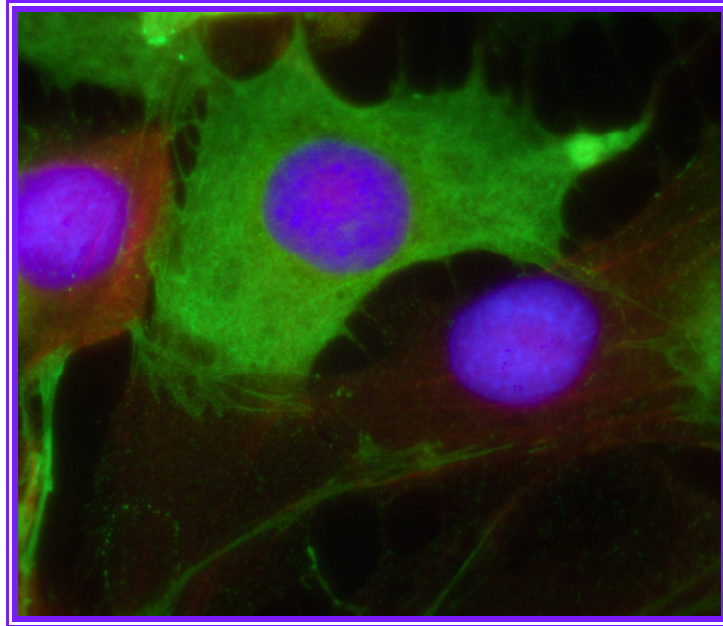


Produksjon av antiserum mot Norwegian salmonid alphavirus



av

Lene Stokka



Master i Fiskehelse

Institutt for Biologi

UNIVERSITETET I BERGEN

Forside: TO-celler smittet med salmonid alfavirus (SAV).

Forord

Først og fremst vil jeg takke mine to veiledere, Ragnhild Aakre Jakobsen og professor Heidrun I. Wergeland for en spennende oppgave samt god veiledning underveis. En stor takk rettes også til Paul Løvik for svært god hjelp på laboratoriet, samt Gyri T. Haugland, Anita Rønneseth og alle jeg har delt laboratoriet med, for gode råd og et flott arbeidsmiljø.

Videre vil jeg takke mine medstudenter. Uten dere hadde ikke skolehverdagen vært den samme. Spesielt vil jeg trekke frem Ewa, Susanne, Ulven og Ida Vilinn for noen flotte år på lesesalen. Dere har virkelig satt farge på en ellers grå skolehverdag. En ekstra takk rettes også til frokostgjengen, Benedicte og Stein. Jeg kommer til å savne disse morsomme morgenmøtene våre. Camilla og Signe dere er de beste samboerne noen kan ha, uten dere hadde ikke oppholdet i Bergen vært det samme.

En ekstra stor takk rettes også til Steffen for all tid du har benyttet på gjennomlesning av oppgaven og for gode tilbakemeldinger underveis i skriveprosessen. Videre vil jeg takke deg for noen flotte år sammen på HiB og jeg kommer til å savne ditt herlige vesen.

Helt til slutt vil jeg takke mamma, pappa, Linn, Hege, Anette, Ingvild, Sofie, Hilde og Marita for støtte gjennom mitt lange studieløp. Jeg er utrolig glad i dere og dere betyr utrolig mye for meg. Linn og Liv dere takkes også for gode tilbakemeldinger og for å ha tatt dere tid til gjennomlesning av oppgaven

Bergen, oktober 2012.

Lene Stokka

Sammendrag

Pankreassykdom (PD) er en infeksiøs virussykdom som rammer Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) i både saltvann og ferskvann i flere viktige lakseproduserende land. I studiet vårt var hensikten å produsere et antistoff mot SAV da det ikke eksisterer kommersielt tilgjengelig antistoff mot SAV på markedet i dag. Det ideelle er å immunisere med et rensset virus, men det lyktes ikke å få tilstrekkelig virusutbytte fra rensset virussupernatant. I dette studiet ble imidlertid SAV antigen funnet å være celleassosiert, og spesielt interessant ved analyser i SDS-PAGE var et protein ved 31 kDa. Sammenligning av proteinprofil til CP2 og usmittede TO-celler viser at dette proteinet ikke er et TO-protein. Samtidig samsvarer denne molekylvekten med hva andre har rapportert som det strukturelle kapsidprotein. Pelletterte celler fra virussupernatanten, kalt CP2, ble dermed benyttet til immunisering av kanin. Det polyklonale antiserumet, kanin anti-SAV, ble videre analysert i western blott og ELISA og som forventet inneholder serumet kryssreagerende antistoff mot TO-celle komponenter. Immunfluorescens ble benyttet for å undersøke spesifisiteten av antistoffet og viser en sterk reaksjon mot smittede celler i forhold til usmittede TO-celler, noe som indikerer at antistoffet er reaktivt med virus. Ved å videre absorbere serumet med TO-celler kan det være mulig at antiserumet får tilfredsstillende spesifisitet til bruk for påvisning av SAV i ulike tester.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
1.1. Salmonid alfavirus (SAV)	1
1.1.1. Smitte	2
1.1.2. Klinikk og patologi	3
1.2. Alfavirus (<i>Togaviridae</i>)	3
1.2.1. Viruskarakteristikk	4
1.2.2. Replikasjon	6
1.3. Laksens immunforsvar	9
1.3.1. Det uspesifikke immunforsvar	10
1.3.2. Det spesifikke immunforsvaret	10
1.3.3. Den antivirale immunresponsen	12
1.4. Immunrespons mot SAV3	13
1.5. Hensikt med studiet	14
2. Material og metode	15
2.1. Celleproduksjon	15
2.2. Virusproduksjon	15
2.3. Bestemmelse av virustiter	17
2.3.1. $TCID_{50}$	17
2.3.2. Plakk assay	18
2.4. Isolering av virusprotein fra supernatant	19
2.4.1. Proteinrensing	20
2.4.2. Konsentrasjonsbestemmelse av proteiner i supernatant	20
2.4.3. Oppkonsentrering av proteiner ved frysetørking	21
2.5. Analyse av proteiner	22
2.5.1. SDS-PAGE	22
2.5.2. Native-PAGE	23
2.5.3. Fargemetoder	24
2.5.4. Western blott	24
2.5.5. Smitteforløp i TO-celler smittet med virussupernatant	26
2.5.6. Smitteforløp i TO-celler smittet med CP2	26
2.6. Immunisering av kanin og absorpsjon av antiserum	27

2.7. Immundeteksjon	28
2.7.1. <i>ELISA</i>	28
2.7.2 <i>Immunfluorescens</i>	29
3. Resultat	31
3.1. Virusproduksjon	31
3.2. Bestemmelse av virustiter	32
3.3. Isolering av virusprotein fra supernatant.....	32
3.4. Konsentrasjonsbestemmelse av virusprotein	34
3.5. Analyse av celleassosiert protein	35
3.6. Immunisering av kanin.....	37
3.7. Analyse av TO-celler smittet med CP2.....	38
3.8. Immundeteksjon	40
3.8.1. <i>ELISA</i>	40
3.8.2. <i>Reaktivitet mellom kanin anti-TO og smittede TO-celler</i>	42
3.8.3. <i>Reaktivitet mellom kanin anti-SAV og smittede TO-celler</i>	43
4. Diskusjon	44
4.1. Dyrking av virus.....	44
4.2. Rensing av virus fra supernatant	45
4.3. Celleassosiert virusprotein	46
4.4. Produksjon av antiserum	47
4.5. Konklusjon og fremtidsaspekter.....	48
5. Referanser	49
6. Vedlegg	59
6.1. Oppskrifter på løsninger benyttet i dette masterarbeidet	62
6.2. Protokoll proteindialyse	71

1. Innledning

Det norske oppdrettseventyret startet på midten av 70-tallet da man lyktes i å intensivere produksjonen av oppdrettslaks. Siden den gang har oppdrettsnæringen eskalert, men samtidig støtt på flere utfordringer, spesielt relatert til ulike sykdommer og patogener. På 80- og begynnelsen av 90-tallet var det bakterielle sykdommer som skapte store utfordringer for næringen, men takket være gode vaksiner er dette nesten ikke et problem i dag. Denne suksessen har derimot ikke vært like vellykket når det gjelder vaksiner mot virus sykdommer. Det finnes flere kommersielt tilgjengelig virusvaksiner på markedet i dag, blant annet mot infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV, *Infectious pancreatic necrosis virus*), infeksjøs lakseanemi virus (ILAV, *Infectious salmon anemia virus*), infeksjøs hematopoietisk nekrose virus (IHNV, *Infectious haematopoietic necrosis virus*), og salmonid alfavirus (SAV). Disse vaksinerne har vist seg å ha en begrenset effekt i forhold til det man ser hos vaksiner mot bakterielle sykdommer (Sommerset et al., 2005). Grunnen er at virus er obligat intracellulære og både en spesifikk humoral og cellulær immunrespons må stimuleres av vaksinen for å få en immunologisk hukommelse, mens ekstracellulære organismer først og fremst må stimulere den spesifikke humorale immunresponsen. I Norge har spesielt IPNV og ILAV vært ansett som problemskapende virus, men i de senere år har også SAV blitt ansett som et stort problem, da det forårsaker store økonomiske tap for oppdrettere. Det observeres årlig en økning i antall sykdomsutbrudd, i 2005 ble det påvist 45 nye tilfeller av SAV i Norge, i 2007 ble det påvist 98 nye tilfeller og i 2012 er det hittil i år registrert 104 nye sykdomstilfeller (Lillehaug et al., 2012).

1.1. Salmonid alfavirus (SAV)

Pankreassykdom (PD) er en infeksjøs sykdom forårsaket av salmonid alfavirus. Viruset forårsaker sykdom hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) i både saltvann og ferskvann (McLoughlin og Graham, 2007). PD ble først beskrevet fra oppdrettslaks i Skottland i 1984, men har vært kjent siden 1976 (Munro et al., 1984). Siden den første beskrivelsen har det blitt rapportert om sykdomsutbrudd i flere viktige lakseproduserende land som Irland, Frankrike og Norge (Christie et al., 1998, McLoughlin og Graham, 2007, Villoing et al., 2000). Det er også rapportert om ett tilfelle av PD-utbrudd i

Innledning

Nord-Amerika, men viruset ble aldri isolert, og PD ansees i dag som et europeisk problem (McLoughlin og Graham, 2007).

Salmonid alfavirus er per i dag det eneste alfaviruset som er kjent for å infisere fisk (Karlsen et al., 2010a). Sekvensanalyser av SAV indikerer at det finnes 6 ulike subtyper (Hodneland et al., 2005, Fringuelli et al., 2008), som er basert på full genomisk sekvensering av SAV1-3 og delvis sekvensering av de resterende, SAV4-6 (Fringuelli et al., 2008). SAV1 (salmon pancreas disease virus) infiserer Atlantisk laks i sjøvannsfasen i Irland og Skottland (Nelson et al., 1995, Rowley et al., 1998, Weston et al., 2005). SAV2 forårsaker ”sleeping disease” (SD) i ferskvann og er i hovedsak kjent fra Frankrike, Spania, England, Skottland, Italia og Tyskland (McLoughlin og Graham, 2007). Den samme subtypen har i senere tid også blitt isolert fra Atlantisk laks i sjøvannsfasen i Skottland (Fringuelli et al., 2008) og nylig også i Norge. Sekvensering av SAV2 funnet i Norge viser stor likhet med det som man har funnet i sjøvannsfasen i Skottland, og man antar derfor at det har blitt importert til Norge fra Skottland (Lillehaug et al., 2012). I Norge ble salmonid alfavirus isolert for første gang i 1998. Dette viruset viste en kryssreaksjon med et SAV1 isolat fra Irland, noe som indikerte at det enten var samme, eller et nært beslektet virus (Christie et al., 1998). Viruset viste seg å være nært beslektet og fikk tilnavnet ”Norwegian salmonid alphavirus” (NSAV), i dag kjent som SAV3. Denne subtypen forekommer per i dag kun i Norge (Hodneland et al., 2005). SAV4 er i likhet med SAV1 funnet i Skottland og Irland, SAV5 i Skottland og SAV6 i Irland (Fringuelli et al., 2008, Graham et al., 2011).

1.1.1. Smitte

Flere studier på smitteruten til SAV har blitt utført, og disse indikerer at horisontal smitte mellom lokaliteter er den viktigste smitteruten og det er vist at viruset kan overleve lange perioder i sjøvann (Fringuelli et al., 2008, Karlsen et al., 2006, Kristoffersen et al., 2009). Vertikal smitte, som er overføring av agens fra foreldre til avkom gjennom kjønnsprodukter, er vist eksperimentelt for SAV3 (Bratland og Nylund, 2009). Disse resultatene er ikke gjenskapt i feltforsøk (Kongtorp et al., 2010), men SAV3 har blitt funnet og sekvensert fra laksesmolt i ferskvann (Nylund et al., 2003). Etersom de fleste alphavirus krever en artropod vektor for å overføres til en ny vert (Chamberlain, 1980) kan det tenkes at SAV har en lignende mekanisme for overføring som inkluderer lakselus, *Lepeophtheirus salmonis* og

skottelus, *Caligus elongatus*. Nylig ble det vist at lusen, *Lepidophthirus macrorhini* kan fungere som vektor for et alfavirus kalt "southern elephant seal virus" (SESV) (Linn et al., 2001). Det er også undersøkt om lakselus kan være en mulig vektor for SAV3 ved hjelp av real time-PCR (RT-PCR). SAV3 ble detektert i lakselus som hadde parasittert på SAV-infisert fisk, men det er fortsatt uvisst om viruset kan replikere i lusen, eller om den fungerer som en mekanisk vektor (Karlsen et al., 2006, Petterson et al., 2009). Det er også vist at salmonid alfavirus kan replikere i ikke-salmonide cellelinjer som indikerer at ikke-salmonid fisk kan infiseres og fungere som vilt reservoar (Graham et al., 2008). Dette ble nylig bekreftet da SAV5 RNA ble detektert fra sandflyndre (*Limanda limanda*), gapeflyndre (*Hippoglossoides platessoides*) og rødspette (*Pleuronectes platessa*), men rollen disse har ved en eventuell smitteoverføring er fortsatt uviss (Graham et al., 2012, Snow et al., 2010).

1.1.2. Klinikk og patologi

PD rammer primært smolt i deres første leveår i sjø, og tap av opp mot 50 % av fisken har vært observert, men dødelighet mellom 1 og 20 % er mer normalt (Jansen et al., 2010, McLoughlin og Graham, 2007). Kliniske tegn assosiert med PD-utbrudd er en økning i fôrintak før appetitten opphører og fisken blir anorektisk. Fisken blir også letargisk og får vanskeligheter med å opprettholde posisjonen i vannet samt at det observeres abnormal svømmeatferd hvor fiskene samler seg i hjørnene eller langs notveggen i merden (Ferguson et al., 1986a). Makroskopiske tegn som ascites og petekkier på pylorusblindsekkene og lever er vanlig å finne. Histopatologisk ser man ofte degenerert eksokrin pankreas, og varierende grad av myopati i hjerte- og skjelettmuskulatur (Poppe et al., 1989, McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007, Hodneland et al., 2005).

1.2. Alfavirus (Togaviridae)

Etiologien til PD var ukjent inntil viruset for første gang ble isolert i 1995 av Nelson et al. (1995). Før isoleringen ble det spekulert i om PD var en mangelsykdom, spesielt i forbindelse med vitamin E eller selen (Bell et al., 1987, Ferguson et al., 1986b, Munro et al., 1984). I dag er etiologien til PD velkjent (McLoughlin et al., 2002), og sykdomsutbruddene forårsakes av SAV, et virus i slekten *Alphavirus*, som sammen med *Rubivirus* er de eneste slektene i

Innledning

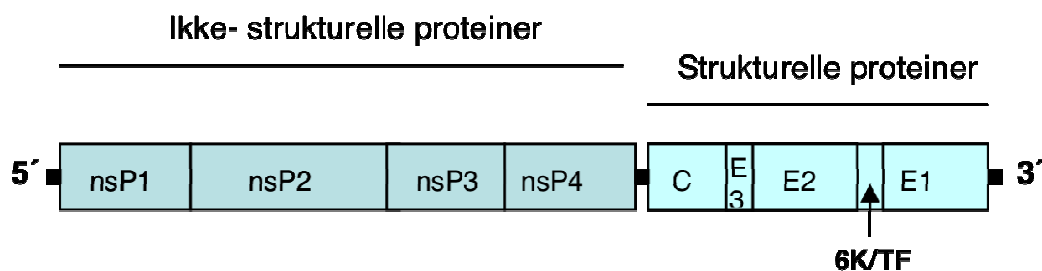
Togaviridae-familien (Schlesinger og Schlesinger, 2001). Disse deler lik genomisk oppbygning (Koonin og Dolja, 1993), men det stilles spørsmålstegn ved deres slektskap på grunn av ulikheter i smittevei (Kuhn, 2007). Alfavirus består hittil av 29 ulike arter (Gould et al., 2010), og de fleste klassifiseres som arbovirus (arthropod borne virus) da de benytter artropoder som vektor, i hovedsak *Aedes* og *Culex* (Chamberlain, 1980). Imidlertid har det vist seg at også andre blodsugende artropoder som lus og midd, kan overføre virus (Strauss og Strauss, 1994).

Alfavirus er i dag distribuert i alle verdensdeler (Linn et al., 2001), og basert på geografisk distribusjon og sykdomskarakteristikk deles medlemmene av alfavirus inn i enten "New world" virus eller "Old world" virus. "New world" virus forårsaker blant annet hjernehinnebetennelse hos mennesker (Powers et al., 2001) og er vidt distribuert i Amerika, mens "Old world" virus ofte er assosiert med revmatiske sykdommer og er utbredt i Europa, Asia, Australia, store deler av Afrika, New Zealand og Sør Amerika (Linn et al., 2001, Strauss og Strauss, 1994). Det er foreslått at alfavirus har oppstått i "New world" og senere migrert enten via vert eller vektor til resten av verden (Levinson et al., 1990). Basert på fylogenetiske studier utgjør SAV en egen evolusjonær gruppe som skilte seg fra andre alfavirus før "New world" og "Old World" virusene oppstod (Karlsen et al., 2010b, Powers et al., 2001).

