttc
1381 aatcaccat atgttctga tgatgggaca tcaatagctt gtgcgacaat attccacat
1441 caatggataa acctaaagaac taacaattca gcaacgattg ttctccatg gatgaatgct
1501 gcaccaatgg actttccact tagacacaaat cagtggacac tagcagtaat accagtgggt
1561 ccattgggta cacgcacaat gtcaagtgtt gtccaataa cagttcaat tgcccctatg

```

1621 tgtgtgagt ttaacggact caggcacgct atcaccagg gtgtccaac atacetteta
1681 ccaggttcag gacaattct gactactgat gaccatagct cagcaccagt cctcccgtgt
1741 tcaacccaa ctccagaaat gcacattcca gggcaaatcc gtaacatgtt ggaaatgatt
1801 caagtggaaat caatgatgga gataaacaac acagaaggca caaatggcat ggagcgtctc
1861 agagttgaca tatcagtaca agcagatctt gatcagttat tatttaacat tccattagat
1921 atacaactgg atggaccact tagaaacact ctagtaggga acatatccag atactatact
1981 cattggtctg gatctctaga aatgacattc atgttttgcg gtagctttat ggcaacaggg
2041 aaattgatcc tatgttacac acctccaggt ggatcatgcc caacaaccag agaaactgcc
2101 atgttgggca ctacatcgt ctgggacttt ggattacaat ctatcatcac ttaataata
2161 ccttggatta gtggatccca ctacaggatg ttcaatggtg acgctaagtc aaccaatgcc
2221 aatgttggtc atgtaacctg ttctatgcag accaacctga tagtccccag tgagtctct
2281 gatacttgtt cttaaatagg atcatagcg gcaaaggatg attttccct caggttaatg
2341 agagatagtc cagatattgg acaattagac cacttacatg gagcagaggc agcctatcag
2401 gtggagagca tcatcaagac agcaactgat actgtgaaaa gtgagattga tgccgaactt
2461 ggtgtgtgct ctagtctaaa tgcagttgaa actggtgcaa ctccaacac tgaaccagaa
2521 gaagccatac aaactcgcac agtaataaat cagcatggtg tgcagagac gtcagtggag
2581 aattttctcg gtagggcagc cctggtgtca aagaaaagt ttgaataca gaaccatgcc
2641 tcatccagcg cagggacaca caaaaattc tttaaatgga caattaatac taagtcctt
2701 gtccagtaa gaagaaagct agaattgtt acatacctta ggtttgatgc tgaatcacc
2761 atactacaa ctgtagcagt aatggtagt aatgacagca catacatggg tctcctgac
2821 ttgacactcc aagcaatgtt tftaccaact ggtgttctta ctcaaagga acaggattcg
2881 tttcattggc aatcaggctg taatgctagt gtgttctta aaatttctga tccccagct
2941 agaatgacta tacctttat gtgcatcaac tcagcatatt cagttttta tgatggctt
3001 gctggatttg agaaaaatgg tctatatgga ataaaccag ctgacacat tggcaacttg
3061 tgtgtcagaa tagtgaatga acatcaacca gttggttca cagtgacct tagggttac
3121 atgaagccta aacatgtaa agcatgggct ccacgaccac cgcgaacct gccatacatg
3181 agcattgcta atgcaatta caaaggtaga tatacagcac caaacacact taatgccata
3241 attgtaata gagcgagtgt cacaactatg cctcacaaca tagtaaccac cggtcaggt
3301 tttgggggag tctttgtagg gtcctttaag ataatcaact accattttag cacaatagaa
3361 gagagacaat cagctattta tgtggactgg caatcagata ttctagtcac cccattgct
3421 gctcatggta gacatcaat agcaagatgc aagtgaata caggggtta ctattgccgg
3481 cacaaagata gaagctacce aatttgctt gaaggtccag gaattcaatg gattgaacaa
3541 aatgaatact acccagcaag gtaccagact aatgtactc tagcaactgg cccgcagaa
3601 gcaggagatt gtggtggtct attagtctgt ccacacggag tgattggcct cttacagca
3661 ggaggggggtg ggattgtagc ttctactgac atcagaaatt tactatggtt ggatactgat
3721 gttatggaac aaggtattac tgattacata caaatcttg gtaatgctt tggagcagga
3781 ttacagaaa caatcctcaa taaggccaag gaagtgaag acatgttaat tggagagagt
3841 tcattactgg agaaatact aaaagctcta atcaaaatta taccagact ggtgattga
3901 attagaatt cagaagatt gataacagtc acagctacac tagcattgtt aggggtgcat
3961 gactcaccat ggagctactt gaacaaaaag gtatgctcat acttgggcat tccctatgt
4021 cctagacaaa gtgaatcatg gcttaagaag ttacagagg catgcaatgc tctcaggggt
4081 ttagattggt taccacaaa aatagataag tcttaact ggcttaaac taaaatatta
4141 ccagaggcta gggagaaata cgaattgtg caaagactca agcagctacc agtaatagaa
4201 aatcaagta gactattga acatagttgc ccaacaacag agcaacaaca ggccttattc
4261 aataatgite agtactattc acattactgt aggaagtacg caccattta cgcagtggaa
4321 tcaaaaagag tggctgctct tgaagagaaa ataaacaatt acatccagtt caagtccaaa
4381 tctcgcattg aaccggtttg ttaataata cacggctccc caggaactgg taaatcagta
4441 gctcaaat taattgctag agctatcaca gaaaattag gcggagacat ttactccta
4501 cccccagacc ctaagtactt tgatggatat aaacaacaaa cagtagtctt tatggatgat
4561 ttaatgcaaa atccagatgg gaatgacata tctatgttt gccaatggt ctccactgtg

4621 gattttatc ctccaatggc cagtttggaa gagaaaggaa ctctatacac cagtccattc
4681 ttgatagcta ctactaatgc tggctcaata catgcaccaa cagtctcaga ttcgaaggcc
4741 ttgtcacgca ggttcaaatt cgatgtggac attgaagta cagattcata caaagactcg
4801 aacaaactag acatgtccag agcagtggaa atgtgcaaac cagatgactg tgccccact
4861 aattataaaa gatgctgccc actgatttgc ggaaaagcca ttcaatttag agatcgtaga
4921 actaatgcaa gatccacgat tgatagcta gtgactgaca ttattaagga atatagaacc
4981 aggaatagca cacaagacaa attagaagct ctatttcaag gacctccaca attaaggag
5041 attaaaatct cagtactcc agacacacca gccctgatg ccataaatga ctttcttagg
5101 tcaaggact ctaagaagt tagagattat tgcataaaga aggggtggat tgtaatacac
5161 ccatcaaatg agctacttgt agaaaaacat attagtagag ctttcatcac tctgcaagct
5221 atgccactt ttgtatcaat agctgggtga gtctatgca tataaaaact ttttctggc
5281 attcagggcc catacacagg aattcctaac cctaaacca aagtgcctc tcttagaacg
5341 gctaaagtgc aaggaccagg atttgattt gcacaagcca taatgaagaa aaactgtt
5401 attgctagaa ctgaaaaagg cgagttcaca atgcttggg tgatgatag agtggcagtt
5461 attectacac atgcatctgt tggagaaatc atttatatca acgatgtgga aactagagtt
5521 ctgatgcat gtgcactcag agatttaaca gatacaaac tagaaataac tatagtcaa
5581 ttggaccgca atcaaaaatt tagagacatc agacactttt taccagatg tgaggatgat
5641 tacaatgatg ctgtgcttag tftacataca tcaaaattcc ccaacatgta cattccagtt
5701 ggacaagta ctaactacgg ctcttgaac ctgggcggca caccaacaca tctgattta
5761 atgtataact ttcaacaag agctggctcag tgtggtggg tgggacaac cacaggtaaa
5821 gtgataggaa tacacgtggg cgggaatgga gctcagggat ttgcagcaat gttgctccac
5881 tctacttta ctgatacaca aggtgagata gttagtaatg aaaagagtgg gatgtgtatt
5941 aatgcaccag caaaaacaaa actccaacc agtgtctcc atcaagttt tgaaggctca
6001 aaggaaccag cagtactcaa ttcaaaagat cctagactca agactgattt tgaggaggct
6061 attttctcaa aatatacagg taacaaaatt atgttaatgg atgagtacat ggaagaagca
6121 gtggatcatt atgtgggatg tttagaacca ctggatatta gtgtagatcc cataccctt
6181 gaaaatgcta tgtatggaat ggacggcctt gaagcattgg acttaaccac cagtgcgggc
6241 tcccctatt tgttacaagg gaaaaagaaa agggacatat tcaacagaca aaccagagac
6301 actagtgaga tgacaagat gttgaaaaa tacggagtgt acctacctt tgtgacttc
6361 gtgaaagacg agcttagatc aagagagaaa gtcgaaaagg ggaagtcacg cctgattgaa
6421 gccagtctt tgaatgactc agttgccatg aggggtgctt ttggaaatct ttacgtaca
6481 ttcataaca atccaggcac agcaactggt agtgcagttg gttgtgatcc agatgtattc
6541 tggcaaaaa tcctatttt attagatgga gagattttg cttttgatta cactggttat
6601 gatgctagtt tgcaccagt gtggttgc ttttgaaaa aggttctgat taaactaggt
6661 tacaccacc aaacatctt tatagattat ctatgccact cagtgcattt gtataaagat
6721 agaaaatag tagttaatgg tggaatgcct tctggttct caggtagtag tatattaac
6781 actatgatta ataacataat cataagaact ttattaatta aggtttataa aggcatagac
6841 ctggaccagt tcaaatgat agcatacggg gatgatgta ttgctagtta tccacacaaa
6901 attgatccag gtttattagc agaagcaggt aagcactatg gattggaat gacaccagcg
6961 gacaaagta ccagctcgt tgatactaat tggaaaaatg taacttttt gaaaagatac
7021 ttcagagcag atgaccaata ccccttctt gtacatccag tgatgccaat gaaggagata
7081 catgaatcta ttgatggac taaagatccc agaaacacac aagatcatgt tagatccttg
7141 tgttacctgg cgtggcataa tggagaggag gcttacaatg aattttgtag aaaaattaga
7201 agtgtgcccg tggggagggc attgacacta cctgcatatt ctagtcttag acggaaatgg
7261 ttagattcgt tttagataac tcaattgaa acccaagttg cagttactt cacttagag

Vedlegg.7

Utarbeidet RT – qPCR metode

Reaksjonssammensetning:

Komponenter	Volum for 15µl reaksjoner	Endelig konsentrasjon
qScript XLT One-Step RT-qPCR TiughMix, Low ROX (2X) (Quantabio)	7.5µl	1x
Forward primer	0.9µl	300 nM
Revers primer	1.2 µl	400 nM
Taqman MGB probe	1.8 µl	300 nM
RNasefritt vann	2.6 µl	
RNA templat	1.0 µl	Variabel

Mastermiksen (qScript XLT One-Step RT-qPCR TiughMix, Low ROX (2X)) inneholder:

- Reaksjonsbuffer med optimaliserte konsentrasjoner av molekylær klasse MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- qScript XLT revers transkriptase
- RNase-hemmerprotein
- AccuStart II Taq DNA-polymerase
- Inert AccuVue™ plate-fargestoff
- Egne enzymstabilisatorer og ytelsesfremmende tilsetningsstoffer
- Titrerte referansefargestoffer (ROX)

Primer og probe:

Type	Sekvens 5'-3'	Modifikasjoner	Forhandler
MGB probe	TCC AAA TCT CGC ATT GAA CCG GT	6-FAM MGBNFQ	Applied Biosystems UK
HRV87 (RWD)	TCC TGG GGA GCC GTG TAT TA	-	Invitrogen
HRV87 (FWD)	TAC GCA CCA CTT TAC GCA GT	-	Invitrogen

Syklus:

cDNA syntese	50 grader, 10 min
--------------	-------------------

Initierende denaturering	95 grader, 1 min
PCR syklus (40 sykluser)	95 grader, 10 sek
	60 grader, 1 min

Gjennomført på 7500 Real Time PCR system fra Applied Biosystems, med tilhørende 7500 software.