1.2.1. Viruskarakteristikk

SAV har et kappekledd virion med en størrelse på ca. 65 nm (Nelson et al., 1995). Hvert virion består av et positivt ladd enkelttrådet RNA-genom assosiert med 240 kopier av kapsidproteinene, som sammen utgjør nukleokapsidet (Paredes et al., 1993). Nukleokapsidet er omringet av en plasmamembran (kappen) som har samme fosfolipidsammensetning som vertscellens plasmamembran (Garoff et al., 2004). Ankret i denne er det 80 overflateutløpere og hver enkelt av disse er satt sammen av tre heterodimerer av de virale glykoproteinene E2 og E1. Dette gir totalt 240 heterodimerer som sammen med kapsidproteinene i nukleokapsidet er organisert i en T=4 ikosahedrisk struktur og interagerer med hverandre med en 1:1 ratio som gir virionet et sfærisk utseende (Cheng et al., 1995, Strauss og Strauss, 1994).

Da genomet er et positivt enkeltrådet RNA genom fungerer det direkte som mRNA. I genomets 5'-ende finner man en cap (Ahola og Kaariainen, 1995), og i 3'-ende en polyadenylert hale (Kuhn, 2007). Genomet er ikke-segmentert og består av to åpne leserammer (ORF) som koder for ikke-strukturelle og strukturelle proteiner, som utgjør henholdsvis 2/3 og 1/3 av genomet (Strauss og Strauss, 1994). For SAV er den første ORFen omtrent 7,8 kb lang og koder for de ikke-strukturelle proteinene nsP1, nsP2, nsP3 og nsP4. Den andre ORFen er omtrent 4 kb lang og koder for de strukturelle proteinene kapsid, E3, E2, 6K/TF og E1 (figur 1). De to leserammene er flankert av tre ikke-oversatte-regioner (NTR), én i 5'- og 3'-ende, samt én i overgangen mellom de to leserammene. Lokalisert i NTR finner vi hos alfavirus fire separate sekvenser (CSE) som spiller en viktig rolle i virusreplikasjon og transkripsjon: CSE1, lokalisert i 5'-NTR, antas å fungere som promotor for syntese av de positive trådene under replikasjon ved å bruke den negative tråden som templat. CSE2, også lokalisert i 5'-enden av genomet, men i det kodende område for nsP1, antas å ha en viktig rolle i syntesen av den komplementære (-)RNA-tråden. CSE3 er lokalisert i overgangen mellom leserammene og fungerer som en subgenomisk promotor for transkripsjon av den strukturelle ORF. CSE4, lokalisert i 3'-NTR, antas å fungere som ko-promotor for initiering av komplementær (-) negativ RNA-tråd (Jose et al., 2009).

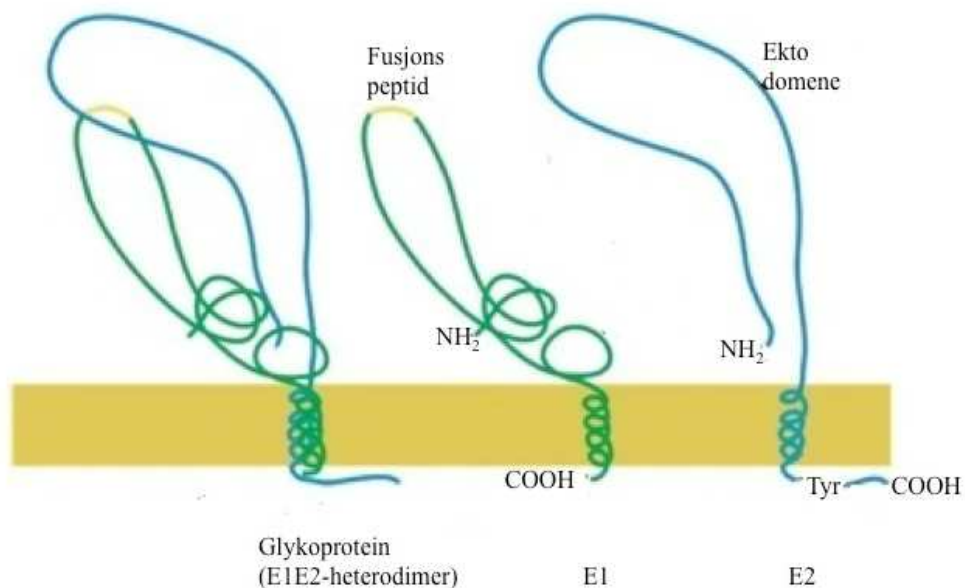


Figur 1. Skjematisk organisering av genomet til alfavirus. Genomet er ikke-segmentert og består av to åpne leserammer (ORF) som koder for ikke-strukturelle og strukturelle proteiner. De to leserammene er flankert av tre ikke-oversatte-regioner (NTR), én i 5'- og 3'-ende, samt én i overgangen mellom de to leserammene. Lokalisert i NTR finner vi hos alfavirus fire separate sekvenser (CSE) som spiller en viktig rolle i virusreplikasjon og transkripsjon. Modifisert figur (Berg, 2009)

Innledning

1.2.2. Replikasjon

Alfavirus binder seg på reseptorer på cellens overflate ved hjelp av epitoper på glykoproteinet E2, og fraktes inn i cellen ved reseptor mediert endocytose (RME) (Kuhn, 2007). Det vide artsspekteret til alfaviruset og de mange forskjellige målcellene til viruset betyr at alfavirus enten benytter en reseptor som er til stede på mange forskjellige celler, eller at viruset kan binde seg til flere forskjellige reseptorer (Andersen et al., 2007). Fusjonsaktiviteten, som sitter på E1, undertrykkes når man har interaksjon mellom E1 og E2 (Garoff et al., 1980), men når viruset har blitt endocytet vil et lysosom fra vertscellen smelte sammen med endosomet slik at det dannes et endolysosom, og man får en senkning i pH (Helenius et al., 1980). Lavere pH fører til en konformasjonsendring i E1E2-heterodimeren, som da dissosierer og fusjonssetet på E1 avdekkes (figur 2) (Garoff et al., 2004, Kielian og Helenius, 1985, Wahlberg og Garoff, 1992). Fusjoneringen fører til at nukleokapsidet frigjøres til cellens cytoplasma (Lanzrein et al., 1994).

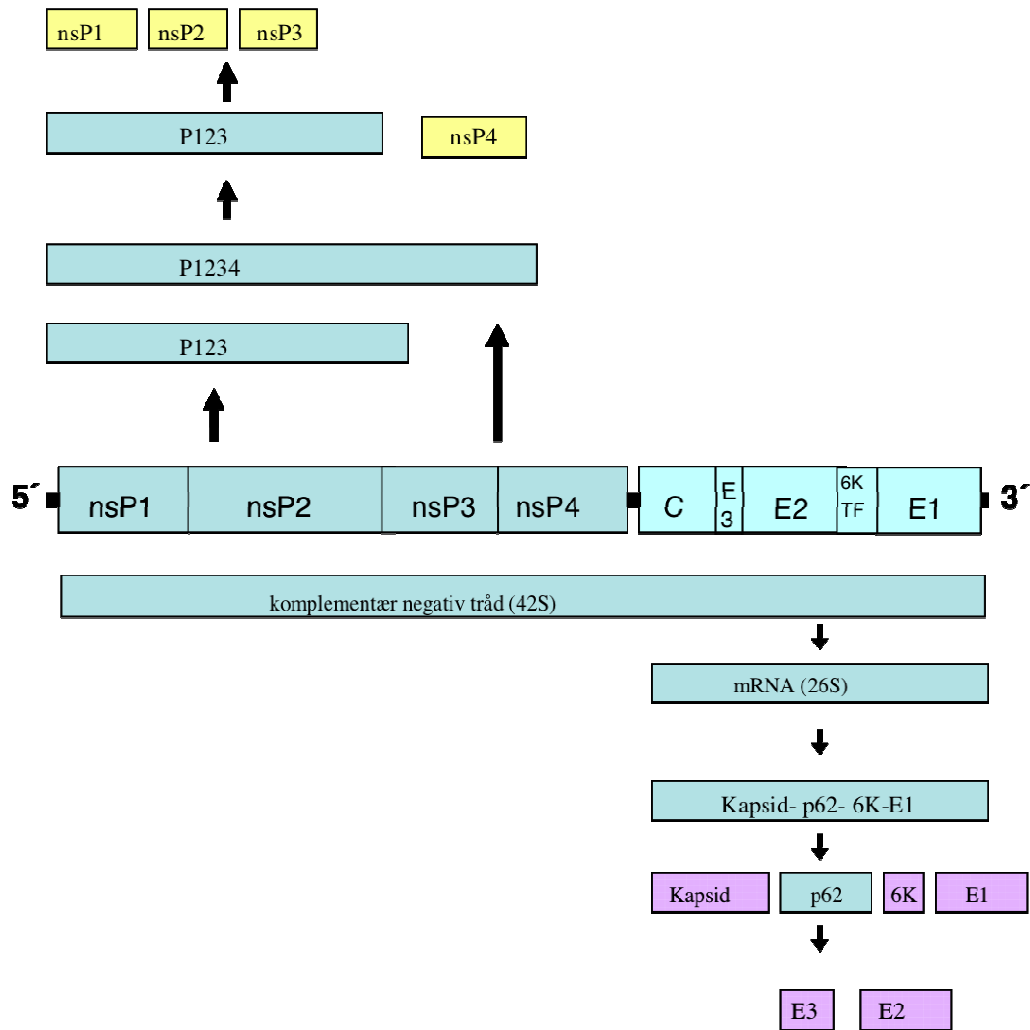


Figur 2. Skjematisk oversikt over interaksjon mellom E1 og E2. Fusjonsaktiviteten, som sitter på E1, undertrykkes når E1 og E2 interagerer med hverandre i en E1E2-heterodimer. Når viruset endocytteres og smelter sammen med et lysosom inne i cellen, vil det dannes et endolysosom. Den lave pH'en i endolysosomet fører til en konformasjonsendring i E1E2-heterodimeren, hvor heterodimeren dissosierer og fusjonssetet på E1 avdekkes. Modifisert figur (Garoff et al., 2004).

Inne i cytoplasma dissosierer nukleokapsidet og eksponerer genomet for ribosomene, og det virale genomet fungerer direkte som mRNA for syntese av de ikke-strukturelle proteinene (figur 3). Fra viralt RNA dannes det et polyprotein, P1234. Noen alfavirus har et opalt stoppkodon, UGA, mellom nsP3 og nsP4 som fører til produksjon av større mengder P123 enn P1234 (Strauss og Strauss, 1994), men et slikt stoppkodon er ikke blitt påvist hos SAV, hvor nsP3 slutter med aminosyren glycin, GGG (Hodneland et al., 2005). Ved syntese av polyprotein vil en proteaseaktivitet hos nsP2 føre til at nsP4 kløyves fra polyprotein og danner sammen med cellulære proteiner et (-)RNA replikasekompleks som transkriberer hele genomet til en komplementær, negativ RNA tråd, cRNA.

En tid etter infeksjon vil man få en opphopning av nsP2-protein og dette fører til at replikasjonskomplekset blir ustabil, på grunn av proteaseaktiviteten til nsP2 som kløyver polyprotein P123 videre til individuelle protein (Hardy og Strauss, 1989, Montgomery og Johnston, 2007). Disse går sammen med nsP4 samt cellulære proteiner og danner et nytt (+)RNA replikasjonskompleks som benytter komplementær cRNA tråd til å transkribere de positive trådene. For transkribering av nytt genomisk RNA fungerer CSE1 som promotor, mens for transkribering av subgenomisk RNA fungerer CSE3 som en subgenomisk promotor (Jose et al., 2009). Det subgenomiske (+)RNA koder for den strukturelle ORFen som også oversettes til et polyprotein bestående av kapsid-P62-6K-E1 (figur 3) (Strauss og Strauss, 1994). Kapsidprotein er det første som blir oversatt, og dette har i den C-terminale enden en protease som kløyver kapsidprotein fra polyprotein rett etter avlesning. Kapsidprotein vil assosieres med nytt viralt (+)RNA og danne et nytt nukleokapsid, mens de resterende strukturelle proteinene blir oversatt inn i endoplasmatisk retikulum (ER) (Garoff et al., 2004). Inne i ER blir P62 kløyvd fra E1 og 6K (Liljestrom og Garoff, 1991) og P62 blir videre kløyvd til E2 og E3. E2 og E1 danner dimere og fraktes gjennom golgiapparatet hvor de blir glykosylert før de fraktes videre ut på cellemembranen hvor de senere utgjør virusets glykoproteiner (Strauss og Strauss, 1994).

Innledning



Figur 3. Skjematisk fremstilling av genomet og replikasjonsyklus hos alfavirus. Virusets genom, som er positivt enkeltrådet, fungerer direkte som mRNA for dannelsen av polyprotein, P123 og/eller P1234. Noen alfavirus har et opalt stoppkodon, UGA, mellom nsP3 og nsP4 som fører til produksjon av større mengder P123 enn P1234, dette er ikke påvist for SAV. P123 sammen med nsP4 samt nsP1-4 utgjør replikasekomplekser for henholdsvis transkriberer en komplementær negativ tråd (42S) og en subgenomisk mRNA (26S) fra denne. Den subgenomiske mRNA (26S) tråden oversettes til et polyprotein som består av de strukturelle proteinene (Berg, 2009).

Det er beskrevet to ulike modeller for hvordan utførelsen av avknopping foregår hos alfavirus. En teori beskrevet av Garoff og Simons (1974) går ut på at kapsidproteinet pakker ferdig det virale (+)RNA genomet til et nytt nukleokapsid med T=4 struktur i cytoplasma. Nukleokapsidet diffunderer så til cellemembranen hvor avknoppingen initieres når nukleokapsidet binder seg til de virale glykoproteinene som er på utsiden av cellens plasmamembran. En annen modell beskriver et uferdig nukleokapsid, et såkalt C-RNA-

kompleks, som bindes til glykoproteinene i cellemembranen slik at nukleokapsidet og bindingen av glykoproteinene for avknopping av cellen ferdigstilles samtidig (Garoff et al., 2004). Det er hittil ikke blitt observert ferdig nukleokapsid i cytoplasma før avknopping, noe som tyder på at den sistnevnte modellen benyttes (Herath et al., 2012)

1.3. Laksens immunforsvar

Fiskens immunforsvar deles inn i en ikke-spesifikk del og en spesifikk del hvorav førstnevnte er representert hos alle levende organismer (Roberts, 2001). Teleoster representerer et viktig fylogenetisk veiskille mellom arter som kun besitter medfødt immunitet (*i.e.* evertebrater) og arter som i stor grad er avhengig av adaptiv immunitet (*i.e.* pattedyr) (Workenhe et al., 2010), selv om sistnevnte trolig er mindre utviklet hos teleoster sammenlignet med høyere vertebrater (Warr, 1995). Summen av forsvarskomponentene som er ansvarlige for immunforsvaret mot patogener er et komplekst samarbeid mellom de spesifikke og de uspesifikke mekanismene (Roberts, 2001).

Det uspesifikke immunforsvaret karakteriseres som fiskens førstelinjeforsvar mot invaderende mikroorganismer, og kjennetegnes ved at det er uavhengig av temperatur og mobiliseres raskt (fra minutt til timer/dager) (Magnadottir, 2006). For fisken, som har et poikilotermt levesett, er dette spesielt viktig da det spesifikke immunforsvaret er temperaturavhengig. Tar man utgangspunkt i Atlantisk laks som lever i de tempererte områdene av verden, kan antistoffproduksjonen ta fra 4-6 uker selv ved optimale temperaturer (Ellis, 2001). Den raske mobiliseringen av det uspesifikke immunforsvaret skyldes at det kan igangsettes uten å være tidligere eksponert for et patogen. Til dette benyttes ulike reseptorer, kalt ”pattern recognition receptors” (PRR) som skiller mellom ”selv” og ”ikke-selv” (Whyte, 2007). PRR kan enten være løselige komponenter eller uttrykt på fagocytter og andre celler i det medfødte immunforsvaret. Strukturene som gjenkjennes betegnes som ”pathogen associated molecular patterns” (PAMPs) og er strukturer som er essensielle for mikroorganismene, og er dermed vanskelig for mikroorganismene å forandre (Akira et al., 2006, Magnadottir, 2006).

Innledning

1.3.1. Det uspesifikke immunforsvaret

Det uspesifikke forsvaret består av en fysisk barriere, samt cellulære og humorale komponenter (Magnadottir, 2006). Mukosa og epitelceller i hud, gjeller og tarm er en viktig fysisk barriere som hindrer at patogener fester seg og/eller penetrerer huden (Basset et al., 2003). Leukocytene utgjør de cellulære komponentene og har morfologiske og funksjonelle likhetstrekk til de leukocytene man finner hos pattedyr (Plouffe et al., 2005, Workenhe et al., 2010). Disse cellene aktiveres via PRR som blant annet fører til økt opsonisering, aktivering av forskjellige komplement- og celsignaliseringsveier. Sistnevnte induserer transkripsjon av viktige humorale faktorer som veksthemmere (transferrin og interferoner), proteasehemmere (α 2-makromolekyl), lytiske enzymer (lysozyme, kitinaser), pentraxiner (C-reaktivt protein), komplement, cytokiner (interleukiner) og tumor nekrose faktor- α (TNF α) (Magnadottir, 2006, Watts et al., 2001).

Det er et bredt utvalg av celletyper involvert i den cellulære beskyttelsen hos fisk. Man finner fagocytterende celler (monocytter, makrofager), ikke-spesifikke cytotoksiske celler (NCC), polymorfonukleære granulocytter (nøytrofile, basofile og eosinofile), samt epitelceller og dendrittliknende celler (Neumann et al., 2001, Rabinovitch, 1995). De ikke-spesifikke cytotoksiske cellene (NCC) antas å være analoge til naturlig dreper (NK) celler funnet hos pattedyr (Moody et al., 1985) som dreper et bredt assortiment av målceller, inkludert kreftceller og virusinfisert celler (Whyte, 2007). Ved stimulering skiller NCC ut aktiveringssignaler slik at fagocytter raskt tiltrekkes infeksjonsstedet (Watts et al., 2001). Nylig er funksjonelle dendrittceller blitt demonstrert hos regnbueørret (Bassity og Clark, 2012). Dendrittceller er sammen med B-celler og makrofager profesjonelle antigenpresenterende celler (APC) da de uttrykker major histocompatibility complex (MHC) klasse II (Dixon og Stet, 2001).