BD Pharmingen™

BrdU Flow Kits

Instruction Manual

FITC BrdU Flow Kit

Catalog No. 559619 (50 tests)

Catalog No. 557891 (4 x 50 tests)

APC BrdU Flow Kit

Catalog No. 552598 (50 tests)

Catalog No. 557892 (4 x 50 tests)



Copyrights

© 2015, Becton, Dickinson and Company. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, transmitted, transcribed, stored in retrieval systems, or translated into any language or computer language, in any form or by any means: electronic, mechanical, magnetic, optical, chemical, manual, or otherwise, without prior written permission from BD Biosciences.

The information in this guide is subject to change without notice. BD Biosciences reserves the right to change its products and services at any time to incorporate the latest technological developments. Although this guide has been prepared with every precaution to ensure accuracy, BD Biosciences assumes no liability for any errors or omissions, nor for any damages resulting from the application or use of this information. BD Biosciences welcomes customer input on corrections and suggestions for improvement.

Trademarks

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.
© 2015 BD

Falcon® is a registered trademark of Corning Incorporated.

Regulatory information

BD flow cytometers are Class 1 Laser Products.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

History

Revision	Date	Change made
23-12721-00 Rev. 01	11/2011	New document
Rev. 2	3/2015	Updated Warnings section

Contents

Chapter 1: Introduction	5
Purpose of the kit	6
Limitations	8
Kit contents	9
Storage and handling	12
Chapter 2: Before you begin	15
BrdU Flow Kit protocol overview	16
Required materials	18
Reagent preparation	18
Chapter 3: Staining protocol	19
In vitro labeling of cells with BrdU	20
In vivo labeling of mouse cells with BrdU	21
BrdU Flow Kit staining protocol	22
Chapter 4: Instrument setup	27
Instrument setup guidelines	28
FITC BrdU instrument setup example	29
APC BrdU instrument setup example	32
Chapter 5: Analysis	35
Analysis of stained cell samples	36
Chapter 6: Reference	41
References	42

Introduction

This section covers the following topics:

- [Purpose of the kit \(page 6\)](#)
- [Limitations \(page 8\)](#)
- [Kit contents \(page 9\)](#)
- [Storage and handling \(page 12\)](#)

Purpose of the kit

BrdU staining The immunofluorescent staining of incorporated bromodeoxyuridine (BrdU) and flow cytometric analysis provide a high-resolution technique to determine the frequency and nature of individual cells that have synthesized DNA. In this method, BrdU (an analog of the DNA precursor thymidine) is incorporated into newly synthesized DNA by cells entering and progressing through the S (DNA synthesis) phase of the cell cycle.¹⁻⁴ The incorporated BrdU is stained with specific anti-BrdU fluorescent antibodies. The levels of cell-associated BrdU are then measured by flow cytometry. Often, staining with a dye that binds to total DNA such as 7-amino-actinomycin D (7-AAD) is coupled with immunofluorescent BrdU staining. With this combination, two-color flow cytometric analysis permits the enumeration and characterization of cells that are actively synthesizing DNA (BrdU incorporation) in terms of their cell cycle position (ie, G0/1, S, or G2/M phase defined by 7-AAD staining intensities).^{5,6}

Prolonged exposure of cells to BrdU allows for the identification and analysis of actively cycling, as opposed to non-cycling, cell fractions. Pulse labeling of cells with BrdU at various time points, permits the determination of cell-cycle kinetics. BrdU incorporation studies have been used in a variety of experimental protocols. These include in vitro and in vivo (eg, intraperitoneal injection or administration via drinking water) labeling systems.

An important feature of the BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit is that it provides reagents for immunofluorescent BrdU staining with a protocol that is compatible with the use of additional fluorescent antibodies specific for other cellular molecules. These molecules may include cell surface antigens or intracellular proteins (eg, cytokines, cyclins, and other proteins) the expression or activity of which may be related to the cell's activation, entry, and progression through cell cycle or cell death. This is possible because the BrdU Flow Kit staining protocol avoids DNA denaturing agents such as acid, ethanol, and high temperatures that can result in altered cellular light-scattering characteristics and limit the recognition of cellular antigens by fluorescent antibodies.⁷⁻¹¹

Other uses of the kit

Fluorescent antibodies that are capable of recognizing cell surface antigens or proteins in cells that have been fixed with paraformaldehyde and permeabilized with saponin can be used with the BrdU Flow Kit. However, not all antibody clones and fluorochromes are compatible with paraformaldehyde fixation. With the combination of reagents, the expression levels of various surface or intracellular proteins can be measured by flow cytometry relative to the cell's DNA synthetic activity (BrdU incorporation level). For example, the BrdU Flow Kit can be used with fluorescent anti-cytokine antibodies in time-course analyses of cultured cells following in vitro mitogenic stimulation of quiescent lymphoid cell populations. In this way, the levels of a particular cytokine (eg, the T-cell growth and differentiation factor, IL-2) that are expressed prior to, at, and following the onset of DNA synthesis (during the first major round of cell-cycle activity) can be studied.

Many high-resolution studies of this type are possible with the use of the BD Pharmingen BrdU Flow Kit and other selected flow cytometry reagents. The kit ensures consistent results by providing the critical reagents necessary to implement the staining protocol. These individual components have been rigorously tested for their suitability to perform multiparameter analyses of incorporated BrdU levels, cell surface antigen expression, and expression of intracellular antigens by individual cells. BrdU uptake can also be analyzed in frozen or paraffin embedded tissue sections. The BD Pharmingen™ BrdU In-Situ Kits (Catalog Nos. 550803 and 551321) provide the reagents that allow you to perform two-color staining in tissue sections.

Limitations

Assay limitations The BD Pharmingen BrdU Flow Kit staining procedure includes the fixative paraformaldehyde. Paraformaldehyde can alter epitopes on antigens and inhibit recognition by some antibodies after fixation. It is important that the antibody reagents used to stain proteins with this procedure be capable of binding to paraformaldehyde-fixed epitopes. Reagents that are compatible with other fixatives (eg, ethanol) may not work with the BD Pharmingen BrdU Flow Kit staining procedure.

Reagent limitations Both the BD Perm/Wash™ Buffer (1X) and the BD Cytoperm™ Permeabilization Buffer Plus should be used with fixed cell samples only. Use of these buffers on unfixed cells will cause cell damage.

Kit contents

Contents

The kits (Catalog Nos. 559619 and 552598) contain the following components. Because some kit components are stored at 4°C and others are stored at –80°C, the kit components are shipped separately. See [Storage and handling \(page 12\)](#) for details on storage.

Reagent	Quantity
Fluorochrome-conjugated anti-BrdU Antibody	One 65- μ L vial
BD Cytotfix/Cytoperm™ Buffer	One 25-mL bottle
BD Perm/Wash™ Buffer (10X)	Two 25-mL bottles
BD Cytoperm™ Permeabilization Buffer Plus	One 10-mL bottle
7-AAD	One 1-mL vial

The following items are shipped separately.

Reagent	Quantity
BrdU (10 mg/mL)	Five 0.5-mL vials
DNase	Five 300- μ L vials

Reagents

Some kit reagents are supplied as concentrated stock solutions and need to be diluted either with deionized water, 1X Dulbecco's PBS (DPBS), or with BD Perm/Wash Buffer. See [Reagent preparation \(page 18\)](#) for information. The concentrations of the kit components follow.

Fluorochrome-conjugated anti-BrdU Antibody. A single vial contains 65 μ L of fluorochrome-conjugated anti-BrdU antibody stock solution and is sufficient for staining 50 samples (10^6 cells/sample). The FITC BrdU Flow Kit (Catalog No. 559619) comes with 65 μ L of FITC-conjugated anti-BrdU antibody. The APC BrdU Flow Kit (Catalog No. 552598) comes with 65 μ L of APC-conjugated anti-BrdU antibody.

Note: If you run out of anti-BrdU antibody, an additional BrdU flow kit must be purchased. We do not recommend using any other anti-BrdU antibody clone or formulation from the BD Biosciences catalog in conjunction with this kit.

BD Cytotfix/Cytoperm™ Buffer. A 25-mL bottle of BD Cytotfix/Cytoperm Buffer is provided in a ready-to-use formulation. BD Cytotfix/Cytoperm Buffer constitutes a single-step fixation and permeabilization reagent, designed for use in intracellular staining. It contains a mixture of the fixative paraformaldehyde and the detergent saponin. This reagent serves to preserve cell morphology, fix cellular proteins, and permeabilize cells for the subsequent immunofluorescent staining of intracellular proteins.

BD Perm/Wash Buffer. Two 25-mL bottles contain a concentrated (10X) stock solution of BD Perm/Wash Buffer. The BD Perm/Wash Buffer mixture contains fetal bovine serum and the reversible permeabilization detergent reagent saponin.

BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus. One 10-mL bottle of buffer is provided. It is specially formulated for the BrdU Flow Kit and is used as a staining enhancer and secondary permeabilization reagent. It contains fetal bovine serum. One hundred microliters of this buffer is used for each sample. BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus can be purchased separately from BD (Catalog No. 561651, 10 mL).

7-AAD. One 1-mL vial of 7-AAD is provided. 7-amino-actinomycin D (7-AAD) is a fluorescent dye for labeling DNA for flow cytometric analysis. It contains fetal bovine serum. Twenty microliters of 7-AAD is used for staining each sample (10^6 cells/sample).

Note: Source of all serum proteins is from USDA-inspected abattoirs located in the United States.