1.3.2. Det spesifikke immunforsvaret

Det spesifikke immunforsvaret deles inn i en cellulær- og en humoral del som håndteres av en undergruppe av leukocytter kalt lymfocytter. Lymfocyttopulasjonen funnet hos teleoster er vist å være analog til den man finner hos pattedyr (Rubio-Godoy, 2010). T-lymfocytene utgjør den cellulære delen av det spesifikke immunforsvaret og deles videre inn i T-hjelpe

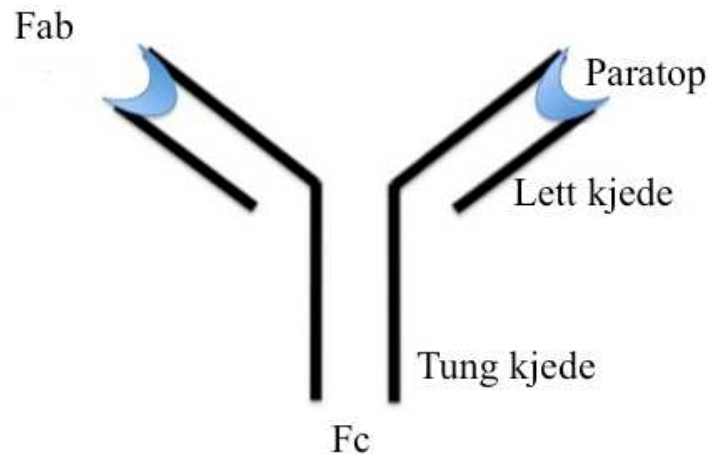
(T_H) celler og cytotoksiske T-celler (T_C). Karakteristisk for disse er at de uttrykker henholdsvis CD4 og CD8 glykoproteiner, samt at de kun responderer på epitoper uttrykt på kroppens egne celler. Den spesifikke humorale immuniteten medieres av antistoff (immunglobuliner) produsert av plasmaceller, som er aktiverte B-celler. B-cellen aktiveres via signaler mottatt fra T-celler eller andre celler som for eksempel makrofager (Bonilla og Oettgen, 2010). I motsetning til T-cellene kan B-cellene respondere på epitoper i løsnings via membranbundne immunoglobuliner (Mohanty, 2006). Denne forskjellen er vesentlig da T-cellene har i oppgave å overvåke det intracellulære rommet, mens B-cellenes oppgave er å overvåke det ekstracellulære rommet.

Naive T-lymfocytter gjenkjenner ikke løst antigen, men må presenteres for et antigen via major histocompatibility complex (MHC) reseptorer (Randelli et al., 2008). Dette er glykosylerte membranproteiner som binder bakterielle eller virale peptidfragmenter inne i cellen og frakter disse ut på cellen via en endogen eller eksogen syntese. Disse peptidfragmentene interagerer med membranbundne reseptorer på T-cellen (TCR) som fører til at T-cellen aktiveres. MHC reseptorene kommer i to utgaver: MHC klasse I som uttrykkes på de fleste cellene i kroppen og MHC klasse II som uttrykkes på de antigenpresenterende cellene (Dixon og Stet, 2001). T_H-celler fungerer som et viktig bindeledd mellom det uspesifikke og spesifikke immunforsvaret. Når disse cellene aktiveres produserer de og skiller ut interleukiner (IL), en form for cytokiner som fører til antistoffproduksjon hos B-lymfocytter og aktivering av blant annet T_C-celler (Swain, 2006). Celler infisert av intracellulære patogener presenterer antigenene peptidfragmenter via MHC klasse II til T_C-celler. Dette er en viktig dragskelle som dreper infiserte celler, men kun hvis TCR overensstemmer med MHC I samt peptidfragmentet som er uttrykt på målcellen (Fischer et al., 2006). Det er vist at Atlantisk laks oppregulerer gener for begge MHC-klassene i direkte respons på virus- eller bakterieinfeksjon (Koppang et al., 1999).

Teleostenes B-celler har i motsetning til pattedyrs B-celler fagocytisk aktivitet. Disse cellene produseres i hodenyren og kjennetegnes ved uttrykking av membranbundet immunglobulin (Ig). B-celler uttrykker i hovedsak IgM og da som membranbundet monomer (figur 4) og sekreterer løselig IgM som en tetramer (Li et al., 2006). Andre klasser av immunglobuliner rapportert fra fisk er IgD og IgT/IgZ (Hordvik et al., 1992, Hordvik, 2002, Tadiso et al., 2011). Immunglobuliner består av en Fab del hvor det antigenbindende setet (paratop) er lokalisert og en Fc del som er vist å koble sammen det adaptive immunforsvaret med viktige

Innledning

effektorsystemer i kroppen (Swain, 2006). Antistoff produsert mot et antigen resulterer i forsvarsmekanismer mot dette antigenet og antistoffmolekylene alene virker kun nøytraliserende mot mikroorganismer ved å binde seg til disse eller utskilte toksiner (Larosa og Orange, 2008).



Figur 4. Oppbygning av et monomerisk immunoglobulin. Ig består av to tunge og to lette kjeder. I Fab delen av immunoglobulinet finner man det antigenbindende setet, også kalt paratop. Fc delen kobler sammen det adaptive immunforsvaret med viktige effektorsystemer i kroppen

1.3.3. Den antivirale immunresponsen

Virus er obligat intracellulære mikroorganismer som krever vertcellens synteseapparat for selv å kunne replikere (Workenhe et al., 2010). Dette fører til at virusets byggesteiner etter hvert vil kunne oppdages da vertebrater har et sofistikert overvåkningsnettverk. De ulike sensorene som overvåker kroppen omtales som PRR og for virusgjenkjenning er det i hovedsak to hovedgrupper: cytosoliske proteiner (RIG-I og MDA5) og membranbundne reseptorer (Toll-liknende reseptorer, TLR) som aktiverer interferonsystemet (Zou et al., 2010). Interferoner spiller en viktig rolle i den uspesifikke antivirale immunresponsen da de fungerer som signalproteiner og produseres av de fleste cellene i kroppen i en direkte respons på virusinfeksjon (Robertsen, 2008).

Hos pattedyr er det hittil tre interferon familier som er kjent, type I IFN, type II IFN og IFN- γ (Robertsen, 2006). Viktigheten av type I IFN ble demonstrert i et forsøk utført av Muller et al. (1994) hvor mus som manglet IFN type I reseptorer hadde økt mottagelighet for virusinfeksjoner. Det er funnet flere likheter mellom interferonsystemet hos pattedyr og fisk. Hittil er det påvist tre subtyper av type-I interferon hos laks: IFNa, IFNb og IFNc og en subtype av type-II interferon (IFN- γ) (Sun et al., 2009, Robertsen, 2006). Type I interferoner sirkulerer i kroppen og beskytter andre celler fra å bli infisert ved å binde seg til interferon-reseptorer som resulterer i aktivering av transkripsjon av IFN-stimulerende gen (ISG) (Samuel, 2001). Noen av disse ISGene koder for proteiner med antiviral aktivitet, blant annet proteinene Mx, ISG15 og viperin (Gahlawat et al., 2009, Sun et al., 2011). INF- γ produseres kun av immunceller og er viktigere senere i det adaptive immunforsvaret da INF- γ produseres av T_H-celler og T_C-celler ved presentasjon av antigen via MHC (Robertsen, 2006). INF- γ er også vist å beskytte celler mot virusinfeksjon (Sun et al., 2011).

Cellemediert drap representerer de viktigste og mest effektive bidragene i kampen mot virusinfeksjoner. Hos fisk utføres dette av NCC og T_C-celler. NCC er viktige da de lyses infiserte celler uten tidligere å ha vært eksponert for antigenet (Evans og Cooper, 1990). T_C-celler gjenkjenner virale peptidfragmenter presentert via MHC I til TCR. Dette fører til at T_C-cellen dreper de infiserte cellene gjennom direkte celle-til-celle-kontakt (Nakanishi et al., 2002).

1.4. Immunrespons mot SAV3

En immunrespons mot SAV ble mistenkt da fisk som overlevde utbrudd av PD hadde en naturlig beskyttelse mot nye utbrudd av det samme viruset (McVicar, 1987). Houghton (1994) demonstrerte eksperimentelt at laks som overlevde PD-utbrudd var resistent mot påfølgende sykdomsutbrudd de neste 9 månedene. Mekanismene bak immuniteten mot SAV er ikke blitt studert i detalj, men studier har vist at produksjon av Mx mRNA oppreguleres som en respons på infeksjon med SAV (Gahlawat et al., 2009). Andre viktige antivirale protein som viperin og ISG15 er også vist å inhibere Sindbis-virus, et alfavirus som infiserer mennesker, og kan tenkes å spille en viktig rolle i inhibering av SAV (Larsen et al., 2004, Zhang et al., 2007). Det har også blitt vist at INF- γ har antiviral aktivitet mot SAV3 i salmonide celler (Sun et al., 2011).

Innledning

En viktig strategi for å unngå IFN respons hos noen medlemmer av "Old World" alfavirus er induksjon av transkripsjonell "shut off" (Garmashova et al., 2007) som blant annet fører til inhibering av en antiviral respons, T-celle respons og induksjon av apoptose (Ryman og Klimstra, 2008). Denne mekanismen er ikke kjent for SAV3, men man observerer allikevel en nedregulering av proteinsyntesen, dette er i tråd med hva som er observert hos "New World" virus, som fører til at produksjon av antivirale protein i en infisert celle hemmes (Xu et al., 2010).

1.5. Hensikt med studiet

Hensikten med dette studiet er å produsere antistoff mot SAV da dette er et viktig verktøy innen diagnostikk og forskning.

Delmål

- isolere virus som kan brukes som antigen
- lage kanin antiserum
- teste spesifisiteten av antiserumet

2. Material og metode

For å produsere antistoff mot et helt virus må det først dyrkes i en cellelinje. Viruset må isoleres og tilstedeværelsen av virusproteiner i det isolerte materialet må være tilstrekkelig for immunisering. I dette studiet ble proteiner analysert i SDS-PAGE og western blott for å undersøke forekomsten av virusprotein. Videre ble en kanin immunisert med antigenet, for å få i gang en produksjon av antistoff. Til slutt ble reaktiviteten av antistoffet undersøkt mot antigenet i ELISA og immunfluorescens.

2.1. Celleproduksjon

TO-celler passasje 87, med opphav fra hodenyreleukocytter hos Atlantisk laks ble benyttet i dette studiet (Wergeland og Jakobsen, 2001). Cellene ble først dyrket i 25 cm² Nunclon™ flasker til det var danneet et monolag, og deretter i 75 cm² Nunclon™ flasker. Celledyrkningsmediet bestod av 92,9 % (v/v) MEM (Minimum essential medium med Hank's balanced salt solution (HBSS) uten L-glutamin, BioWhittaker), 0,1 % (v/v) gentamicin sulphate 50 mg ml⁻¹ (BioWhittaker), 1 % (v/v) L-glutamine 200 mM (BioWhittaker), 5 % Fetal bovine serum (FBS) (BioWhittaker) og 1 % (v/v) 10 mM non essential amino acids (NEAA) (BioWhittaker). Flaskene ble splittet ca. hver 7.-10. dag, avhengig av celletetthet i flaskene. Flasker med monolag ble vasket med Hank's balanced salt solution HBSS (BioWhittaker), trypsinert (Trypsin Versene, BioWhittaker), løst opp i 2,0 ml celledyrkningsmedium og splittet med en 1:2 ratio. Det ble så tilsatt 12,0 ml celledyrkningsmedium til hver flaske. Cellene ble inkubert ved 20 °C i inkubatorskap uten CO₂.

2.2. Virusproduksjon

I dette studiet ble det benyttet 4 forskjellige SAV-isolat, levert fra Veterinærinstituttet i Oslo og Pharmaq AS. Isolatene som ble benyttet var Vetinst1, Vetinst2, Pharm1 og Pharm2. Først ble Veterinærinstitutt isolatene benyttet og supernatanten fra smittede celleflasker ble fortynnet 1:50 og 1:10 med smittemedium 1 bestående av 96,9 % MEM, 0,1 % gentamicin sulphate 50 mg ml⁻¹, 1 % (v/v) L-glutamine 200 mM og 2 % FBS. Ved ny smitte ble

Material og metode

celledyrkningsmediet fjernet og 4,5 ml av fortynnet virussupernatant tilsatt celleflasker med monolag av TO-celler. Disse ble inkubert i 3 timer ved 15 °C uten CO₂ før ytterlige 12,0 ml smittemedium 1 ble tilsatt. Ved dag 6, 8 og 15 ble virussupernatanten høstet, overført til 50 ml rør og oppbevart ved -20 °C frem til virusisolering.

Modifisert prosedyre

I et forsøk på å øke smittesuksessen ble det benyttet en metode beskrevet av Welsh et al. (2000) med noen modifikasjoner. Denne metoden ble benyttet på alle fire isolatene. Celleflaskene med monolag av TO-celler ble enten overført direkte til smitte eller vasket med HBSS før inokulering med 1,0 ml virussupernatant i én time. Etter én time ble det tilsatt 14,0 ml av enten smittemedium 1 eller smittemedium 2. Smittemedium 2 består av 97,9 % MEM, 0,1 % gentamicin sulphate 50 mg ml⁻¹, 1 % L-glutamine 200 mM og 1 % NEAA 10mM, 100x. Flaskene ble inkubert ved 15 °C uten CO₂, høstet etter 8 dager og overført til 50 ml rør. Før nedfrysning og oppbevaring ved -20 °C ble virussuspensjonen sentrifugert ved 1400 g i 15 minutt for å pelletere cellene. Denne cellepelletten ble høstet og resuspendert i PBS, og omtales som cellepellet 2, CP2. Cellene fra bunnen av de smittede celleflaskene ble også høstet og omtales som cellepellet 1, CP1.

Optimalisering av metoden

Det ble benyttet to forskjellige smittemedium, av de to ble smittemedium 2 (uten FBS) benyttet da det ikke ble observert noen forskjell ved bruk av disse mediene. For å fjerne mest mulig av vekstmediet ble det valgt å vaske cellene med HBSS før smitte. Da det ikke ble observert noen synlig cytopatogen effekt (CPE) på isolatene fra Veterinærinstituttet samt på Pharm1-isolatet ble det i videre virusproduksjon, frem til immunisering, benyttet Pharm2-isolat ettersom dette viste en bedre evne til å fremskaffe en cytopatogen effekt.

Bildetaking

Det ble tatt bilder (Olympus DP11) av de smittede cellene for å dokumentere en eventuell CPE på cellene under smitteforløpet.

2.3. Bestemmelse av virustiter

For å undersøke viruskonsentrasjonen i prøvene ble to forskjellige metoder benyttet: TCID₅₀ og plakk assay. TCID₅₀ gir en indikasjon på hvilken dose som kreves for å infisere 50 % av cellene, mens plakk assay er en kvantifiserende metode som brukes for å bestemme antall plakk formende enheter (PFU) i en prøve.

2.3.1. TCID₅₀

Seks celleflasker med monolag av TO-celler ble først vasket med HBSS, trypsinert og tilsatt til sammen 30,0 ml celledyrkingsmedium før cellene ble sådd ut i brønner. Det ble tilført totalt 0,5 ml TO-celler til hver brønn på 24 brønns plater (Nunc). Disse ble inkubert ved 20 °C frem til dannelse av monolag i brønnene. Etter endt inkubering ble celledyrkingsmediet fjernet og 0,5 ml 10 folds virusfortynninger ($10^{-3} - 10^{-12}$) av Pharm 2, passasje 8 i smitte-medium 2 ble tilført brønnene. Totalt 6 paralleller for hver fortynning ble benyttet. Platene ble forseglet med tape (Microseal® 'B' Adhesive Seals, BioRad) og inkubert ved 15 °C uten CO₂ i 8 dager. Etter inkubering ble brønnene undersøkt i et omvendt lysmikroskop (Axiovert 100, Zeiss) og virustiter ble kalkulert etter metoden beskrevet av Spearman-Kärber (Spearman, 1908, Kärber, 1931) ved å benytte formelen (1.1) vist under:

$$(1.1) \quad \text{Spearman-Kärber formelen: Gjennomsnittlig TCID}_{50} = X + \frac{1}{2} \times d - d \times \sum \left(\frac{r}{n} \right)$$

Hvor, X = log høyeste fortynning

d = log fortynningsintervall

r = brønner ikke infisert

n = antall brønner per fortynning

Material og metode

2.3.2. Plakk assay

To celleflasker med monolag av TO-celler ble først vasket med HBSS, trypsinert og tilsatt til sammen 12,0 ml celledyrkingsmedium før cellene ble sådd ut i brønner. Det ble tilført totalt 0,2 ml TO-celler til hver brønn i en 96 brønns brett (Nunc). Disse ble inkubert ved 20 °C frem til dannelse av monolag i brønnene. Etter endt inkubering ble celledyrkingsmediet fjernet før 0,2 ml 10 folds virusfortynninger ($10^{-3} - 10^{-12}$) av Pharm 2, passasje 8 i smitte-medium 2, ble tilført brønnene. Totalt 3 paralleller for hver fortynning ble benyttet. Dette ble inkubert ved 15 °C i én time før virusfortynningene ble fjernet og 0,2 ml av smitte-medium 2 på forhånd tilsatt 0,75 % (v/v) karboksymetylcellulose med lav viskositet (Sigma) ble tilsatt hver brønn. Dette ble inkubert ved 15 °C i 8 dager før cellene ble fiksert i 0,2 ml formalin, fortynnet 1:9 med 0,01M PBS i én time. Brønnene ble deretter vasket forsiktig med H₂O og farget ved å tilsette én dråpe filtrert 1 % (w/v) krystall fiolett (Sigma) til hver brønn. Krystallfiolettløsningen ble laget ved å blande krystallfiolettpulver (K-660, Merck) med 100,0 ml springvann før det ble filtrert med filterpapir (sterile filter 0,20 µm, Sarstedt). Overflødig farge ble fjernet forsiktig med springvann før platene ble lufttørket. Tørre plater ble undersøkt i et omvendt lysmikroskop (Axiovert 100, Zeiss). Plakkene fra to paralleller hvor plakkantallet lå mellom 10 og 100 ble notert. Gjennomsnittsverdien ble benyttet for å regne ut PFU etter formelen (1.2) nedenfor.

(1.2) **Formel for utregning av plakk formende enheter:** $\frac{*plakk}{d \times V} = pfu/ml$

Hvor, * er gj.snitt av fortynninger hvor plakkantallet er mellom 10 og 100

d = fortynningsfaktor

V = volum av virusfortynning per

2.4. Isolering av virusprotein fra supernatant

Metoden som ble benyttet er tidligere brukt av Wergeland og Jakobsen (2001) for isolering av infectious salmon anaemia virus (ISAV). Virussupernatanten ble sentrifugert ved 3200 x g i 10 minutter for å fjerne celler fra supernatanten. Fra supernatanten ble det overført 36,0 ml til sentrifugerør (25x89 mm, Ultra clear, Beckman) som på forhånd var tilsatt 1,0 ml sukrosepute bestående av 65 % sukrose (se vedlegg) i TNE buffer (0,01M Tris-HCl (pH 7,2), 0,1M NaCl, 1mM EDTA). Dette ble videre sentrifugert ved 102 900 x g i én time ved 4 °C. Viruspartiklene ble forsøkt isolert ved å fjerne de øverste 34,0 ml i rørene for så å overføre de resterende 3,0 ml, fra to rør, forsiktig til et nytt sentrifugerør (14 x 89 mm. Ultra clear, Beckman) med en kontinuerlig sukrosegradient 25 % til 65 %. Dette ble sentrifugert ved 207 570 x g i 20 timer ved 4 °C. Ved synlig virusbånd ble det pipettert ut 1,5 ml fra dette området som videre ble sentrifugert ned ved 286 795 x g i én time. Væsken ble fjernet og viruspelletten ble oppbevart ved -20 °C for til analyser i SDS-PAGE.

Modifisert prosedyre

Oppkonsentrering av protein i supernatanten ble utført etter en metode beskrevet Welsh et al. (2000), med noen modifikasjoner. Virussupernatanten ble sentrifugert ved 1400 x g i 15 minutter for å fjerne celler fra supernatanten. Supernatanten ble tilsatt 2,2 % NaCl og 6 % (w/v) polyethylene glycol (PEG-8000, Sigma) og satt til forsiktig røring ved 4 °C i 18 timer. PEG presipitatet ble høstet ved å sentrifugere løsningen i 90 minutter ved 1400 x g. Videre ble PEG presipitatet enten resuspendert i PBS og oppbevart ved -20 °C for videre analyser i SDS-PAGE eller resuspendert i 1,5 ml TNE buffer og lagt på en kontinuerlig sukrosegradient (20 % - 60 %). Gradienten ble sentrifugert i 18 timer ved 102 900 x g. Fra bunnen av sentrifugerøret ble det høstet 1,0 ml fraksjoner og disse ble analysert i SDS-PAGE.

Optimalisering av metode

Det kom ikke noe synlig bånd i sukrosegradientene, verken før eller etter tilsetting av PEG. PEG viste seg allikevel å oppkonsentrere proteinene i prøvene, derfor ble metoden beskrevet for PEG brukt videre. Etter sentrifugering ble PEG presipitat resuspendert i PBS og oppbevart ved -20 °C frem til proteindialyse og analyser i SDS-PAGE.

Material og metode

2.4.1. Proteinrensing

PEG presipitatet ble forsøkt rensset fritt for PEG ved hjelp av proteindialyse. Dette er en teknikk som baserer seg på konsentrasjonsforskjeller over en membran. Uønskede molekyler med lav molekylvekt fjernes ved at de diffunderer ut av dialysekassetten, mens cellulosemembranen i dialysekassetten holder tilbake molekyler på grunn av molekylvekt. Metoden ble utført i henhold til leverandørens protokoll (se vedlegg)

En dialysekassett, Slide-a-Lyzer® (Pierce), med en porestørrelse på 10 kDa, ble benyttet for å fjerne PEG med en molekylvekt på 8 kDa. Tint PEG presipitat fra fire rør, på forhånd resuspendert i PBS, ble injisert i dialysekassettmembranen. Før injisering ble membranen hydrert i 30 sekunder i PBS. Etter injisering ble dialysekassetten oppbevart ved 4 °C i et kar fylt med PBS. PBS-løsningen ble skiftet hver 24. time, og dialysert prøve ble tatt ut etter 48 timer og 72 timer, dette for å fjerne mest mulig PEG. Prøvene ble så oppbevart ved -20 °C for analyser i SDS-PAGE.

2.4.2. Konsentrasjonsbestemmelse av proteiner i supernatant

Konsentrasjonen av rensset virusprotein ble forsøkt bestemt med Bio Rad protein assay (Bio Rad), ved å sammenligne virusprøven med en standardkurve hvor bovint serum albumin (BSA) brukes som standardprotein. Testen er basert på fargeendringer i Coomassie Brilliant blue R-250. Ved lav pH har ikke-bundet Coomassie et absorpsjonsmaksimum på 470 og 650 nm, mens bundet til protein har det er absorpsjonsmaksimum på 595 nm. Absorpsjonen ble målt med et spektrofotometer (u-1100, Hitachi)

Mikrometoden er optimal for proteinkonsentrasjoner i området mellom 1,0 – 20,0 µg ml⁻¹ og er lineær mellom 1,2 og 10,0 µg. Coomassie fargeløsning (BioRad) ble fortynnet 2:7 i ddH₂O og videre filtrert for å fjerne partikler. Fra denne filtrerte fargeløsningen ble 0,9 ml overført til kyvetter, og tilsatt 100 µl BSA-løsning med ulik proteinkonsentrasjon (tabell 1). Dette gir et 1:4 forhold i totalt prøvevolum på 1,0 ml. Etter 5 minutters inkubasjon i romtemperatur ble absorbansen målt. Som blank prøve ble det benyttet 100 µl av Glycin-HCl (pH 2,7)/Tris-HCl (pH 9) (blandet 1,0 ml + 60,0 µl) i 0,9 ml fargeløsning. Ut fra denne standardkurven kan man

estimere mengden virusprotein tilstede i prøvene. Ved måling av proteinkonsentrasjon i virusprøvene ble 20 μl av det dialyserte viruset blandet med 0,9 ml fargeløsning.

Tabell 1. Blandingsforhold for standardkurve

Standardprøve ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	BSA-stockløsning 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (μl)	ddH₂O (μl)
0	0	100,0
1,0	5,0	95,0
2,0	10,0	90,0
5,0	25,0	75,0
10,0	50,0	50,0

2.4.3. Oppkonsentrering av proteiner ved frysetørking

Frysetørking av prøven ble benyttet for å fjerne mest mulig PBS-buffer etter proteindialysen. Metoden baserer seg på å oppkonsentrere et materiale ved å fjerne vannet ved sublimasjon fra frossen tilstand.

Den dialyserte virussupernatanten ble overført til 15 ml rør og frosset ned skrått i rørene for å få større overflate og dermed redusere frysetørketiden. Når væsken var frosset ble rørene satt til frysetørking (Alpha 1-2 LD_{plus}) en prosess som tok 24 timer før store deler av PBS-bufferen var fjernet ved sublimasjon. På denne måten oppkonsentreres proteinene i prøvematerialet og prøvene ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til nye målinger av proteinkonsentrasjonen ved hjelp av protein assay.

Material og metode

2.5. Analyse av proteiner

For å kunne identifisere molekylvekten til SAV proteiner samt visualisere renheten av produktet ble følgende metoder benyttet: SDS-PAGE, native-PAGE og western blott. Etter fremkalling ble det tatt bilde (Molecular imager ChemiDoc™ XRS+ imaging system, Bio Rad) av gelene og membranene.

2.5.1. SDS-PAGE

Elektroforese omhandler separering av elektrisk ladde molekyler i et elektrisk felt. En vanlig metode for å separere proteiner på grunnlag av molekylvekt (måles i kDa) er ved bruk av sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$) er en sterk anionisk detergent som binder seg til proteiner og bryter de ikke-kovalente interaksjonene. Dette er en konsekvens av SDS-molekylens negative ladning som gjør at molekylene frastøter hverandre og ødelegger proteinstrukturer slik at proteinene får en mer utstrakt form. Ved å tilføre varme vil man påskynde denne prosessen. β -mercaptoethanol reduserer disulfidbroer som bevarer proteinenes tertiær struktur, og vil ved tilsetting føre til denaturering av proteinene. SDS-protein-kompleksene foreligger som anioner og i det elektriske feltet vandrer de mot anoden (den positive elektroden). Hastigheten er størrelsesavhengig og små molekyler vandrer lengre ettersom de møter mindre motstand (Walker og Wilson, 2000a).

SDS-PAGE består av to geler, en konsentrerende gel og en separerende gel (se vedlegg). Disse gelene har ulik konsentrasjon av polyakrylamid som er avgjørende for porestørrelsen. To glassplater som på forhånd var vasket med 70 % etanol i ddH₂O og testet for lekkasje ble montert sammen. Den separerende gelen (12 % akrylamid, se vedlegg) ble først tilført mellom glassplatene. For å få en jevn overflate og for å hindre uttørking av gelen ble det tilført et tynt lag med ddH₂O øverst. Etter 1 time var gelen ferdig polymerisert og vannet ble forsiktig fjernet før den konsentrerende gelen (4 % akrylamid, se vedlegg) ble tilsatt. For å forme brønnene ble det satt inn en kam øverst i gelen. Omtrent etter 45 minutter var gelen ferdig polymerisert og kammen ble fjernet.

Prøvebuffer (se vedlegg) ble tilsatt prøvene (ulike fortyninger ble benyttet, se resultat) og oppvarmet i en termomixer (Eppendorf) til 95 °C i 5 minutter for så å avkjøles til

romtemperatur. 20,0 µl fra hver prøve, samt 10,0 µl av en molekylvektstandard (Silver stain plus (BioRad), Coomassie blue R-250 (BioRad) fortynnet 1:20 med prøvebuffer eller en ferdig fortynnet Kaleidoscope (BioRad)) ble tilsatt brønnene. Gelene ble plassert i et elektroforesekammer og tilsatt runningbuffer (se vedlegg) før elektroforesen ble utført ved 200 Volt, og avsluttet når det blå båndet hadde nådd kanten av gelen omtrent etter 45 minutter.

2.5.2. Native-PAGE

SDS danner komplekser med PEG og påvirker dermed proteinenes vandring i det elektriske feltet. Som en alternativ metode til SDS-PAGE ble native-PAGE benyttet. Dette er en elektroforeseteknikk som separerer molekyler basert på størrelse og molekylladning, men i fravær av SDS.

Native-PAGE består av to geler, en konsentrerende gel og en separerende gel (se vedlegg). Disse gelene har ulik konsentrasjon av polyakrylamid som er avgjørende for porestørrelsen. To glassplater som på forhånd var vasket med 70 % etanol i ddH₂O og testet for lekkasje ble montert sammen. Den separerende gelen (12 % akrylamid, se vedlegg) ble først tilført mellom glassplatene. For å få en jevn overflate og for å hindre uttørking av gelen ble det tilført et tynt lag med ddH₂O øverst. Etter 1 time var gelen ferdig polymerisert og vannet ble forsiktig fjernet før den konsentrerende gelen (4 % akrylamid, se vedlegg) ble tilsatt. For å forme brønnene ble det satt inn en kam øverst i gelen. Etter omtrent 45 minutter var gelen ferdig polymerisert og kammen ble fjernet.

Prøvebuffer (se vedlegg) ble tilsatt prøvene (1:1 fortynning) og oppvarmet til 95 °C i 5 minutt for så å avkjøles til romtemperatur. 20,0 µl fra hver prøve, samt 10,0 µl av en sølvfargingsstandard (Silver stain plus) fortynnet 1:20 med prøvebuffer ble tilsatt brønnene. Gelene ble plassert i et elektroforesekammer og tilsatt runningbuffer (se vedlegg) før elektroforesen ble utført ved 200 Volt og ble avsluttet når det blå båndet hadde nådd kanten av gelen omtrent etter 45 minutter.

Material og metode

2.5.3. Fargemetoder

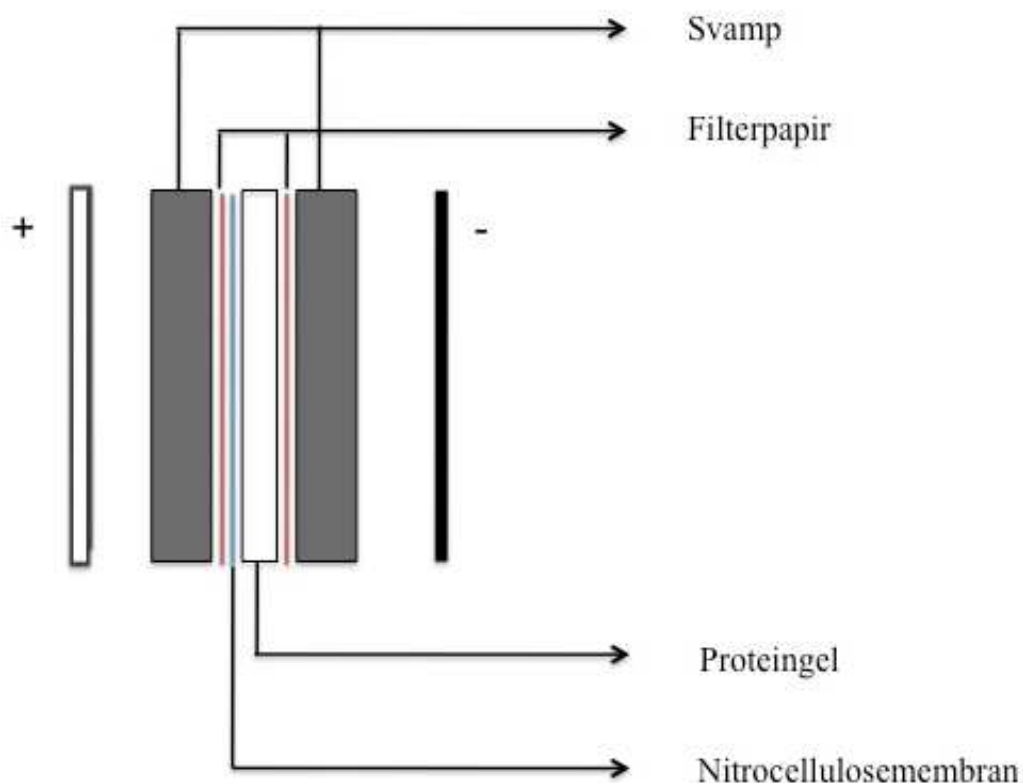
For å visualisere proteinene i gelen etter elektroforese ble det benyttet enten sølvfarging eller Coomassie Brilliant Blue R-250 farging. Ved sølvfarging vil sølvionene (Ag^+) bindes til proteiner, bli redusert til metallisk sølv (Ag), og avgi en sort eller brun farge på proteinene. Ved Coomassie Brilliant Blue R-250 farging vil bølgelengden endres når fargestoffet binder til proteiner.

For sølvfarging ble gelene først fiksert i fikseringsvæske (se vedlegg) i 20 minutter. Deretter ble gelen vasket med ddH₂O i 2x10 minutter, før farging i fargeløsningen (se vedlegg) i ca 20 minutter. Fargereaksjonen ble avsluttet ved å tilsette 5 % (v/v) eddiksyre (Fluka) i 15 minutter og ddH₂O i 5 minutter. Gelene ble oppbevart i ddH₂O i romtemperatur frem til fotografering. For Coomassiefarging ble gelene tilført en Coomassie fargeløsning (se vedlegg) i 15 minutter før gelene ble overført til en avfargingsløsning (se vedlegg) i 30 minutter. Gelene ble så oppbevart i ddH₂O frem til fotografering.

2.5.4. Western blott

For å undersøke tilstedeværelsen av proteiner fra SAV og TO-celler ble det benyttet western blott. Dette er en metode hvor prøvene som analyseres først blir separert ved hjelp av SDS-PAGE, før de blottes over på en positivt ladet nitrocellulosemembran hvor de blir merket med primærantistoff som er rettet mot epitoper på målproteinene. I oppgaven er det benyttet kanin anti-TO og kanin anti-SAV som er rettet mot epitoper på henholdsvis TO-proteiner og SAV-proteiner. For å detektere primærantistoffene benyttes et sekundærantistoff rettet mot primærantistoffet, her geit anti-kanin Ig, horseradish peroxidase konjugat. Festet til sekundærantistoffet er et signalezym (horseradish peroxidase) som ved tilstedeværelse av et substrat (luminol) produserer et synlig signal.

Nitrocellulosemembran (0,45 μm pore, BioRad) sammen med svamper og filterpapir (BioRad) ble lagt i bløt i blottebuffer (se vedlegg). Etter separering av proteinbåndene med SDS-PAGE ble proteingelen sammen med nitrocellulosemembranen montert sammen med svamper og filterpapir i en kassett (figur 5) og satt i et blottekar. Blottebuffer og isblokk ble tilført blottekaret og elektroblottingen ble utført ved 100 Volt i én time.



Figur 5. Elektroblottoppsett. Gelen som skal blottes legges på en nitrocellulosemembran. Dette legges igjen oppå en svamp med et filterpapir som har trukket i blottebuffer. Deretter legges det på et filterpapir og til slutt en svamp. Denne sandwichen overføres til et blottekar og proteinene går mot anoden og festes til nitrocellulosemembranen. Modifisert figur (Walker og Wilson, 2000a)

Etter elektroblotting ble membranen fuktet i TBS-buffer (20 mM, Tris, 500 M NaCl, pH 7,5) og deretter tilført en blokkeringsløsning (3 % tørrmelk i TBS-buffer) for å hindre uspesifikk binding av primærantistoff til membranen. Dette ble inkubert i én time med forsiktig vipping. Membranen ble vasket 3x5 minutter med TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5) med forsiktig vipping. Membranen ble så dekket med primærantistoffløsningen (se vedlegg). To primærantistoff ble benyttet; kanin anti-TO (fortynnet 1:1000) og kanin anti-SAV (fortynnet 1:500). Dette ble inkubert i omtrent 2 timer med forsiktig vipping. Etter endt inkubering ble vaskeprosedyren gjentatt før membranen ble inkubert med et sekundærantistoff (se vedlegg), geit anti-kanin Ig, horseradish peroxidase konjugat (fortynnet 1:3000), i omtrent 90 minutt med forsiktig vipping. Ved endt inkubering ble membranen vasket i 2x5 minutter i TTBS. Like før farging ble membranen vasket i TBS i 5 minutter.

Material og metode

Fargeløsning (se vedlegg) ble tilsatt, og etter omtrent 45 minutter ble fremkallingen stoppet ved å helle av fargeløsningen og vaske med ddH₂O i 2x5 minutter. All inkubering og vask ble foretatt ved romtemperatur og fremkalt membran ble oppbevart mørkt, frem til fotografering.

2.5.5. Smitteforløp i TO-celler smittet med virussupernatant

For å visualisere infeksjonsforløpet av viruset i TO-cellene ble det foretatt en tidsserie hvor cellene ble smittet etter vanlig prosedyre.

TO-celler ble smittet med virussupernatant fra Pharm2, passasje 7. Smitteprosedyren ble utført etter modifisert prosedyre, pkt. 2.4. Totalt 18 flasker ble smittet og én usmittet TO-flaske ble brukt som kontroll. Fra og med tredje dag ble tre og tre flasker høstet daglig frem til og med åttende dag, og fra disse flaskene ble CP2 høstet. Fra kontrollflasken ble cellene skrapet av bunnen (CP1) da det var lite celler i supernatanten. Prøvene ble frosset ned ved -20 °C for analyser i SDS-PAGE. Reaktiviteten mellom CP2 og kanin anti-TO ble også undersøkt i western blott.