BrdU and DNase

BrdU. Five vials of BrdU Solution are provided. Each vial contains 0.5 mL of a 10-mg/mL BrdU (32.5-mM) solution diluted in 1X DPBS. The BrdU solution provided is prepared aseptically (0.22- μ m filtered), and contains no preservative; therefore we recommend that the solution be handled under aseptic conditions. This stock solution can be injected intraperitoneally (IP) into animals or diluted to a 1-mM solution for in vitro labeling. For in vivo labeling by IP injection, see [In vivo labeling of mouse cells with BrdU \(page 21\)](#).

DNase. Five vials of DNase are provided. Each vial contains 300 μ L of a 1-mg/mL solution of DNase in 1X DPBS. DNase can be purchased separately from Sigma (Catalog No. D-4513).

Storage and handling

Storage

Antibody, buffers, and 7-AAD. Store the fluorochrome-conjugated anti-BrdU antibody, BD Cytofix/Cytoperm Buffer, BD Perm/Wash Buffer, BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus, and 7-AAD at 2 to 8°C. Keep the fluorochrome-conjugated anti-BrdU antibody and 7-AAD protected from light.

Unused portions of 1X BD Cytofix/Cytoperm Buffer can be stored at 2 to 8°C.

BrdU and DNase. Store the BrdU and DNase at -80°C.

The BrdU solution has been shown to be stable for up to 4 months at 2 to 8°C, or it can be refrozen. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

DNase stock solution (1 mg/mL) may be refrozen once before it loses activity.

Warnings and precautions

Danger. BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer (Fixation and Permeabilization Solution; component 51-2090KE) contains 4.2% formaldehyde (w/w).

Hazard statements

Harmful if inhaled.

Causes skin irritation.

Causes serious eye damage.

May cause an allergic skin reaction.

Suspected of causing genetic defects.

May cause cancer. Route of exposure: Inhalative.

May cause respiratory irritation.

Precautionary statements

Wear protective clothing / eye protection.

Wear protective gloves.

Do not breathe mist/vapours/spray.

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.

Continue rinsing.

If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

The anti-BrdU antibody and 7-AAD contain sodium azide. Sodium azide yields highly toxic hydrazoic acid under acidic conditions. Dilute azide compounds in running water before discarding to avoid accumulation of potentially explosive deposits in plumbing.

2

Before you begin

This section covers the following topics:

- [BrdU Flow Kit protocol overview \(page 16\)](#)
- [Required materials \(page 18\)](#)
- [Reagent preparation \(page 18\)](#)

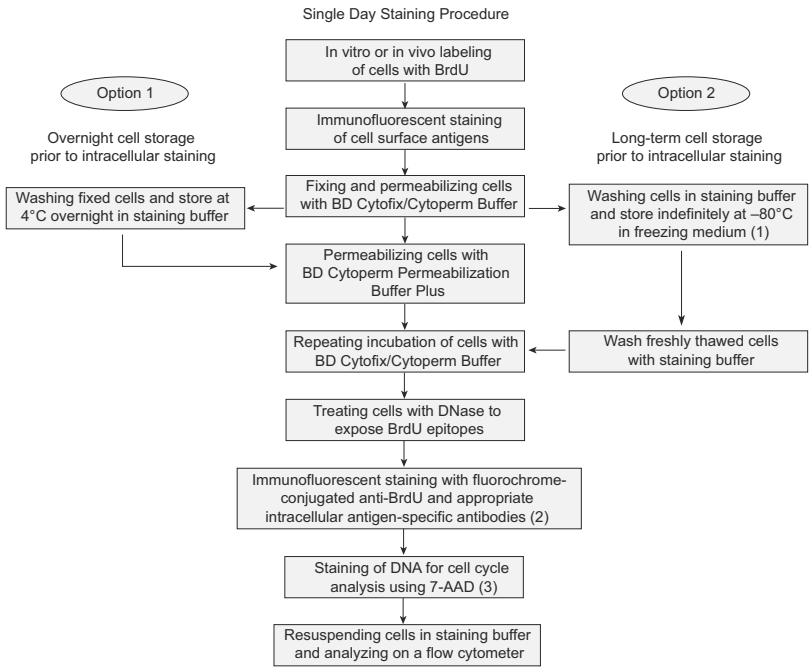
BrdU Flow Kit protocol overview

Options for storing cells prior to staining

The BD Pharmingen BrdU Flow Kit staining procedure offers several time-saving options for sample handling. With this staining protocol, it is possible to stain and analyze samples in a single day. The entire staining procedure requires approximately 3 hours.

Alternatively, samples may be fixed and stored for various lengths of time prior to staining. Due to the time intervals required for cell activation, BrdU incubation, and other factors that are necessary to prepare cells prior to staining, you may wish to store samples and complete the staining protocol at a later time.

- If short-term sample storage prior to staining is desired, Option 1 in the following flow chart allows you to store cells overnight after the initial fixation step.
- If longer sample storage is desired, Option 2 allows you to store frozen samples indefinitely, following the initial fixation step.



The following notes pertain to the numbers in parentheses found in the flow chart.

1. Recipe for Freezing Medium: 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) + 90% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).
2. The immunofluorescent staining of cell surface antigens can be done at the same time as staining intracellular antigens provided the antibodies recognize paraformaldehyde-fixed epitopes.
3. If you do not wish to stain for total DNA content, then the 7-AAD staining step can be omitted and fluorescent data for another parameter can be measured in that channel.

Required materials

Materials required but not provided

In addition to the reagents provided in the BD Pharmingen BrdU Flow Kit, the following items are also required.

- For the FITC kit, you will need a flow cytometer equipped with a 488-nm laser capable of detecting FITC and 7-AAD. For the APC kit, you will need a flow cytometer with a 488-nm laser capable of detecting 7-AAD and a 633- to 640-nm laser capable of detecting APC.
 - Falcon® 12 x 75-mm sample acquisition tubes for a flow cytometer (Catalog No. 352008)
 - Staining buffer, for example, BD Pharmingen™ Stain Buffer (FBS) [Catalog No. 554656] or 1X DPBS + 3% heat-inactivated FBS + 0.09% sodium azide
-

Reagent preparation

Introduction

Dilute the following reagents prior to use.

Procedures

Fluorochrome-conjugated anti-BrdU Antibody. Dilute an appropriate amount of the antibody stock solution 1:50 with 1X BD Perm/Wash Buffer. Fifty microliters of the diluted antibody is used to stain each sample.

BD Perm/Wash Buffer. Dilute the concentrated stock buffer 1:10 with deionized water. Store unused portions of 1X BD Perm/Wash Buffer at 4°C.

3

Staining protocol

This section covers the following topics:

- [In vitro labeling of cells with BrdU \(page 20\)](#)
- [In vivo labeling of mouse cells with BrdU \(page 21\)](#)
- [BrdU Flow Kit staining protocol \(page 22\)](#)

In vitro labeling of cells with BrdU

Introduction

Many different protocols for in vitro BrdU labeling of cells have been reported.¹²⁻¹⁵ We have found that incubating cells with BrdU at a final concentration of 10 μM in cell culture medium (ie, 10 μL of 1-mM BrdU per mL of culture medium) was effective for labeling a wide variety of human and mouse cell lines and normal cell populations.^{15,16} Prolonged exposure of cells to BrdU allows for the identification of actively cycling cell populations. Pulse labeling of cells by brief BrdU exposures at various time points permits the determination of cell-cycle kinetics.

Use cells from the same population that are not BrdU-labeled as a negative staining control for this assay. This allows you to determine background staining levels for the anti-BrdU monoclonal antibody.

Before you begin

For pulse-labeling experiments, the choice of time points and lengths of time for pulsing depends on the test cell population's rate of cell cycle entry and progression. For example, an effective length of time for pulsing an actively proliferating cell line (eg, CTLL-2 cells) is 30 to 45 minutes (ie, when the cells are in the logarithmic phase of cell proliferation).

Determine time points and pulse-labeling time intervals that are optimal for each different cell line or cell population within a particular experimental system.

Dilute the BrdU stock (10-mg/mL BrdU solution) to a 1-mM solution by adding 31 μL to 1 mL of either 1X DPBS or culture medium (this is a dilution of 32X). Add 10 μL of the 1-mM solution to each mL of culture medium to obtain a final concentration of 10 μM . The molecular weight of BrdU is 307.1.

Procedure**To label cells in vitro:**

1. Carefully add 10 μL of BrdU solution (1 mM BrdU in 1X DPBS) directly to each mL of tissue culture medium.

Avoid disturbing the cells in any way (eg, centrifugation steps or temperature changes) that may disrupt the normal cell cycling patterns. The cell culture density should not exceed 2×10^6 cells/mL.

2. Incubate the treated cells for the desired length of time.
-

In vivo labeling of mouse cells with BrdU

Introduction

Two common methods reported for in vivo BrdU labeling of cells include the intraperitoneal (IP) injection of a BrdU-containing solution into mice and the feeding of mice with BrdU that is added to their drinking water.¹⁶⁻²² However, these methods have not been routinely tested at BD Biosciences.

Injecting BrdU via the intraperitoneal route

A 10 mg/mL solution of BrdU in sterile 1X DPBS is provided for in vivo use. Inject mice IP with 100 to 200 μL (1–2 mg) of BrdU solution.^{17,19,21} Incorporation of BrdU can be readily detected in thymus and bone marrow in as little as 1 hour post injection.

Introduction of BrdU through drinking water

Dilute BrdU to 0.8 mg/mL in the drinking water. The BrdU mixture should be made up fresh and changed daily.^{18,23} Prolonged feeding of BrdU can have toxic effects for the animal. Some researchers have reported lethal effects associated with 14 days of continuous BrdU feeding.²¹ For longer term studies, some researchers have reported that feeding mice with BrdU for 9 consecutive days followed by a changeover to normal water has worked effectively.¹⁸ BrdU incorporation by cells from these animals has been detected past 70 days.¹⁸

BrdU Flow Kit staining protocol

Before you begin When treating 10 or more samples, thaw the entire vial of DNase solution and add 700 μL of 1X DPBS to make a working stock solution of 300 $\mu\text{g/mL}$. If treating fewer than 10 samples, take a 30- μL aliquot (1 mg/mL) of DNase solution per sample and refreeze the remaining 1 mg/mL DNase at -80°C .

Procedure

In addition to the labeled cells, stain an aliquot of unlabeled cells for use as a negative control.

To stain the cells:

1. (Optional) Stain cell surface antigens.
 - a. Add BrdU-pulsed cells (10^6 cells in 50 μL of staining buffer) to 12 x 75-mm tubes.
 - b. Add fluorescent antibodies specific for cell-surface markers in 50 μL of staining buffer (eg, BD Pharmingen Stain Buffer [FBS] Catalog No. 554656) per tube and mix well.