2.5.6. Smitteforløp i TO-celler smittet med CP2

Infektiviteten til CP2 ble undersøkt ved å løse opp denne pelletten i smittemedium 2 og benyttet dette til å smitte nye flasker med.

CP2 fra Pharm2, passasje 10 ble løst opp i 30,0 ml smittemedium 2. Fra denne oppløste pelletten ble det tilført 1,0 ml til 30 TO-flasker og flaskene ble satt til én time inkubering ved 15 °C. Én usmittet TO-flaske ble i tillegg brukt som kontroll og ble høstet ved dag 12. Etter én time ble 14 ml smittemedium 2 tilsatt hver flaske og disse ble satt til videre inkubering ved 15 °C. Fra og med tredje dag ble tre og tre flasker høstet daglig frem til og med dag 12, og fra disse ble CP1 og CP2 høstet. Disse pellettene omtales videre i oppgaven som CP1p og CP2p, hvor p står for pellett. Prøvene ble frosset ned ved -20 °C for analyser i SDS-PAGE. Reaktiviteten mellom disse prøvene og kanin anti-TO og kanin anti-SAV ble undersøkt i western blott.

2.6. Immunisering av kanin og absorpsjon av antiserum

Antistoff mot SAV ble forsøkt produsert ved å injiseres CP2 i kanin og etter 28 dager ble serumet tappet.

CP2 fra passasje 8 og CP2 fra passasje 5 fra Pharm2-isolatet ble fortynnet til 1,0 ml med PBS. Dette ble sendt til Eurogentec i Belgia for immunisering av to kaniner (0560 og 0561), kanin 0560 ble benyttet videre i dette studiet og ble satt på en hurtig immunisering (Tabell 2). Det ble foretatt 4 injiseringer av CP2 og ved hver injisering var dosen 125,0 µg. Det ble også foretatt 3 blødninger; en før immunisering (preserum), en prøvetapping etter 21 dager og siste tapping etter 28 dager. Både preserum og serum ble oppbevart ved -20 °C.

Det nyproduserte kanin antiserumet, kanin anti-SAV ble absorbert med TO-celler. Flasker med monolag av TO-celler ble trypsinert og vasket 2 ganger i MEM ved å sentrifugere løsningen ved 3000 x g i 10 minutter før celler (10^7 celler ml^{-1}) og serum ble inkubert med lav agitasjon i 1 time ved 20 °C og 2 timer ved 4 °C. Cellene ble så fjernet ved sentrifugering 3000 x g i 10 minutt. Absorpsjonen ble gjentatt før det absorberte serumet ble lagret ved -20 °C for analysering i SDS-PAGE og western blott.

Tabell 2. Immuniserings- og tappeskjema

	Kanin 0560
<u>Immunisering</u>	24.07.12
Første boost	31.07.12
Andre boost	03.08.12
Tredje boost	11.08.12
<u>Tapping</u>	
Premium tapping	24.07.12
Medium tapping	14.08.12
Siste tapping	28.08.12

Material og metode

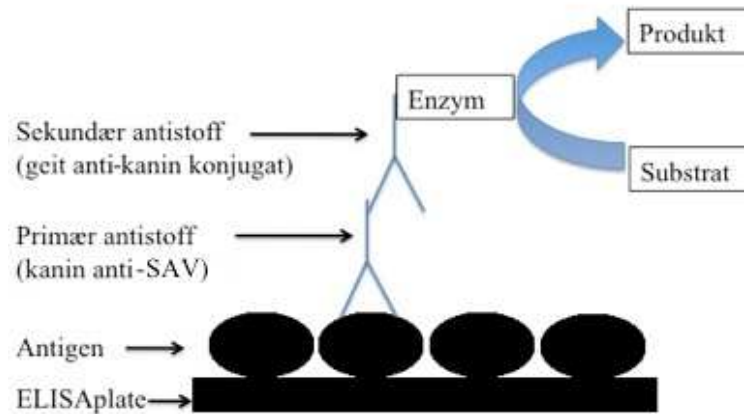
2.7. Immundeteksjon

Reaktiviteten til kanin anti-SAV ble undersøkt ved hjelp av ELISA og sammenlignet med reaktiviteten til kanin anti-TO. For å visualisere virusinfeksjon i TO-cellene ble immunfluorescens benyttet.

2.7.1. ELISA

ELISA ble brukt for å detektere reaktivitet mellom kanin anti-SAV og de ulike antigenene, CP1, CP2 og usmittede TO-celler. Prinsippene for analysen av kaninserum med ELISA er illustrert i figur 6.

Det ble tatt ut ulik prøvemengde fra de ulike antigenene: 3 ml CP1, 2 ml CP2 og 3 ml TO-celler. Disse ble sonikert før tilsetning av PBS slik at løsningen til sammen ble 10,0 ml for hver av antigenene. Fra dette ble det tilsatt 150,0 µl til hver brønn i et 96 brønns brett (Maxisorp, Nunc), med unntak av brønnene langs kanten. Platene ble dekket med lokk og inkubert ved 4 °C over natt. Ubundet antigen ble fjernet ved å helle av løsningen for så å vaske brønnene 3 ganger i 0,05 % (v/v) Tween (Merck) i PBS (PBS-T). For å hindre uspesifikk binding til plastoverflaten og blokkere ledige bindingssteder ble brønnene mettet ved å tilsette 200,0 µl blokkeringsløsning (3 % (w/v) tørrmelk i PBS-T) og inkubert i én time ved romtemperatur. Etter en time ble vaskeprosedyren gjentatt før en forhåndslaget fortyningsserie av kanin anti-SAV ble tilsatt brønnene. 50,0 µl fra hver fortyning ble tilsatt til to paralleller på brettet. Preserum og PBS ble brukt som henholdsvis negativ kontroll og blank prøve. Brettene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur før vaskeprosedyren ble gjentatt. Etter vasking ble 100,0 µl konjugat geit anti-kanin Ig (BioRad), fortynnet 1:2000 i PBS-T tilsatt hver brønn og inkubert i én time ved romtemperatur. Vaskeprosedyren ble gjentatt før 100,0 µl av substratløsning (se vedlegg) ble tilsatt hver brønn. Reaksjonen ble stoppet etter 6 minutter ved å tilsette 100,0 µl 2.5 N H₂SO₄ til hver brønn. Optisk tetthet ble målt ved hjelp av en spektrofotometrisk mikroplatemåler (Sunrise, Tecan) med en bølgelengde på 492 nm.



Figur 6. Illustrasjon av prinsippene bak ELISA. Primærantistoffet (kanin anti-SAV) binder spesifikt til epitoper på antigenet (sort running). Sekundærantistoffet (geit anti-kanin) binder spesifikt til primærantistoffet. På sekundærantistoffet er linket et enzym (HRP) som sammen med sitt substrat avgir farge

2.7.2. Immunfluorescens

Spesifisiteten av antistoff-antigen interaksjonen undersøkes ved å benytte konjugater (sekundære antistoff) med fluorokrom som videre undersøkes i et fluorescens mikroskop (Zeiss Axioskop 2 plus). Fluorokrom er fluorescerende molekyler og ved absorpsjon av lys, sender de tilbake lys ved en annen bølgelengde (Walker og Wilson, 2000b). Immunfluorescens ble utført mot smittede TO-celler.

Før immunisering ble TO-celler dyrket i coverslip flasker (Chamber Slide™, Lab-Tek®) etter dyrkeprosedyren i pkt. 2.1. Ved monolag ble cellene smittet med supernatant, som beskrevet tidligere og inkubert i 5 dager. Etter inkubering ble supernatanten fjernet og flaskene vasket 3x5 minutter i PBS. Før fiksering av objektglasset i 3,7 % (w/v) formaldehyd i PBS i 10 minutter, ble coverslippen fjernet. Objektglassene ble tilsatt blokkeringsløsning (PBS tilsatt 0,5 % BSA) og overført til fuktammer i 30 minutter før kanin anti-TO fortynnet 1:1000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA ble tilsatt. Dette ble inkubert i 1 time mørkt i et fuktammer før vaskeprosedyren, 3x5 minutter i PBS, ble gjentatt. Konjugatet (Alexa fluor 488 geit anti-kanin fortynnet 1:400 i PBS) ble tilsatt og dette ble inkubert mørkt i 45 minutter før vaskeprosedyren ble gjentatt. Preparatene ble lufttørket før montering av dekkglass. For å farge cellekjernen ble en dråpe ProLong Gold Antifade m/DAPI tilført.

Material og metode

Optimalisering

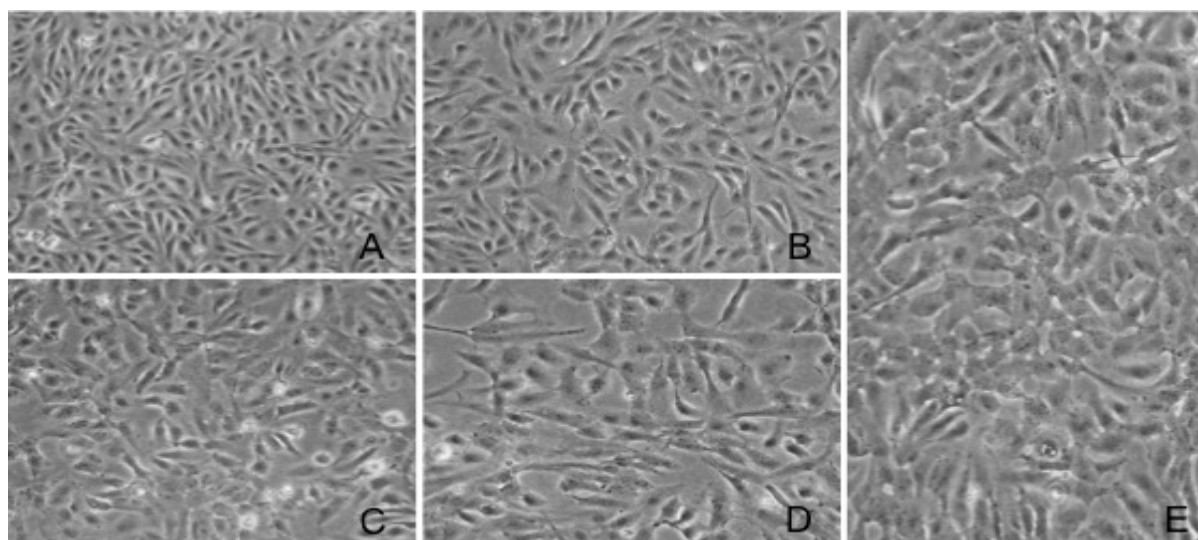
Etter immunisering ble TO-celler dyrket i vanlige celleflasker etter prosedyren beskrevet i pkt. 2.1. Ved monolag ble cellene smittet og inkubert i 5 dager før supernatanten ble fjernet og bunnen av celleflaskene ble skjært ut. Bunnen ble så vasket 3x5 minutter i PBS før fiksering i 3,7 % (w/v) formaldehyd i PBS i 10 minutter. Etter fiksering ble flaskebunnen vasket 2x5 minutter i PBS, preparatene ble lufttørket og deretter ble et området innringet med PAP penn. Videre ble det preparatet blokkert i 30 min i PBS med 0,5 % (w/v) BSA før preparatene ble tilsatt kanin anti-SAV (fortynnet 1:1000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA) og inkubert mørkt i én time før vaskeprosedyren, 3x5 minutter i PBS, ble gjentatt. Konjugat, Alexa fluor 488 geit anti-kanin (fortynnet 1:400 i PBS) og Alexa fluor 546 phalloidin (fortynnet 1:40 i PBS) ble tilsatt og inkubert mørkt i 45 minutter før vaskeprosedyren ble gjentatt. Phalloidin, merket med et rødt fluorokrom (Alexa 546) binder seg til aktin i cellene og farger disse røde, mens geit anti-kanin er merket med et grønt fluorokrom (Alexa 488). Preparatene ble lufttørket før montering av dekkglass. For å farge cellekjernen ble en dråpe ProLong Gold Antifade m/DAPI tilført.

3. Resultater

3.1. Virusproduksjon

Til smitte av TO-celler ble det benyttet fire virusisolater: Vetinst1, Vetinst2, Pharm1 og Pharm2. Etter smitte ble cellene observert daglig i mikroskop, men ingen klar cytopatogen effekt ble observert. Supernatanten fra celler smittet med Veterinærinstitutt isolatene ble høstet ved dag 6, 8 og 15. Til virusproduksjon ble det benyttet to ulike smitte-medium, smitte-medium 1 (med FBS) og smitte-medium 2 (uten FBS). Det var imidlertid ingen observerbar forskjell mellom de to, dermed ble smitte-medium 2 benyttet til virusproduksjon for å redusere proteinmengden i løsningen.

Isolatene fra Veterinærinstituttet ble passert 7 ganger uten at det gav synlig forandring på TO-cellene sammenliknet med kontrollflasken. Ulike virusfortynninger, 1:50 og 1:10, ble benyttet ved smitte av cellene, uten at dette gav noen visuell effekt. Pharm1 og Pharm2 isolatene ble produsert etter modifisert prosedyre (pkt 2.2) og ble passert henholdsvis 4 og 12 ganger. Pharm2 isolatet ble passert flest ganger da det ble observert synlige forandringer på de smittede cellene. Tidlig i infeksjonsforløpet ble det observert at cellene ble rundere og utover i infeksjonsforløpet fikk de et kornete utseende (figur 7). Det ble også observert en økning av celler i supernatanten. For kontrollflasken ble det og observert noen celler med kornete utseende, men det var lite celler i supernatanten.



Figur 7. Cytopatogen effekt av Pharm 2 supernatant, passasje 9 i smitte-medium uten FBS. A) 1 time etter smitte, B) 3 dager etter smitte, C) 6 dager etter smitte, D) 8 dager etter smitte og E) usmittede TO-celler som kontroll. (A-D) 10x forstørrelse. E) 20x forstørrelse)

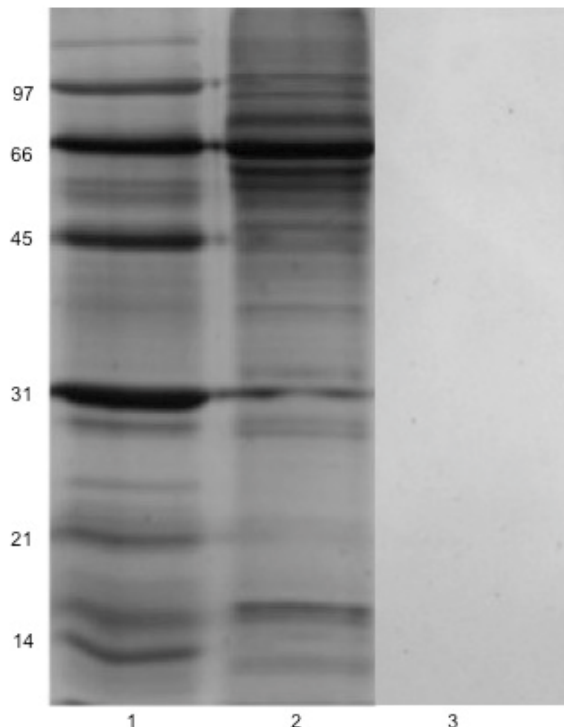
Resultat

3.2. Bestemmelse av virustiter

For å bestemme virustiter ble TCID₅₀ og plakk assay benyttet. Da verken tydelige plakk eller CPE kunne observeres i brønnene er det ikke resultater fra disse analysene.

3.3. Isolering av virusproteiner fra supernatant

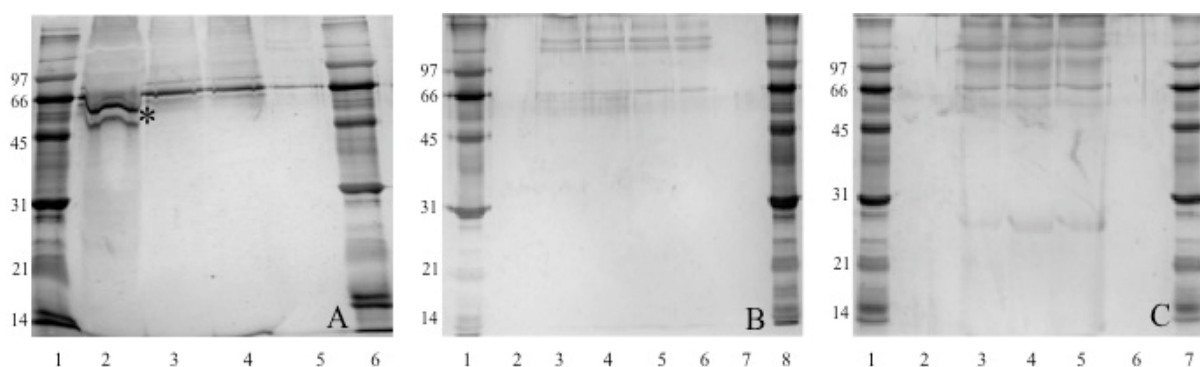
Virusproteiner fra supernatanten ble forsøkt isolert etter en metode benyttet tidligere av Wergeland og Jakobsen (2001), hvor virussupernatant skulle konsentreres ved hjelp av ultrasentrifugering og sukrosegradienter. Ingen virusbånd ble observert i sukrosegradientene, men andre forfattere fant viruset rett under midten av den aktuelle gradienten (Welsh et al., 2000). Fra dette området ble det tatt ut 1,5 ml som ble analysert med SDS-PAGE og sammenlignet med usmittede TO-celler (figur 8). Figuren viser proteinprofilen til usmittede TO-celler samt ingen proteinbånd fra sukrosegradienten.



Figur 8. SDS-PAGE. Analyse av forventet virusområde i sukrosegradienten. Brønn 1 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler, brønn 3 er prøver tatt ut i området ved midten av sukrosegradienten. Det ble tilsatt 20 µl prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard, hvor det ble tilsatt 10 µl. Gelen er sølvfarget.