- c. Incubate cells with antibodies for 15 minutes on ice.
 - d. Wash cells by adding 1 mL of staining buffer per tube, centrifuge for 5 minutes at 200 to 300g, and discard the supernatant.
2. Fix and permeabilize the cells with BD Cytotfix/Cytoperm Buffer.
 - a. Resuspend the cells in 100 μ L of BD Cytotfix/Cytoperm Buffer per tube.
 - b. Incubate the cells for 15 to 30 minutes at room temperature or on ice.
 - c. Wash the cells with 1 mL of 1X BD Perm/Wash Buffer. Centrifuge for 5 minutes at 200 to 300g, and discard the supernatant.

Note: The presence of some precipitate in the 10X BD Perm/Wash stock buffer is common. The precipitate will not affect the performance of the buffer. If desired, you can remove the precipitate prior to use by filtering the diluted 1X BD Perm/Wash Buffer through a 0.45- μ m-pore filter.

3. Incubate the cells with BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus.
 - a. Resuspend the cells in 100 μ L of BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus per tube.
 - b. Incubate the cells for 10 minutes on ice.
 - c. Wash the cells in 1 mL of 1X BD Perm/Wash Buffer (as in step 2c).

4. Re-fix cells.
 - a. Resuspend the cells in 100 μ L of BD Cytofix/Cytoperm Buffer per tube.
 - b. Incubate the cells for 5 minutes at room temperature or on ice.
 - c. Wash the in 1 mL of 1X BD Perm/Wash Buffer (as in step 2c).
5. Treat cells with DNase to expose incorporated BrdU.^{24,25}
 - a. Resuspend the cells in 100 μ L of diluted DNase (diluted to 300 μ g/mL in DPBS) per tube, (ie, 30 μ g of DNase/ 10^6 cells).
 - b. Incubate cells for 1 hour at 37°C.
 - c. Wash the cells in 1 mL of 1X BD Perm/Wash Buffer (as in step 2c).
6. Stain BrdU and intracellular antigens with fluorescent antibodies.
 - a. Resuspend the cells in 50 μ L of BD Perm/Wash Buffer containing diluted fluorescent anti-BrdU and/or antibodies specific for intracellular antigens.
 - b. Incubate the cells for 20 minutes at room temperature.
 - c. Wash the cells in 1 mL of 1X BD Perm/Wash Buffer (as in step 2c).

Note: Proceed to [step 8](#) if you do not wish to stain for total DNA levels.

7. Stain total DNA for cell cycle analysis. Resuspend the cells in 20 μ L of the 7-AAD solution.
8. Resuspend the cells in 1 mL of staining buffer.

9. Acquire stained cells on a flow cytometer. For optimal resolution, acquire using a low flow rate. Run at a rate no greater than 400 events per second.

Samples may be stored overnight at 4°C, protected from light, prior to analysis by flow cytometry.

4

Instrument setup

This section covers the following topics:

- [Instrument setup guidelines \(page 28\)](#)
- [FITC BrdU instrument setup example \(page 29\)](#)
- [APC BrdU instrument setup example \(page 32\)](#)

Instrument setup guidelines

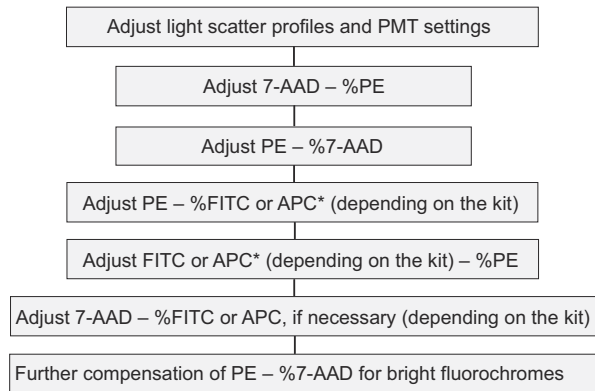
Introduction

The information in the following instrument setup sections is intended as an example of the type of setup necessary for samples stained using the BrdU staining procedure. [FITC BrdU instrument setup example \(page 29\)](#) is specific to the BD Pharmingen FITC BrdU Flow Kit (Catalog No. 559619) and [APC BrdU instrument setup example \(page 32\)](#) applies to the BD Pharmingen APC BrdU Flow Kit (Catalog No. 552598).

The instrument adjustments required might vary between instruments and between individual samples in a given experiment. It is often necessary to make further adjustments for different combinations of fluorescent-conjugated antibodies. We recommend that you refer to a textbook on flow cytometry or on cell-cycle analysis by flow cytometry for more information.^{26,27}

Cytometer setup flow chart

The following flow chart shows you the general steps involved in instrument setup.



*Typically little or no compensation is necessary between PE and APC.

FITC BrdU instrument setup example

Experiment details

Mouse S-phase T cells were labeled with 10 μM of BrdU for 1 hour. The cells were processed according to the BrdU Flow Kit protocol. The samples were stained with FITC anti-BrdU, 7-AAD, and a PE-labeled surface marker.

Note: PE was included to illustrate the amount of compensation necessary when including PE in the experiment. If you do not use PE, proceed directly to [Adjusting the BrdU/7-AAD profile \(page 32\)](#).

Adjusting scatter and PMTs

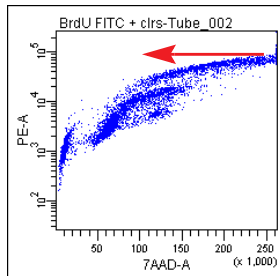
To adjust scatter and PMTs:

1. Adjust the FSC vs SSC parameters so that the cell populations are on scale.
2. Adjust the PMTs so that the negative populations fall between channels 10^2 and 10^3 .

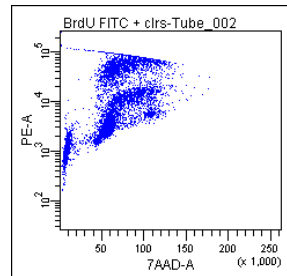
Adjusting compensation for 7-AAD and PE

To adjust compensation for 7-AAD and PE:

1. Adjust 7-AAD-%PE to bring the PE signal to the left (setting is ~ 209).

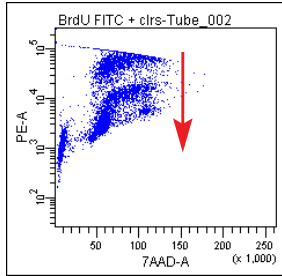


uncompensated 7-AAD-%PE

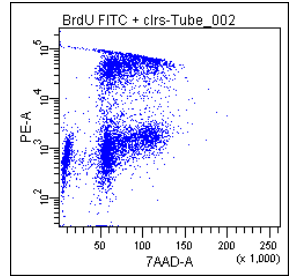


compensated 7-AAD-%PE

2. Adjust PE-%7-AAD to bring the PE signal down (setting is ~3.0).

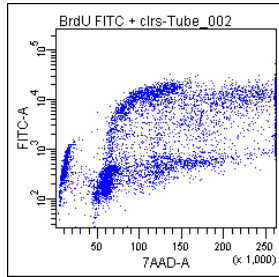


uncompensated PE-%7-AAD

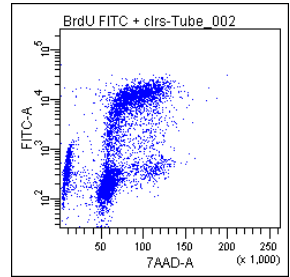


compensated PE-%7-AAD

The BrdU plot gets adjusted from the 7-AAD-%PE and PE-%7-AAD compensation adjustments. The following uncompensated plot is an example of how the data appears when PE is included.



uncompensated 7-AAD vs FITC

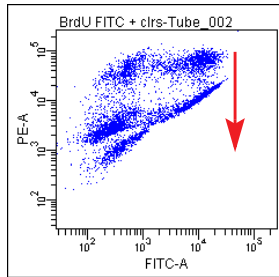


compensated 7-AAD vs FITC

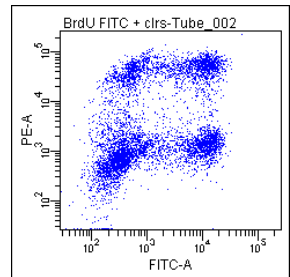
Adjusting compensation for PE and FITC

To adjust compensation for PE and FITC:

1. Adjust PE-%FITC to bring the FITC signal down (setting is ~65.4).

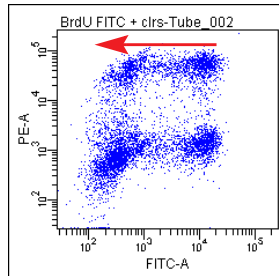


uncompensated PE-%FITC

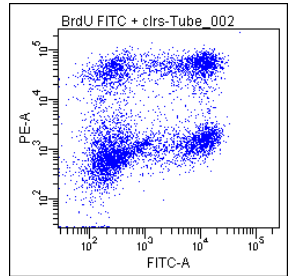


compensated PE-%FITC

2. Adjust FITC-%PE to bring the PE signal slightly to the left (setting is ~0.4).



uncompensated FITC-%PE



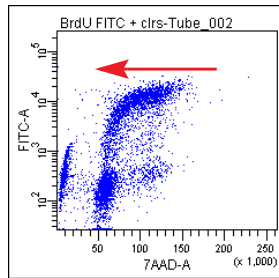
compensated FITC-%PE

Adjusting the BrdU/7-AAD profile

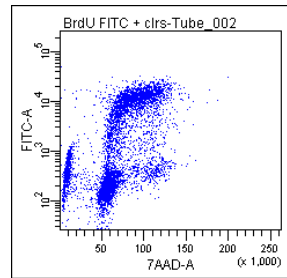
Start here if you stained using only the contents of the FITC BrdU Flow Kit with no additional drop-in antibodies.

To adjust compensation for 7-AAD and FITC:

1. Adjust 7-AAD-%FITC to bring the FITC signal to the left (setting is ~88).



uncompensated 7-AAD-%FITC



compensated 7-AAD-%FITC

APC BrdU instrument setup example

Initial instrument settings

When staining cells with anti-BrdU APC, the initial setup is similar to the FITC anti-BrdU conjugate shown in the previous section. Shown here are cells stained with APC anti-BrdU, 7-AAD, and a PE-labeled surface marker. The important difference here is that APC anti-BrdU is detected with a separate laser.

Note: PE was included to illustrate the amount of compensation necessary when including PE in the experiment. If you do not use PE, proceed directly to [Adjusting the BrdU/7-AAD profile \(page 34\)](#).

Adjusting scatter and PMTs

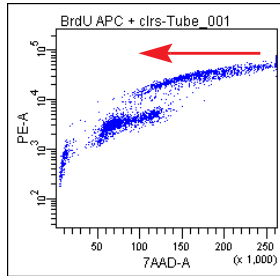
To adjust scatter and PMTs:

1. Adjust the FSC vs SSC parameters so that the cell populations are on scale.
2. Adjust the PMTs so that the negative populations fall between channels 10^2 and 10^3 .

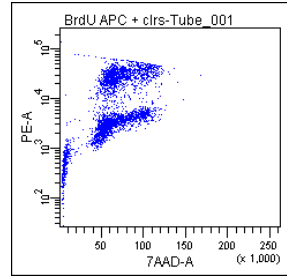
Adjusting compensation for PE and 7-AAD

To adjust compensation for PE and 7-AAD:

1. Adjust 7-AAD-%PE to bring the PE signal to the left (setting is ~ 308).

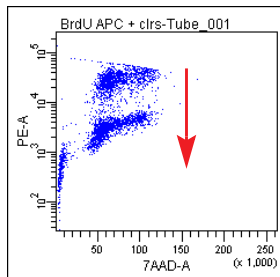


uncompensated 7-AAD-%PE

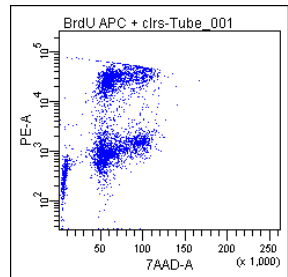


compensated 7-AAD-%PE

2. Adjust PE-%7-AAD to bring the PE signal down (setting is ~ 0.5).

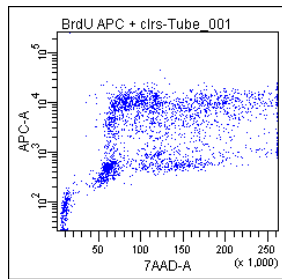


uncompensated PE-%7-AAD

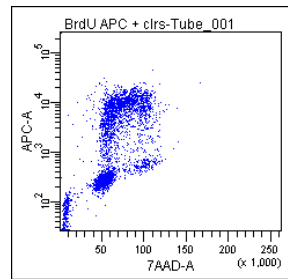


compensated PE-%7-AAD

The BrdU plot gets adjusted from the 7-AAD-%PE and PE-%7-AAD compensation adjustments. The following uncompensated plot is an example of how the data appears when PE is included.



uncompensated 7-AAD vs APC



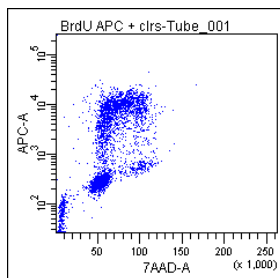
compensated 7-AAD vs APC

Adjusting the BrdU/7-AAD profile

Start here if you stained using only the contents of the APC BrdU Flow Kit with no additional drop-ins.

To adjust compensation for 7-AAD and APC:

1. If the APC is very bright, adjust compensation between 7-AAD and APC. The following plot looks correct without compensation. The compensation settings for 7-AAD-%APC and APC-%7-AAD are both 0.



uncompensated 7-AAD vs APC

5

Analysis

This section covers the following topics:

- [Analysis of stained cell samples \(page 36\)](#)

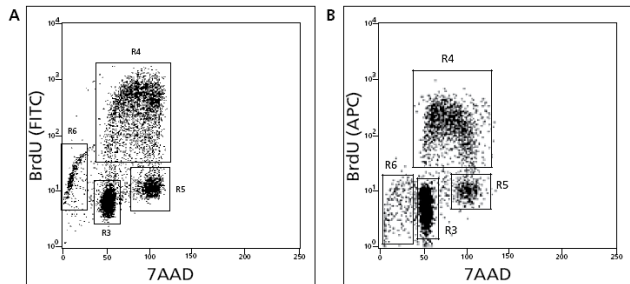
Analysis of stained cell samples

Introduction

Some of the data presented in the following examples was acquired using a flow cytometer equipped with a 488-nm laser, which excites FITC, PE, and 7-AAD. When staining with fluorochromes such as APC, flow cytometers with an additional laser light source were used. With the addition of each different fluorochrome used for multicolor staining, it becomes more critical to properly compensate overlaps in detection of emitted fluorescence signals. Fluorescence signals from 7-AAD are typically acquired in the linear signal amplification mode, whereas fluorescence signals generated by other fluorochromes are acquired in a logarithmic mode.

BrdU and total DNA staining

The cell cycle positions and DNA synthetic activities of cells can be determined by analyzing the correlated expression of total DNA and incorporated BrdU levels.



Regions for the quantitative cell cycle analysis of populations that have been stained for incorporated BrdU and total DNA levels.

Region	Cell population
R3	G0/G1
R4	S phase
R5	G2 + M
R6	apoptotic

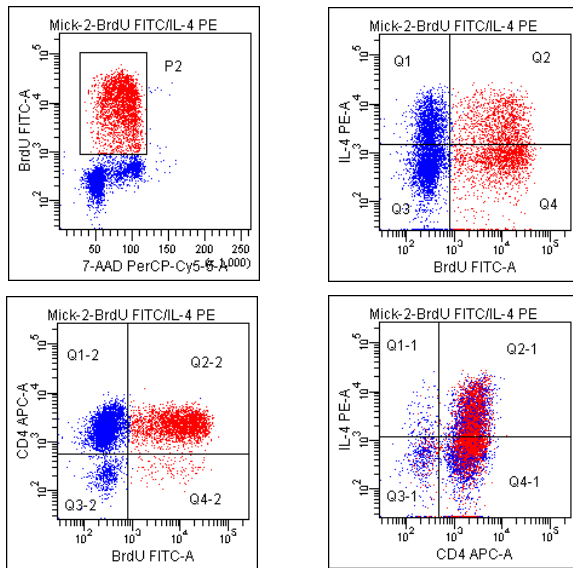
Plot A: The measurement of cell-incorporated BrdU (with anti-BrdU FITC) and total DNA content (with 7-AAD) in D10.G4.1 cells. The D10.G4.1 cells were cultured with 10 μ M of BrdU for 30 minutes. As shown by the regions applied to the 7-AAD vs BrdU dot plot, flow cytometric analysis of cells stained with the reagents provided in the BrdU Flow Kit allowed for the discrimination of cell subsets that were apoptotic—defined as sub-G0/G1 (R6, 5.6% of cells) or resided in G0/G1 (R3, 38.6%), S (R4, 38.6%), or G2 + M (R5, 14.4%) phases of the cell cycle and had recently synthesized DNA.^{5,6} The 7-AAD signal data is displayed on a linear scale, as shown on the x-axis.

Plot B: The measurement of cell-incorporated BrdU (with anti-BrdU APC) and total DNA content (with 7-AAD). Human PBMCs were stimulated with immobilized anti-human CD3 antibody, clone HIT3a, 10 μ g/mL for plate coating (Catalog No. 555336), soluble anti-human CD28 antibody, clone CD28.2 at 2 μ g/mL (Catalog No. 555725), recombinant human IL-2 at 10 ng/mL (Catalog No. 554603), and recombinant human IL-4 at 20 ng/mL (Catalog No. 554605) for 2 days. The cells were then washed and subsequently expanded for 3 days in culture with medium containing recombinant IL-2 and IL-4. Finally the cells were harvested and restimulated for 4 hours with PMA (Sigma, Catalog No. P-8139, 5 ng/mL) and

ionomycin (Sigma, Catalog No. I-0634, 500 ng/mL). Twenty micromoles of BrdU was added for the final hour. Regions are as in figure A with R6 being apoptotic (3.31%), R4 S phase (23.5%), R3 G0/G1 (64.3%), and R5 G2 + M (6.1%).

Sample data using the FITC BrdU Flow Kit protocol

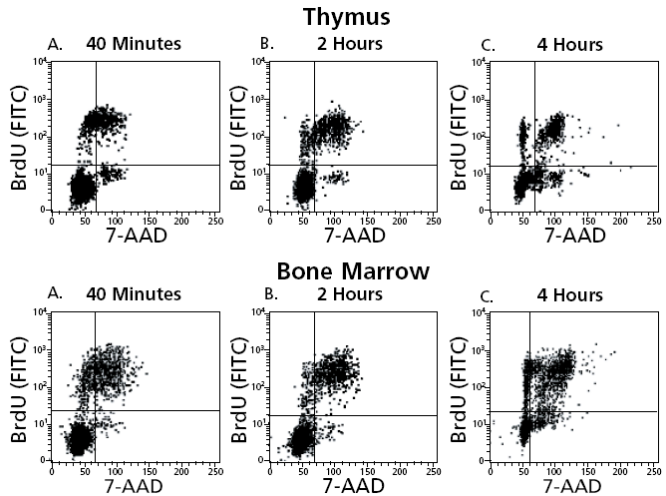
Spleen cells from a BALB/c mouse were primed *in vitro* and restimulated with PMA, ionomycin, and Brefeldin A (a protein transport inhibitor to promote intracellular cytokine accumulation). During the final 1 hour of culture, the cells were pulsed with 50 μ M of BrdU. The cells were then harvested and stained with anti-BrdU FITC, 7-AAD, anti-mouse IL-4 PE, and anti-mouse CD4 APC. The plots depict two-color staining patterns generated from the reanalyzed flow cytometric data for these cells.



Multicolor flow cytometric analysis of stimulated mouse spleen cells that synthesized DNA and/or produced IL-4.

BrdU time-course study

C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with 1 mg of BrdU for various time intervals. The animals were sacrificed at 40 minutes, 2 hours, or 4 hours post injection. Thymus and bone marrow cells were removed and stained for BrdU and 7-AAD.



Time-course study of *in vivo* BrdU pulsing in mice.

Plots A show bone marrow and thymus cells obtained from mice that were pulsed with BrdU for 40 minutes. Notice the characteristic BrdU/7-AAD “horseshoe” fluorescence staining profile. Plots B show staining patterns for bone marrow and thymus cells from mice pulsed for 2 hours. The characteristic horseshoe pattern is present. In addition, a population of cells that have incorporated BrdU but reside in the G0/G1 compartment is discernible (ie, BrdU-positive cells without increased 7-AAD content). Plots C show bone marrow and thymus cells from mice pulsed for 4 hours. The profile now shows a large population of BrdU-positive cells that are

in G0/G1. The characteristic BrdU/7-AAD horseshoe pattern is much less discernible.

6

Reference

This section covers the following topic:

- [References \(page 42\)](#)

References

Cited publications

1. Sasaki K, Murakami T, Takahashi M. Flow cytometric analysis of cell proliferation kinetics using the anti-BrdUrd antibody. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1989;16:2338-2344.
2. Miltenburger HG, Sachse G, Schliermann M. S-phase cell detection with a monoclonal antibody. *Dev Biol Stand*. 1987;66:91-99.