I et forsøk på å oppkonsentrere virusprotein i supernatant ble PEG benyttet, pkt. 2.4 modifisert prosedyre. Resuspendert PEG presipitat i TNE buffer ble tilført sukrosegradienter og etter sentrifugering ble det høstet 1,0 ml fraksjoner (totalt 11 fraksjoner) fra bunnen av sentrifugerøret. De ulike fraksjonene ble videre analysert i SDS-PAGE og fra alle sukrosegradienter som ble laget var der i SDS-PAGE analysene et proteinbånd ved 66 kDa som kun var tilstede i fraksjon 10. Dette båndet ble ikke detektert ved western blott da det ikke viste noen reaktivitet med kanin anti-TO (resultat ikke vist). Molekylvekten til dette proteinet stemmer imidlertid overens med molekulvekten til serum proteinet BSA. PEG tilsetning ble videre brukt som en metode for å konsentrere proteiner fra supernatanten. Etter utfelling av PEG ble prøvene analysert i SDS-PAGE for å detektere virusproteinene. SDS viste seg å danne kompleks med PEG (Zheng et al., 2007), og brønnene i SDS-PAGE gelen hvor PEG var tilsatt, fikk en karakteristisk U-form (figur 9A). Ingen proteinbånd ble observert under 66 kDa og båndene i SDS-PAGE hadde en karakteristisk W-form (figur 9A*). I et forsøk på å unngå kompleksdannelse ble native-PAGE forsøkt, men ved fravær av SDS denaturerte ikke proteinene slik at proteinene i gelen forelå som kompleks som resulterte i dårlig separasjon av proteinene i gelen (resultat ikke vist).

PEG ble forsøkt fjernet fra presipitat ved hjelp av dialyse. PBS-badet som dialysekassetten lå i ble byttet med 24 timers mellomrom og prøvene ble tatt ut etter 48 og 72 timer. Kompleksdannelse mellom PEG og SDS ble redusert etter 48 timer dialyse (figur 9B) og ytterligere etter 72 timer (figur 9C). Også proteinbåndene blir svakere og svakere ved økt dialysetid.

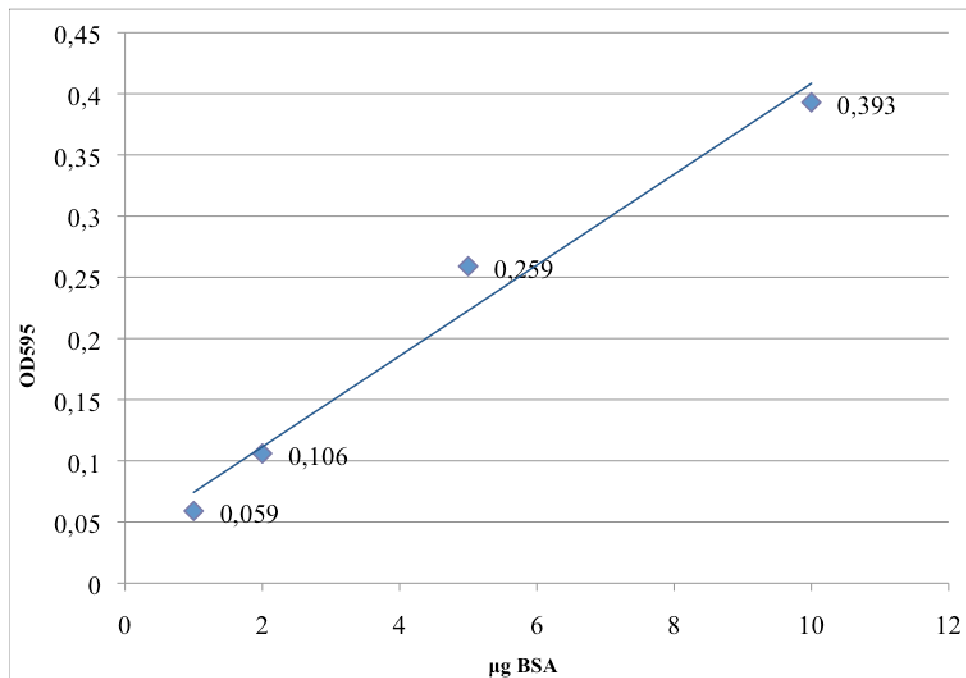


Figur 9. SDS-PAGE analyse av PEG felte proteiner. Proteinprofil viser før og etter dialyse. A) Før dialyse. Brønn 1 og 6 er molekylvektstandard, brønn 2-5 er prøver fortynnet 1/2 – 1/5 i prøvebuffer. B) 48 timer med dialyse, brønn 1 og 8 er molekylvektstandard, brønn 2 og 7 er tilsatt prøvebuffer, brønn 3 – 6 er prøver fortynnet 1/1 – 1/4 i prøvebuffer. C) 72 timer med dialyse. Brønn 1 og 7 er molekylvektstandard, brønn 2 og 6 er tilsatt prøvebuffer, brønn 3 – 5 er prøver fortynnet 3/1 – 5/1 i prøvebuffer. Gelen er sølvfarget

Resultat

3.4. Konsentrasjonsbestemmelse av virusprotein

Et protein assay ble benyttet for å måle proteinmengden i de dialyserte prøvene. Mikrometoden ble benyttet da vi hadde lite prøvemateriale til å måle proteinkonsentrasjonen. Det viser seg at proteinmengden i prøvene er lave og utenfor standardkurven (figur 10). Frysetørking av de dialyserte prøvene ble derfor benyttet i et forsøk på å fjerne PBS ved sublimasjon, og å oppkonsentrere proteinene. Proteinmengde ble målt på nytt med protein assay, men det var fortsatt lite protein tilstede. Da prøvene fortsatt ikke inneholdt et målbart nivå av virus etter rensing ble ikke PEG presipitat fra supernatant benyttet til immunisering.

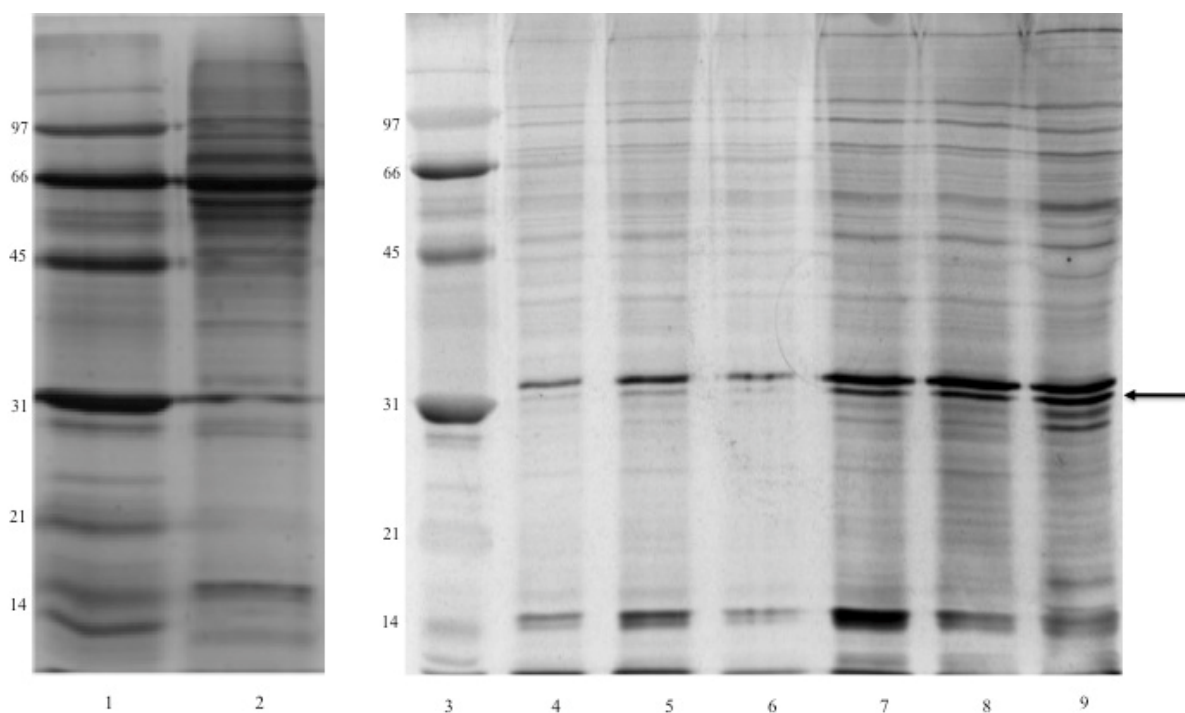


Figur 10. Standardkurve med albumin for måling av proteinkonsentrasjon.

3.5. Analyse av celleassosierte proteiner

Tilstedeværelsen av virusprotein i celleassosiert materiale fra smittede celler ble undersøkt ved hjelp av SDS-PAGE. Etter infeksjon ble prøver tatt ut ved ulike dager etter smitte og undersøkt for proteinmønster. Proteinfarging av SDS-PAGE viser at det kom frem ekstra proteinbånd i 31 kDa området i de infiserte cellene. De ekstra båndene var tydelige ved dag 6 og 8 (figur 11). Samtidig ble de eksisterende båndene sterkere og sterkere utover i infeksjonsforløpet.

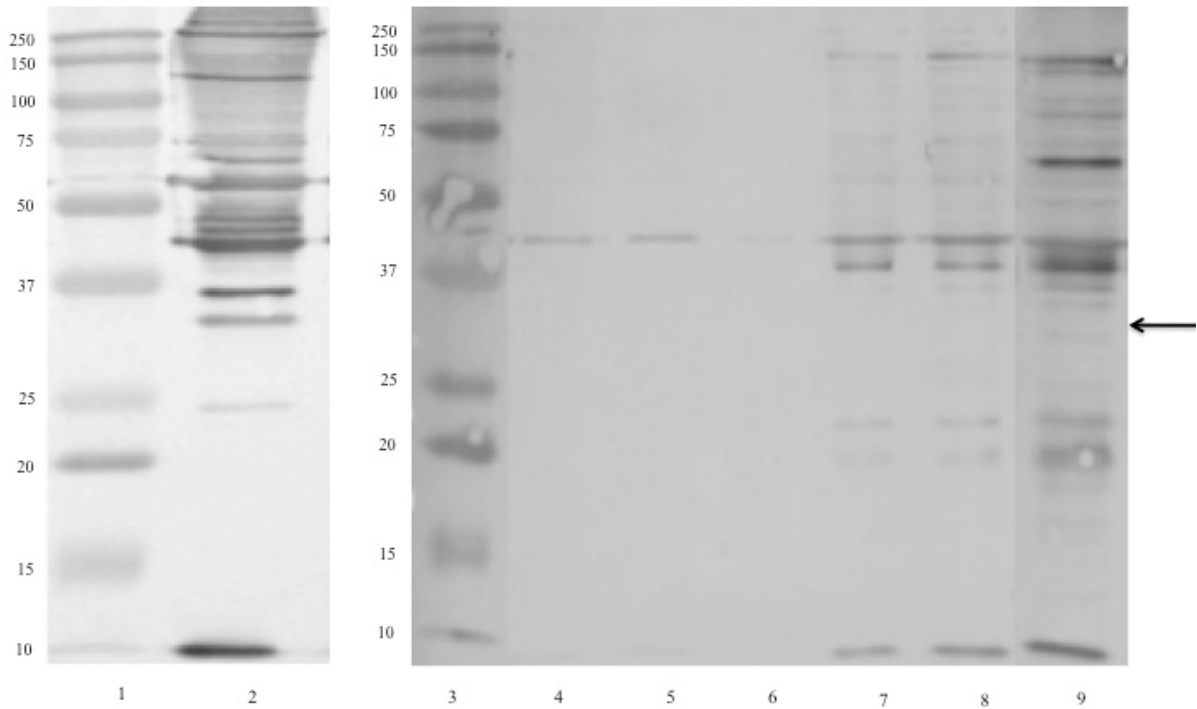
De ekstra båndene var ikke tilstede i uinfiserte TO-celler, mens båndet rett over 31 kDa som er tilstede både i infiserte og uinfiserte celler antas å være et TO-protein.



Figur 11. SDS-PAGE av CP2-tidsserie smittet med virussupernatant. Brønn 1 og 3 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler, brønn 4-9 er henholdsvis dag 3-8 etter smitte. Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard, hvor det ble tilsatt 10 μ l. Pil viser et proteinbånd som ikke er tilstede i uinfiserte celler. Gelen er sølvfarget

Resultat

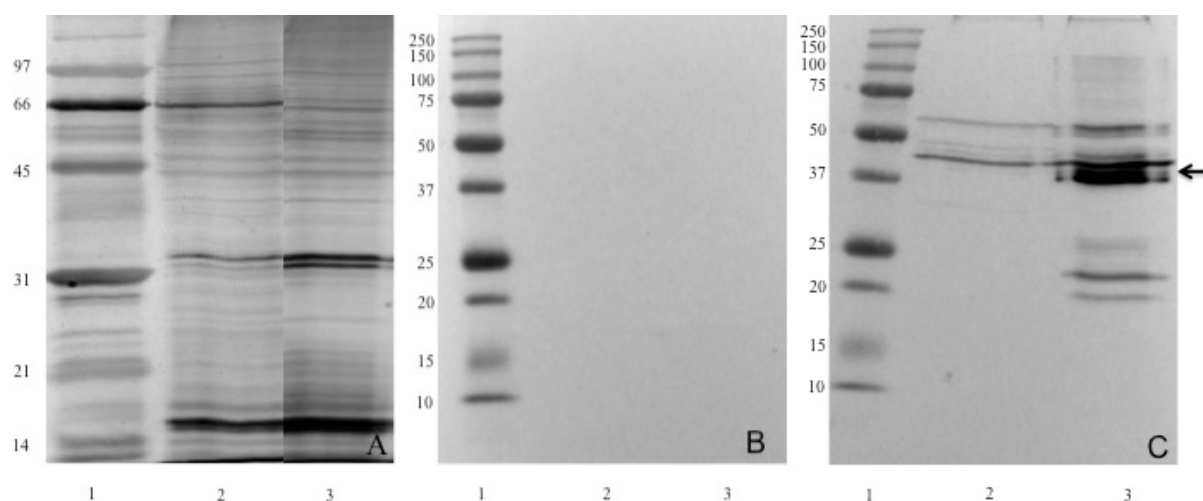
Et western blott på samme tidsserie ble utført hvor reaktiviteten av kanin anti-TO mot proteinene fra CP2 ble undersøkt (figur 12). Blottet viser reaktivitet mot TO-proteiner og man ser flere bånd i området mellom 37 og 50 kDa og to bånd som ligger ved 20 og 25 kDa. Pilen i blottet viser omtrent 31 kDa som er molekylvekten til det ekstra proteinbåndet som dukket opp ved dag 6 i SDS-PAGE analysene. Dette båndet viser ingen reaktivitet med kanin anti-TO.



Figur 12. Western blott av CP2-tidsserie smittet med virussupernatant, testet mot kanin anti-TO. Brønn 1 og 3 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler (CP1), brønn 4-9 er henholdsvis dag 3-8 etter smitte. Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard hvor det ble tilsatt 10 μ l.

3.6. Immunisering av kanin

CP2 fra Pharm2 isolatet, passasje 5 og 8, ble benyttet til immunisering av kanin. Proteinprofilen til dette isolatet er vist i figur 13. Tre uker etter immunisering ble det foretatt en prøvetapping for å undersøke reaktiviteten av antiserumet mot usmittede TO-celler og CP2, passasje 9, samt at preserumet ble benyttet som negativ kontroll for å se at det ikke forelå noen reaktivitet forut for immunisering. Proteinene ble analysert i SDS-PAGE (figur 13A) og western blott. Preserumet viser ingen reaktivitet mot verken TO-celler eller CP2 (figur 13B), mens prøvetappingen (figur 13C) viser reaktivitet mellom kanin anti-SAV og CP2, der man ser sterke bånd mellom 37-50 kDa og 20-25 kDa. Av samme figur ser man også at serumet viser noe reaktivitet med de usmittede TO-cellene.

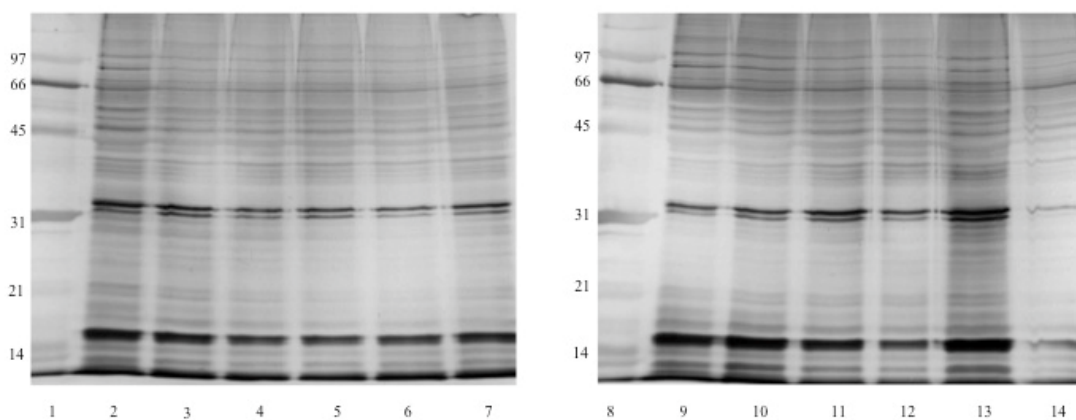


Figur 13. Analyse av preserum og prøvetapping av kaninserum. A) SDS-PAGE. Brønn 1 er molekylvektstandard for sølvfarging, brønn 2 er usmittede TO-celler (CP1) og brønn 3 er CP2 (dag 8 etter smitte). B) Western blott med kaninpreserum (fortynnet 1:500). Brønn 1 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler (CP1) og brønn 3 er CP2 (dag 8 etter smitte). C) Western blott med første serumtapping (fortynnet 1:500). Brønn 1 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler (CP1) og brønn 3 er CP2 (dag 8 etter smitte). Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard hvor det ble tilsatt 10 μ l. Gelen er sølvfarget.