3. Vanderlaan M, Thomas CB. Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry*. 1985;6:501-505.
4. Gratzner HG, Leif RC. An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*. 1981;1:385-393.
5. Lacombe F, Belloc F, Bernard P, Boisseau MR. Evaluation of four methods of DNA distribution data analysis based on bromodeoxyuridine/DNA bivariate data. *Cytometry*. 1988;9:245-253.
6. Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW. Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet*. 1984;17:427-436.
7. Toba K, Winton EF, Bray RA. Improved staining method for the simultaneous flow cytofluorometric analysis of DNA content, S-phase fraction, and surface phenotype using single laser instrumentation. *Cytometry*. 1992;13:60-67.
8. Sasaki K, Adachi S, Yamamoto T, Murakami T, Tanaka K, Takahashi M. Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry*. 1988;9:93-96.

9. Lakhanpal S, Gonchoroff NJ, Katzmann JA, Handwerger BS. A flow cytofluorometric double staining technique for simultaneous determination of human mononuclear cell surface phenotype and cell cycle phase. *J Immunol Meth.* 1987;96:35-40.
10. Houck DW, Loken MR. Simultaneous analysis of cell surface antigens, bromodeoxyuridine incorporation and DNA content. *Cytometry.* 1985;6:531-538.
11. Moran R, Darzynkiewicz Z, Staiano-Coico L, Melamed MR. Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. *J Histochem Cytochem.* 1985;33:821-827.
12. Holm M, Thomsen M, Høyer M, Hokland P. Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdUrd incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. *Cytometry.* 1998;32:28-36.
13. Mehta BA, Maino VC. Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Meth.* 1997;208:49-59.
14. Endl E, Steinbach P, Knüchel R, Hofstädter F. Analysis of cell cycle-related Ki-67 and p120 expression by flow cytometric BrdUrd-Hoechst/7AAD and immunolabeling technique. *Cytometry.* 1997;29:233-241.
15. Dolbear F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:5573-5577.

16. Penit C. In vivo thymocyte maturation. BrdU labeling of cycling thymocytes and phenotypic analysis of their progeny support the single lineage model. *J Immunol.* 1986;137:2115-2121.
17. Thoman ML. Early steps in T cell development are affected by aging. *Cell Immunol.* 1997;178:117-123.
18. Tough DF, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med.* 1994;179:1127-1135.
19. von Boehmer H, Hafen K. The life span of naive alpha/beta T cells in secondary lymphoid organs. *J Exp Med.* 1993;177:891-896.
20. Schittek B, Rajewsky K, Forster I. Dividing cells in bone marrow and spleen incorporate bromodeoxyuridine with high efficiency. *Eur J Immunol.* 1991;21:235-238.
21. Rocha B, Penit C, Baron C, Vasseur F, Dautigny N, Freitas AA. Accumulation of bromodeoxyuridine-labeled cells in central and peripheral lymphoid organs: minimal estimates of production and turnover rates of mature lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1990;20:1697-1708.
22. Westermann J, Ronneberg S, Fritz FJ, Pabst R. Proliferation of lymphocyte subsets in the adult rat: a comparison of different lymphoid organs. *Eur J Immunol.* 1989;19:1087-1093.
23. Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G, Salmon P. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell.* 1996;87:483-492.
24. Carayon P, Bord A. Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated into the DNA. *J Immunol Meth.* 1992;147:225-230.

25. Gonchoroff NJ, Katzmann JA, Currie RM, Evans EL, Houck DW, Kline BC, Greipp PR, Loken MR. S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J Immunol Meth.* 1986;93:97-101.
 26. Shapiro H M, Practical Flow Cytometry, 3rd Edition, Wiley-Liss, New York.
 27. Gray JW, Darzynkiewicz Z, Eds, Techniques in cell cycle analysis, Humana Press, Clifton, New Jersey.
-

United States

877.232.8995

Canada

866.979.9408

Europe

32.2.400.98.95

Japan

0120.8555.90

Asia/Pacific

65.6861.0633

Latin America/Caribbean

55.11.5185.9995



**Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences**

2350 Qume Dr.

San Jose, CA 95131 USA

(US) Ordering 855.236.2772

Technical Service 877.232.8995

Fax 800.325.9637

answers@bd.com

bdbiosciences.com

Vedlegg.9

Rådata: primer og probe optimalisering

Tabell.9A viser rådata fra primer optimalisering

Brønn	Ct-verdi
A1	22,17
A2	24,25
A3	20,84
A4	20,71
A5	20,82
A6	20,98
A7	20,79
A8	20,67
A9	20,73
A10	20,95
A11	0
B1	21,32
B2	20,94
B3	20,95
B4	21,12
B5	20,71
B6	20,7
B7	21,43
B8	21,07
B9	21,22
B10	21,53
B11	0
C1	22,89
C2	21,04
C3	21,5
C4	20,72
C5	20,62
C6	20,62
C7	20,5
C8	20,75
C9	20,89
C10	21,28
C11	0
D1	21,64
D2	21,12
D3	20,79
D4	20,94
D5	20,93
D6	20,64
D7	20,79
D8	20,72
D9	20,74
D10	20,85

D11	0
E1	21,89
E2	20,98
E3	20,99
E4	20,88
E5	21,14
E6	20,94
E7	20,85
E8	20,89
E9	0
E10	20,88
E11	0

Tabell B9 viser rådata fra probe optimalisering

Brønn	Ct-verdi
A1	18,34
A2	17,97
A3	18,02
A4	18,12
A5	19
A6	19,96
A7	19,9
A8	21,91
A9	0
A10	21,14
A11	21,53
A12	20,55
B1	18,41
B2	17,38
B3	17,64
B4	18,92
B5	19,01
B6	19,83
B7	20,63
B8	20,64
B9	19,74
B10	21,23
B11	20,02
B12	21,18
C1	0

Vedlegg.10

Rådata: Assay validering - standardkurve

Brønn	Ct	Ct mean	SD avvik	Δ Ct 10fold	Δ Ct mean
B7	18,87	18,65	0,22		3,402
B8	18,43				
C7	22,4	22,34	0,06	3,69	
C8	22,28				
D7	25,83	25,67	0,16	3,33	
D8	25,51				
E7	29,67	29,36	0,31	3,69	
E8	29,05				
F7	32,66	32,24	0,42	2,88	
F8	31,82				
G7	35,63	35,66	0,03	3,42	
G8	35,69				

Brønn	Ct	Ct mean	SD avvik	Δ Ct 10fold	Δ Ct mean
B7	18,38	18,405	0,025		3,403
B8	18,43				
C7	21,83	21,65	0,18	3,245	
C8	21,47				
D7	24,89	24,825	0,065	3,175	
D8	24,76				
E7	28,01	27,99	0,02	3,165	
E8	27,97				
F7	31,22	31,34	0,12	3,35	
F8	31,46				
G7	35,34	35,42	0,08	4,08	
G8	35,5				

STDkurve1		STDkurve2	
TCID50	TCID50	TCID50	TCID50
10 ⁵	18,405	10 ⁵	18,65
10 ⁴	21,65	10 ⁴	22,34
10 ³	24,825	10 ³	25,67
10 ²	27,99	10 ²	29,36
10 ¹	31,34	10 ¹	32,24
10 ⁰	35,42	10 ⁰	35,66

Tabell.10A viser verdier for STDkurve2

Standard	TCID50	TCID50eq	Brønn	Ct	Ct mean
Standard1	100000	10 ⁵	B7	18,87	18,65
			B8	18,43	
Standard2	10000	10 ⁴	C7	22,4	22,34
			C8	22,28	
Standard3	1000	10 ³	D7	25,83	25,67
			D8	25,51	
Standard4	100	10 ²	E7	29,67	29,36
			E8	29,05	
Standard5	10	10 ¹	F7	32,66	32,24
			F8	31,82	
Standard6	1	10 ⁰	G7	35,63	35,66
			G8	35,69	

Tabell.10B viser verdier for STDkurve1

Standard	TCID50	TCID50eq	Brønn	Ct	Ct mean
Standard1	100000	10 ⁵	B7	18,38	18,405
			B8	18,43	
Standard2	10000	10 ⁴	C7	21,83	21,65
			C8	21,47	
Standard3	1000	10 ³	D7	24,89	24,825
			D8	24,76	
Standard4	100	10 ²	E7	28,01	27,99
			E8	27,97	
Standard5	10	10 ¹	F7	31,22	31,34
			F8	31,46	
Standard6	1	10 ⁰	G7	35,34	35,42
			G8	35,5	

Intraassay variasjon

Fortynning	TCID50	RNA kopier/ml
10 ⁰	10 ⁵	4,2 * 10 ⁷
10 ⁻¹	10 ⁴	4,2 * 10 ⁶
10 ⁻²	10 ³	4,2 * 10 ⁵
10 ⁻³	10 ²	4,2 * 10 ⁴
10 ⁻⁴	10 ¹	4,2 * 10 ³
10 ⁻⁵	10 ⁰	4,2 * 10 ²

STD1		
Mean	StdDEV	CV
18,405	0,025	0,00
21,65	0,18	0,01
24,825	0,065	0,00
27,99	0,02	0,00
31,34	0,12	0,00
35,42	0,08	0,00

STD2		
Mean	StdDev	CV
18,65	0,22	0,01
22,34	0,06	0,00
25,67	0,16	0,01
29,36	0,31	0,01
32,24	0,42	0,01
35,66	0,03	0,00

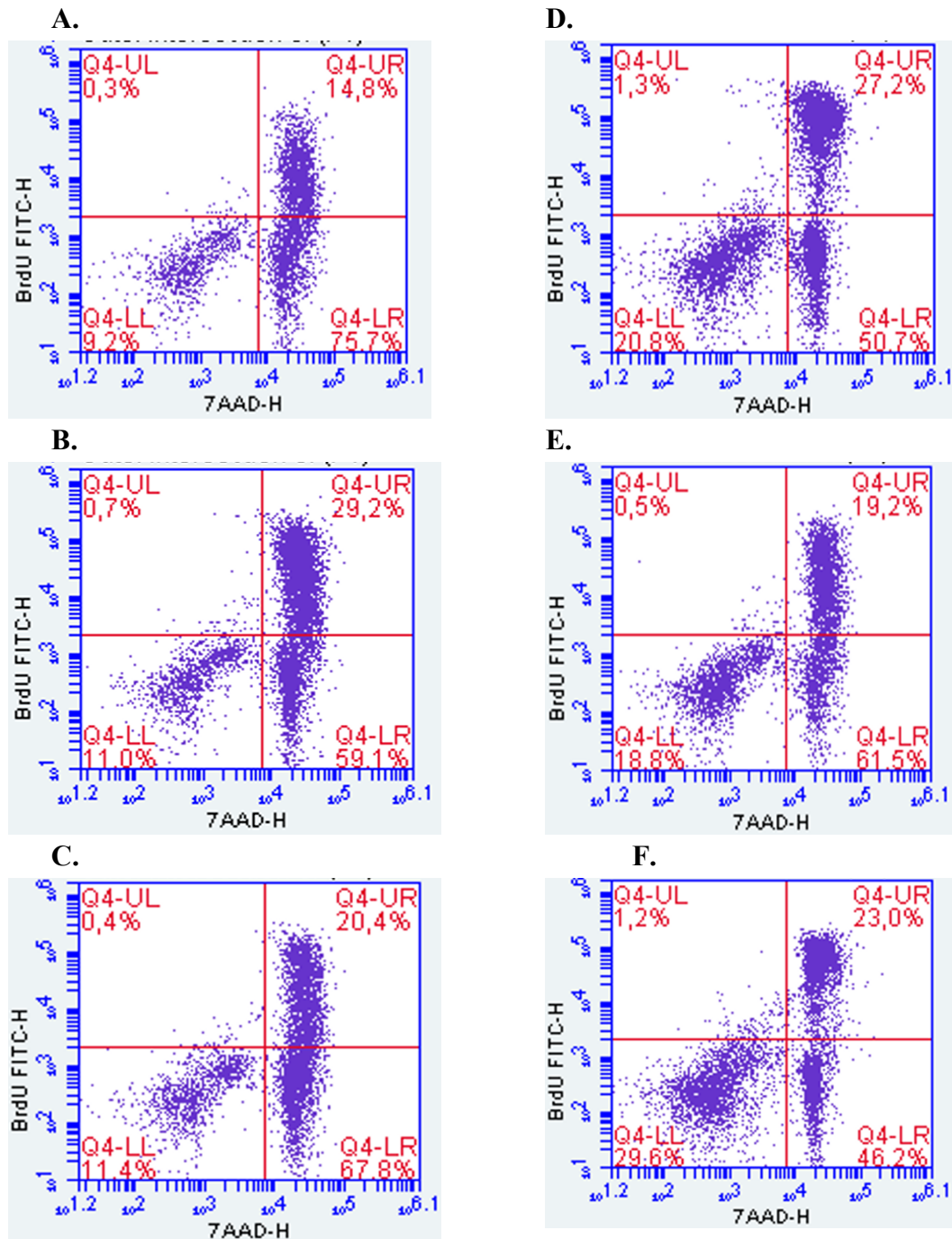
Intraassay variasjon

Mean	SD	CV
18,53	0,12	0,01
22,00	0,35	0,02
25,25	0,42	0,02
28,68	0,68	0,02
31,79	0,45	0,01
35,54	0,12	0,00

CV = SD / Mean	STD1		STD2	
	CV	% CV	CV	CV %
	0.00	0,14	0.01	1,18
	0.01	0,83	0.00	0,27
	0.00	0,26183283	0.01	0,62329568
	0.00	0,07	0.01	1,06
	0.00	0,38	0.01	1,30
	0.00	0,23	0.00	0,08

Vedlegg.11

Flowcytometri data



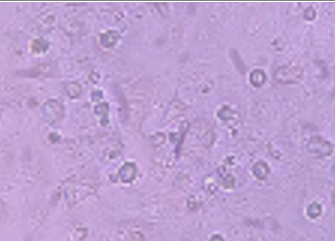
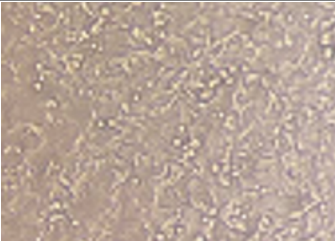
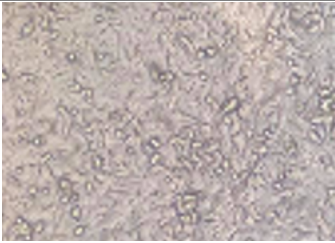
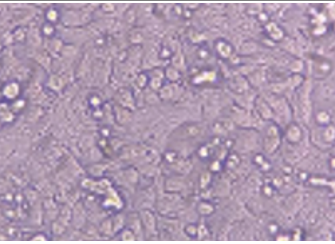
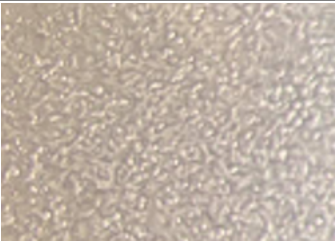
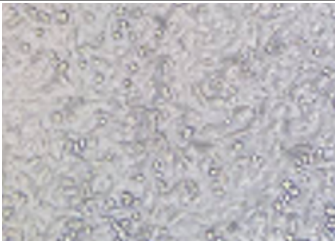
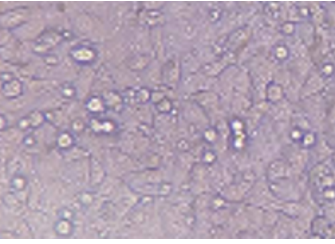
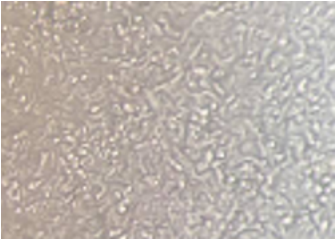
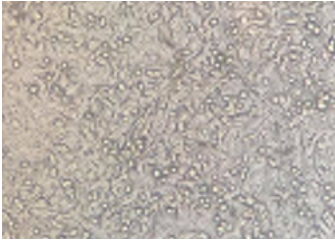
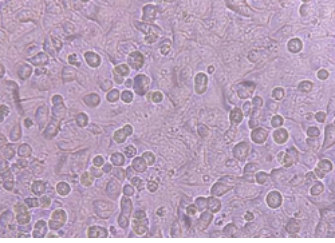
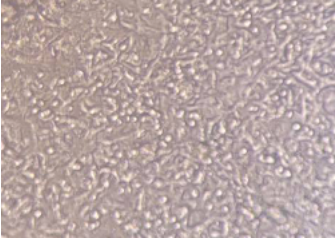
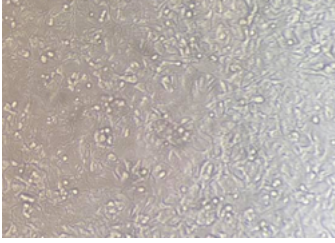
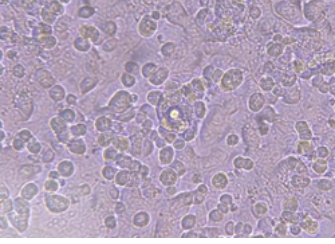
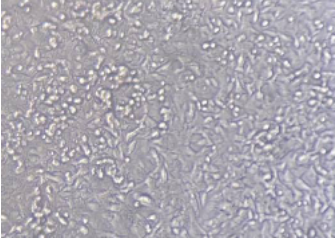
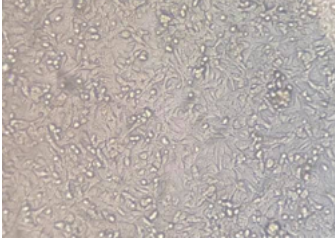
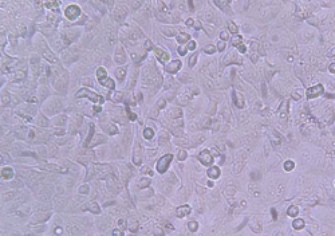
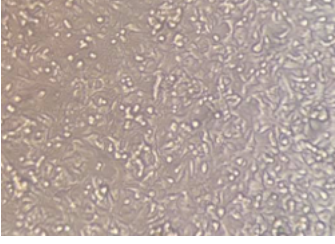
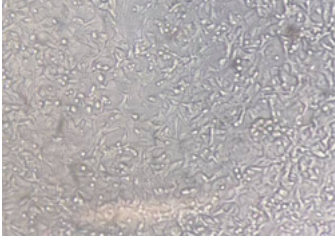
Figur. 11A viser de ulike resultatene fra proliferasjonstest presentert som dotplatt.