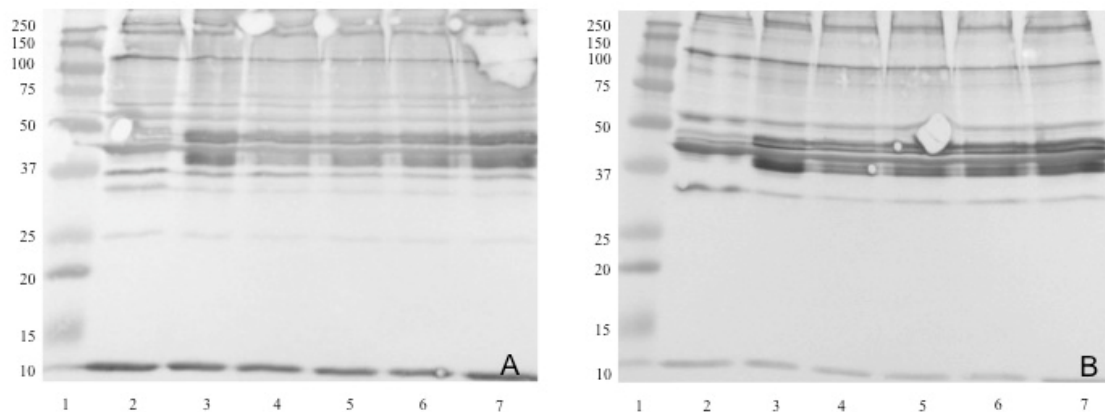
Resultat

3.7. Analyse av TO-celler smittet med CP2

TO-flasker ble smittet med CP2, passasje 10, oppløst i smitte-medium 2. Fra disse flaskene ble både CP1p og CP2p høstet fra tredje dag og videre utover til og med dag 12. SDS-PAGE med CP1p fra tidsserien viser liten forskjell mellom de smittede cellene og usmittede TO-cellene (figur 14). Det er sterke bånd ved omtrent 31 og 14 kDa, men disse kommer også frem på de usmittede TO-cellene (brønn 14). Western blott ble kjørt på samme tidsserie, og her ser man reaktiviteten mellom CP1p og kanin anti-TO (figur 15A) samt kanin anti-SAV (figur 15B). Av begge blottene er det flere sterke bånd mellom 37 og 50 kDa.

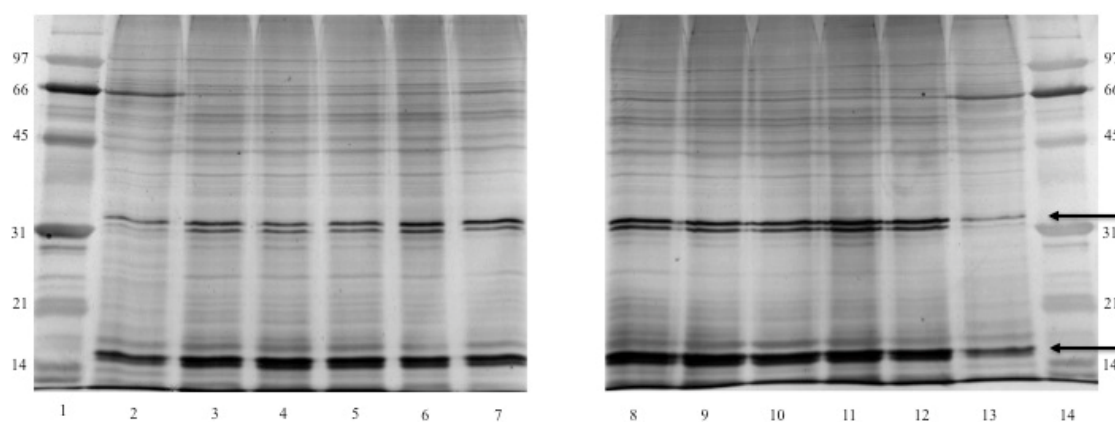


Figur 14. SDS-PAGE av CP1p-tidsserie. Brønn 1 og 8 er molekylvektstandard, brønn 14 er usmittede TO-celler. Brønn 2-7 er CP1p høstet henholdsvis dag 3-8 etter smitte. Brønn 9-13 er CP1p høstet henholdsvis dag 9-12 etter smitte. Brønn 9 og 10 er tilsatt samme prøve. Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard hvor det ble tilsatt 10 μ l. Gelen er sølvfarget

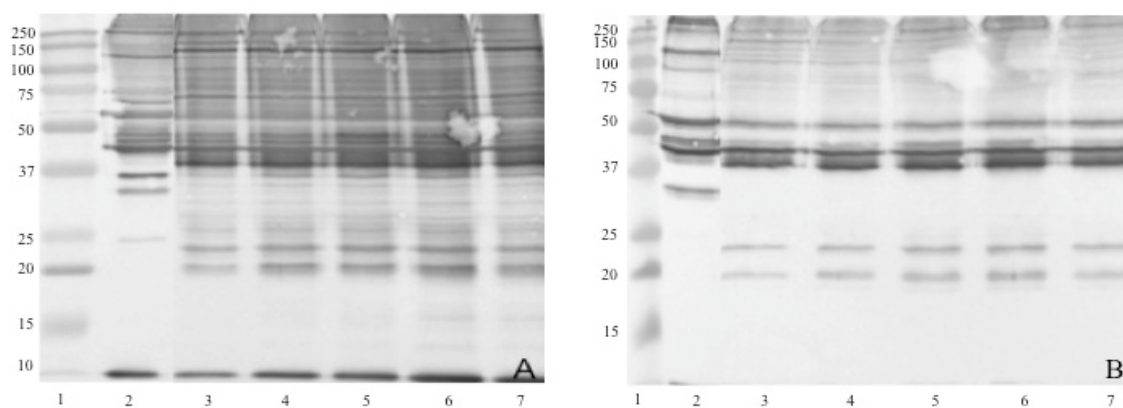


Figur 15. Western blott av CP1p-tidsserie. A) Reaktiviteten med kanin anti-TO, B) Reaktiviteten med kanin anti-SAV. Brønn 1 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler, brønn 3-7 er CP1p høstet henholdsvis dag 8-12 etter smitte. Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard hvor det ble tilsatt 10 μ l.

Analyse av CP2p med SDS-PAGE er vist i figur 16. Av figuren ser man flere sterke bånd, blant annet ved omtrent 31 og 14 kDa. Ved omtrent 31 kDa ser man proteinbånd som blir sterkere og sterkere utover i smitteforløpet. Dette båndet er også tilstede i brønnene som er tilsatt usmittede TO-celler, men er mye svakere. Båndet ved omtrent 14 kDa antar vi er et celleprotein da man også finner dette igjen i TO-cellene. Et western blott ble utført for å sjekke reaktiviteten av kanin anti-TO (figur 17A) og absorbert kanin anti-SAV (figur 17B) mot CP2p. Av blottet ser man at kanin anti-TO reagerer med flere protein, spesielt de med høy molekylvekt. Absorbert kanin anti-SAV reagerer i regionen mellom 37 og 50 kDa og rundt 20 kDa.



Figur 16. SDS-PAGE av CP2p-tidsserie. Brønn 1 og 14 er molekylvektstandard, brønn 2 og 13 er usmittede TO-celler, brønn 3-12 er CP2p høstet henholdsvis dag 3-12 etter smitte. Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard hvor det ble tilsatt 10 μ l. Gelen er sølvfarget.



Figur 17. Western blott av CP2p-tidsserie. A) Reaktiviteten med kanin anti-TO. B) Reaktiviteten med kanin anti-SAV etter absorbering med TO-celler. Brønn 1 er molekylvektstandard, brønn 2 er usmittede TO-celler, brønn 3-7 er CP2p høstet henholdsvis dag 8-12 etter smitte. Det ble tilsatt 20 μ l prøve til hver brønn unntatt molekylvektstandard hvor det ble tilsatt 10 μ l.

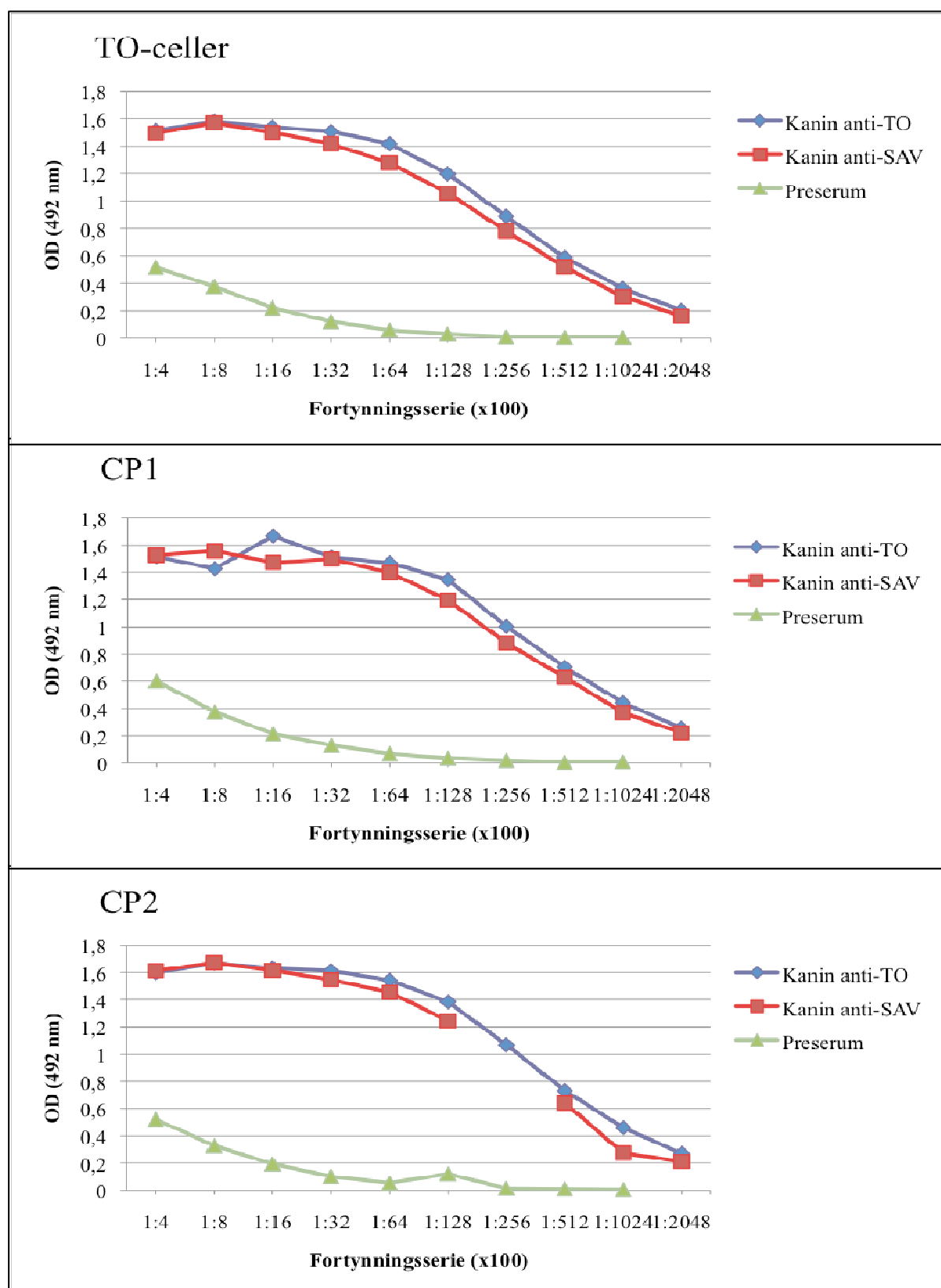
Resultat

3.8. Immundeteksjon

Reaktiviteten til kanin anti-SAV ble undersøkt ved hjelp av ELISA og sammenlignet med reaktiviteten til kanin anti-TO og preserum. Immunfluorescens ble benyttet for å observere effekt av virusinfeksjon på TO-celler og reaktivitet av kanin anti-SAV serumet.

3.8.1. ELISA

Reaktiviteten mellom kaninserum og de tre antigenene (CP1, CP2 og usmittede TO-celler) ble undersøkt i ELISA. ELISA ble utført som beskrevet under pkt. 2.7.1. Kanin anti-TO og kanin anti-SAV ble fortynnet fra 1:400 til 1:204800, mens preserum ble fortynnet fra 1:400 til 1:102400 og resultatet er vist i figur 18. Reaksjonskurvene viser at kanin anti-TO og kanin anti-SAV reagerer kraftig med både TO-cellene og de smittede cellepellettene (CP1 og CP2), mens verdiene for preserum (negativ kontroll) viser jevnt over lave verdier. I tillegg til en negativ kontroll ble det også benyttet blanke prøver (PBS). De blanke prøvene hadde en gjennomsnittlig verdi på 0,108, 0,1465 og 0,096 for henholdsvis TO-celler, CP1 og CP2. Figuren viser at det har vært en immunrespons mot CP2 i immunisert kanin da kanin anti-SAV reagerer kraftig med de ulike antigen i brønnene og vi ser at det er en kryssreaksjon mellom kanin anti-SAV og TO-cellene.

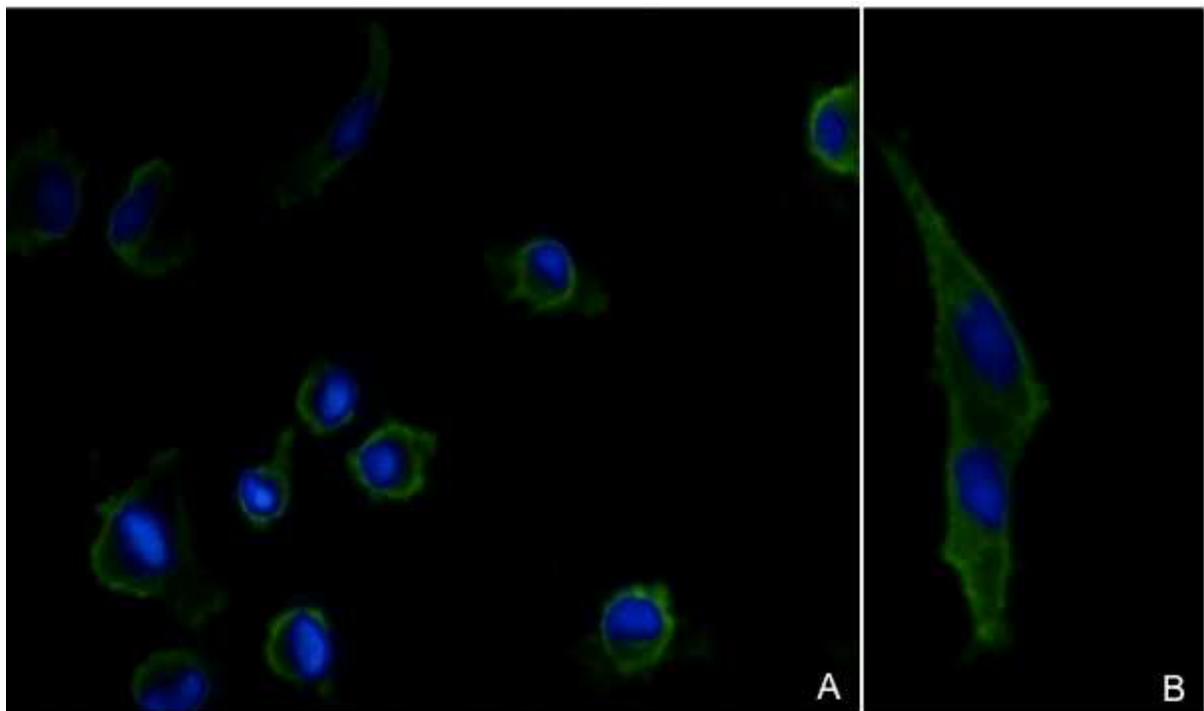


Figur 18. ELISA. Reaktiviteten mellom kaninserumene (kanin anti TO, kanin anti-SAV og preserum) og CP1, CP2 og usmittede TO-celler. Øverst) reaktiviteten mellom kaninserumene og TO-celler. Midten) Reaktiviteten mellom kaninserumene og CP1. Nederst) Reaktiviteten mellom kaninserumene og CP2.

Resultat

3.8.2. Reaktivitet mellom kanin anti-TO og smittede TO-celler

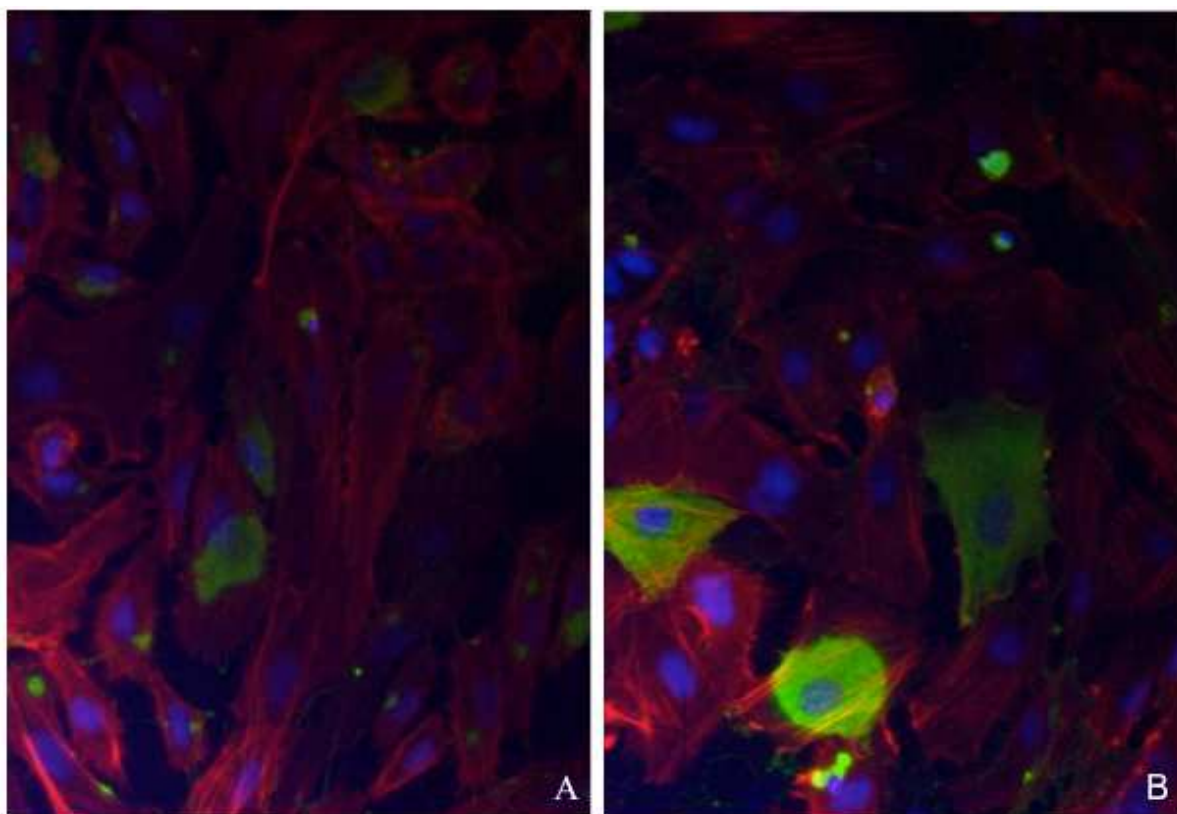
Før immunisering av kanin ble reaktiviteten mellom kanin anti-TO og CPI undersøkt ved immunfluorescens som beskrevet under pkt. 2.7.2. Flaskene ble høstet ved dag 5 etter smitte og resultatet er vist i figur 19. Bildene viser både intakt kjerne og cellemembran på TO-cellene. Andre bilder, ikke vist her, viser imidlertid at det er noen celler hvor kun kjernene er igjen, som tyder på at dette isolatet (Pharm2) gir CPE på cellene.



Figur 19. Immunfluorescenspreparater av TO-celler 5 dager etter smitte. A) 40x forstørrelse. B) 63x forstørrelse. Cellene er inkubert med kanin anti-TO (1:400) og geit anti-kanin Alexa Fluor 488 (grønt). Cellekjernene er merket med DAPI (blått)

3.8.3. Reaktivitet mellom kanin anti-SAV og smittede TO-celler

Etter immunisering ble reaktiviteten av kanin anti-SAV undersøkt med immunfarging av smittede celler. Resultatene viser tydelig reaksjon mellom kanin anti-SAV og enkeltceller i SAV smittet TO-celle preparat (figur 20B), i tillegg observeres litt bakgrunnsfarging i deler av noen celler. Kanin anti-SAV reagerer også med celler i usmittet TO-celle preparat (figur 20A), men reaksjonen er noe mindre.



Figur 20. Immunfluorescenspreparater. A) usmittede TO-celler og B) SAV smittede TO-celler, 5 dager etter smitte. Cellene er inkubert med kanin anti-SAV (1:1000), geit anti-kanin Alexa Fluor 488 (grønt) og Alexa Fluor 546 (rødt, farger actin i cellene). Cellekjernene er merket med DAPI (blått). (20x forstørrelse).

4. Diskusjon

Antistoff er proteiner produsert av B-celler og som gjenkjenner spesifikke epitoper på et antigen. Denne spesifisiteten gjør at antistoff er et viktig verktøy innen diagnostikk og forskning. For SAV eksisterer det per i dag ikke et kommersielt tilgjengelig antistoff, men det er imidlertid publisert flere arbeid hvor det er blitt laget monoklonalt antistoff mot SAV produsert i CHSE-214 celler (Todd et al., 2001, Welsh et al., 2000). Både CHSE- og TO-celler er vist å gi godt utbytte av SAV (Graham et al., 2008) og vi har i vårt arbeid valgt å bruke TO-celler for SAV produksjon. Polyklonalt antistoff lages ved å immunisere kanin med et så rent antigen som mulig, og vi benyttet tilsvarende rensemetoder som Todd et al. (2001) og Welsh et al. (2000) i et forsøk på å isolere virusprotein fra supernatant.

4.1. Dyrking av virus

Viruset ble dyrket ved 15 °C da dette er vist å være optimal temperatur for SAV produksjon i TO-celler (Graham et al., 2008). For virusproduksjon ble det benyttet to ulike smitte-medium (med og uten FBS). Da det ikke var noen observerbar forskjell i bruken av disse ble smitte-mediumet uten FBS benyttet videre. I likhet med Todd et al. (2001) og Welsh et al. (2000) hadde vi vansker med å observere CPE i cellene. Disse benyttet imidlertid CHSE-214 celler. Andre studier har derimot observert at SAV induserer CPE i CHSE-214 celler tidlig i infeksjonsforløpet (Graham et al., 2008, Karlsen et al., 2006). I disse studiene benyttet forfatterne imidlertid et smitte-medium som inneholdt FBS og Lopez-Doriga et al. (2001) fant at bruk av smitte-medium med FBS gav, i CHSE celler, 34 ganger høyere virustiter i supernatanten enn uten FBS. Om dette også er tilfelle for SAV produksjon i TO-celler er uvisst, men det kan være en medvirkende årsak til at det ikke var tilfredsstillende virusutbytte fra gradientrensingene.

Etttersom det var vanskelig å observere CPE på celler smittet med isolatene fra Veterinærinstitutt og Pharm1 ble viruset høstet ved dag 6 og 8 da andre forfattere har rapportert om høy virustiter i TO-celler og CHSE-celler ved disse tidspunktene (Graham et al., 2008, Welsh et al., 2000, Todd et al., 2001). Noen flasker ble også høstet etter 15 dager da Gahlawat et al. (2009) rapporterte om komplett CPE i TO-celler ved dag 14. Vi observert imidlertid ingen forskjell på cellene smittet med Vetinst1, Vetinst2 og Pharm1 sammenliknet

med kontrollflasken, selv etter 15 dager. Ved smitte med Pharm2 isolatet ble det imidlertid observert CPE i cellene: de ble rundere i formen, fikk et mer kornete utseende og det var mye celler i supernatanten, og det ble besluttet å høste celler smittet med Pharm2 etter 8 dager. Morfologiske forandringer ble også observert på cellene i kontrollflasken, men i en mye mindre grad enn i de smittede flaskene. Muligheten for å inducere CPE i celler er både temperatur- virus- og cellelinjeavhengig (Graham et al., 2008). SAV er vist å replikere hurtig og resultere i CPE i TO-celler da disse produserer lite Mx protein (Collet og Collins, 2009, Gahlawat et al., 2009). Dette gjør TO-cellene til en god kandidat for produksjon av SAV. Mulige forklaringer på at det bare ble observert CPE i TO-cellene smittet med Pharm2 isolatet er at de andre virusisolatene har blitt inaktiverede, vært lite infektive eller at det har vært lite replikerende virus til stede.

4.2. Rensing av virusprotein fra virussupernatant

En ultrasentrifugeringsmetode, tidligere brukt av Wergeland og Jakobsen (2001) for isolering av ISAV, ble benyttet i et forsøk på å isolere og oppkonsentrere virusproteinene fra Veterinærinstitutt isolatene. Det ble ikke observert synlige bånd i sukrosegradientene og ved analyser i SDS-PAGE kom det ikke frem noen bånd ved proteinfarging. For å oppkonsentrere proteinene i prøvene ble det forsøkt en metode beskrevet av Welsh et al. (2000) hvor PEG tilsettes for å felle ut proteiner. Proteinene ble felt ut og PEG presipitatet ble tilført sukrosegradienter. Det lyktes ikke å få noe blakket bånd i gradienten, men de ulike fraksjonene ble analysert i SDS-PAGE da andre tilsvarende studier rapporterte om virusprotein i fraksjon 7 og 8 (Todd et al., 2001, Welsh et al., 2000). Vi fikk ikke frem noen proteinbånd i disse fraksjonene, men vi fikk frem et svakt proteinbånd i SDS-PAGE på omtrent 66 kDa i fraksjon 10 som kom frem i alle gradientene. Ut i fra molekylvekten antar vi at dette er serumprotein albumin, da celleflaskene på dette tidspunktet ikke ble vasket før tilsetning av smittemedium 2 og dermed kan det ha vært litt FBS igjen i flasken. En mulig årsak til at det ikke ble funnet noen proteiner i gradienten er at PEG pelletten ikke ble godt nok løst opp i TNE buffer før den ble lagt på gradienten og dermed ble liggende på toppen også etter sentrifugering. Man skulle da likevel forvente å finne proteinbånd i analyser av de høye fraksjonene i SDS-PAGE. En annen mulighet er at det har vært lite virus i supernatanten, enten fordi det var lite replikerende virus til stede fra begynnelsen, eller fordi det ble benyttet et smittemedium uten FBS.

Diskusjon

4.3. Celleassosiert virusprotein

Da det ikke lyktes å isolere virus fra supernatanten ble også andre renseprodukt undersøkt for virus. CP1 og CP2 henholdsvis cellepellet fra bunnen av smittede celleflasker og pelletterte celler fra virussupernatanten ble undersøkt. Analyser av disse i SDS-PAGE viste sterke bånd ved omtrent 31 kDa og 14 kDa i begge cellepellettene. Da CP1 er skrappt fra bunnen av flasken antar vi at det vil være mer TO-protein tilstede i denne pelletten i forhold til virusprotein og vi valgte derfor å undersøke CP2 nærmere. Imidlertid viste Herath et al. (2012) at virustiter var høyest i celleassosiert materiale ved dag 3 og 5, mens vi høstet de smittede cellene ved dag 8.

For å se en eventuell utvikling i proteinmønster i de smittede cellene ble det foretatt en tidsserie hvor man så på proteinprofilen ved ulik tid i smitteforløpet. CP2 ble høstet fra dag 3 til dag 8 og analysert i SDS-PAGE (figur 11). Disse analysene viser et bånd i området rett over 31 kDa i de smittede cellene, som vedvarer utover infeksjonsforløpet. Et bånd med samme molekylvekt observeres også i de usmittede TO-cellene og antas å være et TO-protein. Ved dag 6 kommer det frem et sterkt proteinbånd rett ved 31 kDa som ikke observeres i de usmittede TO-cellene. Dette båndet viser heller ingen reaktivitet med kanin anti-TO i western blott fra samme tidsserie (figur 12). Man har per i dag funnet molekylvekten til flere av proteinene til SAV, blant annet E1 og E2 på henholdsvis 55 og 50 kDa (Welsh et al., 2000). Andre forfattere har estimert at molekylvekten til kapsidprotein er mellom 31 og 35 kDa (Karlsen et al., 2010b, Todd et al., 2001), og dette samsvarer med proteinbåndet observert fra dag 6. SAV er imidlertid vist å ha en nedregulering av proteinsyntesen (Welsh et al., 2000, Xu et al., 2010), og ikke "shut off" slik som er rapportert fra andre alfavirus (Garmashova et al., 2007). Det kan derfor ikke utelukkes at det antatte kapsidprotein er et TO-protein produsert i en respons på virusinfeksjon.

I et forsøk på å teste infektiviteten til CP2 ble det foretatt en ny tidsserie hvor TO-celler ble smittet med CP2 oppløst i smittemedium (figur 14-17). Det ble ikke observert samme forandringer i cellene som ved smitte med virussupernatant, men CP1p og CP2p ble høstet og analysert. Ved analyser av smitteforløpet i SDS-PAGE kom det ikke frem ekstra bånd ved dag 6 slik vi observert i tidsserien fra celler smittet med virussupernatant. Det er per i dag ikke funnet ferdige SAV-partikler inne i celler, og dette er en mulig forklaring på hvorfor CP2 ikke er infektiv (Herath et al., 2012). Det er allikevel en mulighet for at noe virus kan være

celleassosiert og at det eventuelt vil ta lenger tid før viruset får etablert en infeksjon. Ettersom det ble benyttet en cellepellet til immunisering, var det forventet at antistoffet ville reagere med TO-proteiner. Dermed ble reaktiviteten mellom kanin anti-SAV og kanin anti-TO mot CP1p og CP2p undersøkt (figur 15 og 17). Disse analysene viser flere sterke bånd i området mellom 37 og 50 kDa i både CP1p og CP2p, og i tillegg to bånd mellom 20 og 25 kDa ved bruk av begge antistoffene. Vi ser derimot ingen ekstra bånd ved bruk av anti-SAV i forhold til anti-TO. Vi hadde forventet å finne igjen proteinet fra første tidsserie (figur 11) som vi antar er kapsidprotein, men da denne tidsserien er smittet med CP2 og vi ikke ser samme smitteforløp i denne tidsserien antar vi at det ikke er noe kapsidprotein tilstede eller svært lite slik at det ikke reagerer.

4.4. Produksjon av antiserum

Vi fant celleassosierte virusprotein og CP2 ble på grunnlag av dette benyttet til immunisering av kanin. Det er imidlertid vist at immunisering av kanin eller mus med SAV som ikke er fritt for celleprodukt ikke fungerer som et optimalt immunogen og den antivirale immunresponsen vil være dårlig (Todd et al., 2001). Antiserumet som ble produsert antas å ha reaktivitet mot både TO-proteiner og SAV-proteiner da vi benyttet en cellepellet til immunisering. Vi undersøkte vårt kanin anti-SAV serum mot usmittede TO celler og CP2 i western blott (figur 13). Blottet viser at kanin anti-SAV reagerer med proteiner i området mellom 37 og 50 kDa i både de smittede cellene (CP2) og usmittede TO-cellene, men reaktiviteten er betydelig sterkere i CP2. Vi ser også reaktivitet med bånd som ikke vises i de usmittede cellene. Reaktiviteten til preserumet ble også undersøkt, men det var ingen reaksjon mellom dette og usmittede TO-protein eller CP2.

ELISA testen viser at det har vært en kraftig immunrespons i kaninen og at det har blitt laget antistoff mot CP2. Det viser også at dette serumet har kryssreagerende antistoff mot komponenter i TO-cellene. Dette er som forventet da CP2 inneholder TO-proteiner som kaninen vil kunne lage antistoff mot. Kanin anti-SAV serum ble også testet for reaktivitet med virusinfiserte TO-celler ved bruk av immunfluorescens og gav kraftig reaksjon sammenliknet med usmittede celler, og man ser sterk farging i cytoplasma. Denne lokaliseringen av kapsidprotein ble også funnet av Karlsen et al. (2010b) ved bruk av CHSE-214 celler, mens det i BF-2 celler er lokalisert både i cellekjernen og cytoplasma. Man

Diskusjon

ser allikevel også en reaktivitet mellom kanin anti-SAV og de usmittede TO-cellene, men denne reaktiviteten er mer flekkvis distribuert i preparatet og viser ikke reaktivitet med hele celler slik man ser i de infiserte cellene. Dette tyder på at serumet inneholder virus-spesifikke antistoff, men at serumet må ytterligere absorberes med TO-celler og testes ved høyere fortykning for å fjerne uspesifikk binding til celle epitoper. Dette vil da vise om det er mulig å få en tilfredsstillende spesifisitet med bruk av dette antistoffet.

4.5. Konklusjon og fremtidsaspekter

I denne oppgaven ble SAV antigen funnet å være TO-celle assosiert og pelleterte celler fra virussupernatanten, kalt CP2 ble benyttet til immunisering av kanin. Analyser av denne cellepelletten viser et protein med en molekylvekt på 31 kDa, dette er samme molekylvekten som andre forfattere har funnet for kapsidproteinet. Dette tyder på at det er virusprotein tilstede i materialet vi valgte å immunisere med. Som forventet inneholdt kaninserumet kryssreagerende antistoff mot TO-celle komponenter. Testing av kanin anti-SAV serum på SAV infiserte TO-celler viste en sterk reaktivitet som ikke kom opp i de usmittede TO-cellene. Resultatet indikerer at ved videre absorbering kan det være mulig at antiserum får tilfredsstillende spesifisitet til bruk for påvisning av SAV i ulike tester. Absorberingsmetoden vi har benyttet i oppgaven er basert på å absorbere serumet med hele TO-celler for å redusere kryssreaktiviteten med proteiner fra TO-cellene. Ved å videre absorbere viruset på nytt med knuste TO-celler vil man fjerne mulige kryssreaksjoner som serumet har mot proteiner inne i TO-cellen. Det hadde også vært interessant å bruke kanin anti-SAV mot smittede BF-2 og CHSE-celler for å se om lokaliseringen av kapsidproteinet er lik det som er funnet i tidligere studier. Ved bruk av kanin anti-SAV på andre smittede cellyper enn TO-celler vil muligens kryssreaktiviteten reduseres ytterligere.

5. Referanser

- Ahola, T. & Kaariainen, L. 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping - Formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-Methyl-GMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 507-511.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Andersen, L., Bratland, A., Hodneland, K. & Nylund, A. 2007. Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives of Virology*, 152, 1871-1883.
- Basset, C., Holton, J., O'mahony, R. & Roitt, I. 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*, 21, S12-S23.
- Bassity, E. & Clark, T. G. 2012. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos One*, 7.
- Bell, J. G., Mcvicar, A. H. & Cowey, C. B. 1987. Pyruvate kinase isozymes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*): Pyruvate kinase and antioxidant parameters in pancreas disease. *Aquaculture*, 66, 33-41.
- Berg, E. S. 2009. *Utvikling og testing av RNA-probe mot nsP2 (Salmonid alfavirus subtype 2) for bruk på celler og vev*. Unpublished thesis (Master), Universitetet i Bergen.
- Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S33-40.
- Bratland, A. & Nylund, A. 2009. Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21, 173-178.

Referanser

- Chamberlain, R. W. 1980. Epidemiology of arthropod-borne togaviruses: The role of arthropods as hosts and vectors and of vertebrate hosts in natural transmission cycles. *In: Schlesinger, R. W. (ed.) The Togaviruses: Biology, structure, replication.* Academic, Orlando. pp. 175-227.
- Cheng, R. H., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann, M. G., Choi, H. K., Smith, T. J. & Baker, T. S. 1995. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*, 80, 621-630.
- Christie, K. E., Fyrand, K., Holtet, L. & Rowley, H. M. 1998. Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 21, 391-394.
- Collet, B. & Collins, C. 2009. Comparative gene expression profile in two Atlantic salmon cell lines TO and SHK-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130, 92-5.
- Dixon, B. & Stet, R. J. M. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 683-699.
- Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 827-839.
- Evans, D. L. & Cooper, E. L. 1990. Natural killer cells in ectothermic vertebrates. *Bioscience*, 40, 745-749.
- Ferguson, H. W., Rice, D. A. & Lynas, J. K. 1986a. Clinical pathology of myodegeneration (pancreas disease) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Veterinary Record*, 119, 297-299.
- Ferguson, H. W., Roberts, R. J., Richards, R. H., Collins, R. O. & Rice, D. A. 1986b. Severe degenerative cardiomyopathy associated with pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 9, 95-98.

- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M. & Nakanishi, T. 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 209-226.
- Fringuelli, E., Rowley, H. M., Wilson, J. C., Hunter, R., Rodger, H. & Graham, D. A. 2008. Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of european salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *Journal of Fish Diseases*, 31, 811-823.
- Gahlawat, S. K., Ellis, A. E. & Collet, B. 2009. Expression of interferon and interferon--induced genes in Atlantic salmon *Salmo salar* cell lines SHK-1 and TO following infection with salmon alphavirus SAV. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 672-5.
- Garmashova, N., Gorchakov, R., Volkova, E., Paessler, S., Frolova, E. & Frolov, I. 2007. The old world and new world alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *Journal of Virology*, 81, 2472-2484.
- Garoff, H., Frischauf, A. M., Simons, K., Lehrach, H. & Delius, H. 1980. Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoproteins. *Nature*, 288, 236-241.
- Garoff, H. & Simons, K. 1974. Location of spike glycoproteins in Semliki Forest virus membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 3988-3992.
- Garoff, H., Sjoberg, M. & Cheng, R. H. 2004. Budding of alphaviruses. *