- A. Viser A549 dyrket i normalt medium (14, 8 %)
- B. Viser A549 tilsatt 0,01 mM SA til dyrkingsmediet (29,2 %)
- C. Viser A549 tilsatt 0,1 mM SA til dyrkingsmediet (20,4 %)
- D. Viser A549 tilsatt 1,0 mM SA til dyrkingsmediet (27, 2 %)
- E. Viser A549 tilsatt 10 mM SA til dyrkingsmediet (19,2 %)
- F. Viser A549 tilsatt 100 mM SA til dyrkingsmediet (23,0 %)

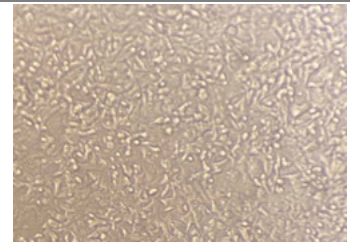
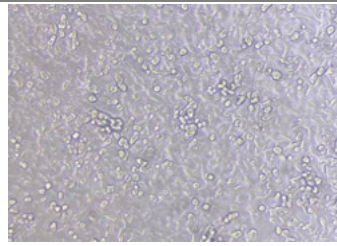
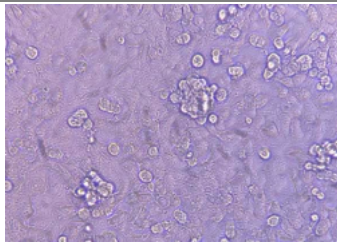
Vedlegg.10

In vitro celleforsøk - negative kontroll

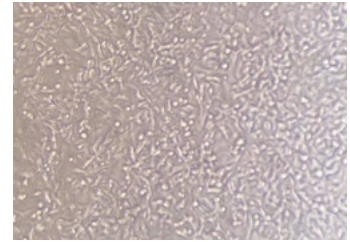
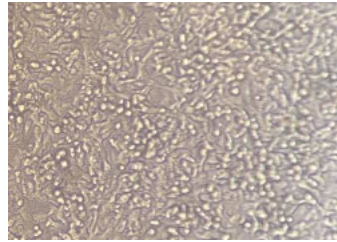
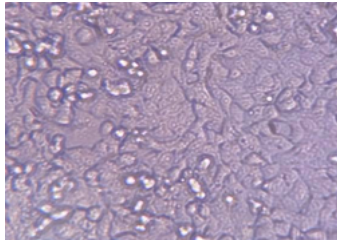
In vitro celleforsøk.1

Flaske	48t	72t	96t
1 - E1			
2 - E2			
1 - F1			
2 - F2			
1 - G1			
2 - G2			

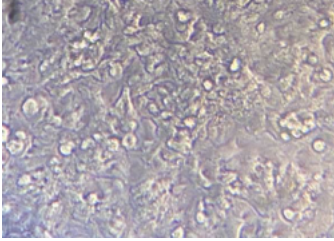
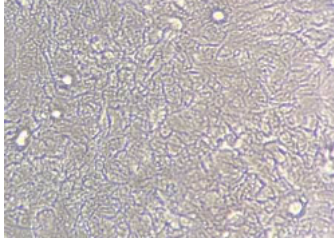
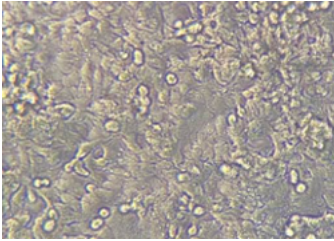
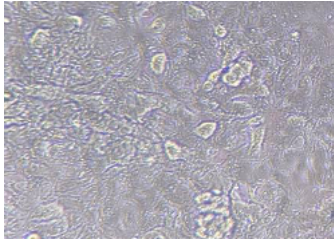
1 – H1



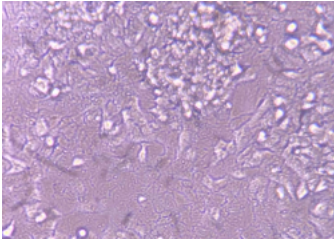
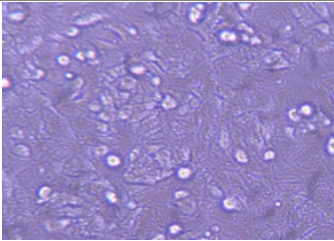
2 – H2



In vitro celleforsøk.2

Flaske	48t	72t
A1		
A2		

In vitro celleforsøk.3

Flaske	24t
A1	
A2	

Vedlegg.13

Rådata: *In vitro* celleforsøk og t-test

Tabell.13A viser Ct-verdiene registrert for prøvene ved *in vitro* celleforsøk.1

Flaske	C _t – verdi		
	48t	72t	96t
1 – A1	30,74	31,04	29,54
2 – A1	30,41	30,61	29,3
1 – A2	31,09	30,74	29,81
2 – A2	30,93	30,95	29,94
1 – B1	31,36	31,2	28,94
2 – B1	32,22	31,15	28,6
1 – B2	31,94	30,36	28,95
2 – B2	31,52	30,5	29,2
1 – C1	29,51	30,11	28,77
2 – C1	29,85	29,46	28,86
1 – C2	28,22	29,93	27,12
2 – C2	0	30,01	27,3
1 – D1	30,01	28,66	28,5
2 – D1	29,99	28,88	28,52
1 – D2	30,08	29,88	29,17
2 – D2	29,92	30,77	28,74

Tabell.13B viser Ct-verdiene registrert for prøvene ved *in vitro* celleforsøk.2

Flaske	C _t – verdi		
	24t	48t	72t
1 – B1	37,02	32,44	27,59
2 – B1	0	31,71	26,89
1 – B2	37,21	30,98	27,99
2 – B2	37,4	31,69	27,44
1 – C1	36,67	30,89	26,11
2 – C1	35,45	31,06	25,58
1 – C2	37,52	30,29	26,48
2 – C2	0	29,82	26,27
1 – D1	37,31	31,8	27,37
2 – D1	37,12	31,95	27,25
1 – D2	0	31,68	26,7
2 – D2	0	32,46	26,51
1 – E1	35,98	30,33	25,44
2 – E1	35,31	30,34	25,41

1 – E2	36,41	30,2	24,43
2 – E2	35,78	30,23	24,53
1 – F1	34,31	28,45	24,12
2 – F1	33,64	28,24	23,7
1 – F2	35,57	26,27	23,14
2 – F2	37,96	26,51	22,65
1 – G1	32,06	25,98	22,57
2 – G1	32,71	25,96	22,43
1 – G2	32,91	27,8	22,82
2 – G2	32,93	27,8	22,59
1 – H1	34,59	26,71	23,45
2 – H1	34,95	26,77	23,26
1 – H2	35,53	27,74	23,43
2 – H2	35,21	27,4	23,59
1 – I1	32,12	25,58	21,4
2 – I1	31,67	25,64	21,69
1 – I2	33,14	26,2	21,32
2 – I2	33,69	26,01	21,57

Tabellen 13C viser t-test for *in vitro* celleforsøk.2

SA (mM)	SA (mM)	SD	T-test
0,0 24t	0,1 24t	15,9934091	0,97319555
0,0 24t	1,0 24t	18,0327736	0,63632922
0,0 24t	2,0 24t	12,0820843	0,44974007
0,1 24t	1,0 24t	17,8320347	0,42588331
0,1 24t	2,0 24t	12,0820843	0,42151679
1,0 24t	2,0 24t	15,7384382	0,21060356
0,0 48t	0,1 48t	0,78019228	0,03049142
0,0 48t	1,0 48t	0,44196825	0,47021599
0,0 48t	2,0 48t	2,60282419	0,01343955
0,1 48t	1,0 48t	0,83466966	0,03813667
0,1 48t	2,0 48t	0,37104582	0,41538591
1,0 48t	2,0 48t	0,87545613	0,00254071
0,0 72t	0,1 72t	0,77503125	0,0128005
0,0 72t	1,0 72t	0,45893218	0,5400941
0,0 72t	2,0 72t	1,33564591	0,17450391
0,1 72t	1,0 72t	0,54797211	0,4008621
0,1 72t	2,0 72t	0,70900348	0,36114678
1,0 72t	2,0 72t	1,08747414	0,36114678
0,0 24t	0,1 24t	1,80734223	0,05010384
0,0 24t	1,0 24t	1,20003125	0,75188889
0,0 24t	2,0 24t	1,87649774	0,01416124
0,1 24t	1,0 24t	0,34496377	0,0001254

0,1 24t	2,0 24t	0,61852521	0,99513975
1,0 24t	2,0 24t	1,35569862	0,00674552
0,0 48t	0,1 48t	0,98027978	0,68914174
0,0 48t	1,0 48t	0,7674379	0,81105622
0,0 48t	2,0 48t	1,04270981	0,12507486
0,1 48t	1,0 48t	0,72830282	0,43080841
0,1 48t	2,0 48t	0,84598223	0,07696509
1,0 48t	2,0 48t	0,73996516	0,00103103
0,0 72t	0,1 72t	0,5697313	0,11327441
0,0 72t	1,0 72t	0,40236022	0,93981898
0,0 72t	2,0 72t	1,036755	0,01092217
0,1 72t	1,0 72t	0,43459032	0,00202106
0,1 72t	2,0 72t	0,57169567	0,00599464
1,0 72t	2,0 72t	0,97762387	0,00056861

Tabell.13D viser t-test for de biologiske replikatene i *in vitro* celledyrkingsforsøk.2

SA (mM)	SA (mM)	SD	T-test
0,0 (1) 24t	0,0 (2) 24t	16,1385801	0,49982978
0,1 (1) 24t	0,1 (2) 24t	15,8422647	0,51526158
1,0 (1) 24t	1,0 (2) 24t	18,6076213	0,00162512
2,0 (1) 24t	2,0 (2) 24t	0,39541118	0,0282756
0,0 (1) 48t	0,0 (2) 48t	0,51626059	0,49127973
0,1 (1) 48t	0,1 (2) 48t	0,49277277	0,21310009
1,0 (1) 48t	1,0 (2) 48t	0,29726882	0,64711689
2,0 (1) 48t	2,0 (2) 48t	0,06103278	0,05292935
0,0 (1) 72t	0,0 (2) 72t	0,39429526	0,09969585
0,1 (1) 72t	0,1 (2) 72t	0,33294144	0,18664858
1,0 (1) 72t	1,0 (2) 72t	0,36134298	0,03157931
2,0 (1) 72t	2,0 (2) 72t	0,47393961	0,0437198
0,0 (1) 24t	0,0 (2) 24t	1,64807463	0,31933106
0,1 (1) 24t	0,1 (2) 24t	0,35273042	0,33876601
1,0 (1) 24t	1,0 (2) 24t	0,34496377	0,32820869
2,0 (1) 24t	2,0 (2) 24t	0,800453	0,20231649
0,0 (1) 48t	0,0 (2) 48t	0,98398107	0,07294731
0,1 (1) 48t	0,1 (2) 48t	0,91502732	0,00347876
1,0 (1) 48t	1,0 (2) 48t	0,43257947	0,15053266
2,0 (1) 48t	2,0 (2) 48t	0,25733004	0,15747042
0,0 (1) 72t	0,0 (2) 72t	0,55643396	0,02194371
0,1 (1) 72t	0,1 (2) 72t	0,13988835	0,13756397
1,0 (1) 72t	1,0 (2) 72t	0,11712707	0,53853588
2,0 (1) 72t	2,0 (2) 72t	0,1443087	0,12566592

Tabell.13E viser Ct-verdier registrert for prøvene ved *in vitro* celleforsøk.3

Flaske	C_t – verdi
	24t
1 – B1	27,96
2 – B1	27,48
1 – B2	26,54
2 – B2	27,55
1 – C1	26,38
2 – C1	26,66
1 – C2	25,05
2 – C2	24,97
1 – D1	27,71
2 – D1	27,95
1 – D2	27,43
2 – D2	27,85
1 – E1	27,82
2 – E1	27,42
1 – E2	28,18
2 – E2	28,09
1 – F1	27,97
2 – F1	28,08
1 – F2	27,02
2 – F2	27,18
1 – G1	27,53
2 – G1	27,39
1 – G2	27,48
2 – G2	27,54

Tabell.13F viser t-test for *in vitro* celleforsøk.3

SA (mM)	SA (mM)	SD	T-test
0	0,2	1,03898914	0,02101863
0	0,4	0,43047757	0,23214829
0	0,6	0,48992346	0,31452256
0	0,8	0,50480194	0,48628319
0	1	0,3734949	0,75010053
0,2	0,4	1,13122721	0,01545326
0,2	0,6	1,20400828	0,03902908
0,2	0,8	1,09801454	0,00207449
0,2	1	1,01571403	0,03323614
0,4	0,6	0,26052531	0,62595944
0,4	0,8	0,37292551	0,48271643
0,4	1	0,19111515	0,14440413
0,6	0,8	0,42581539	0,51510437

0,6	1	0,289717	0,07633878
0,8	1	0,33931687	0,81868333

Tabellen 13G viser t-test de biologiske replikatene i celledyrkingsforsøk.2

SA (mM)	SA (mM)	SD	T-test
0,0 (1)	0,0 (2)	0,51982569	0,53135728
0,2 (1)	0,2 (2)	0,76198753	0,07553203
0,4 (1)	0,4 (2)	0,19563998	0,28162418
0,6 (1)	0,6 (2)	0,29549746	0,18611405
0,8 (1)	0,8 (2)	0,47341182	0,02381957
1,0 (1)	1,0 (2)	0,05937171	0,70483276



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway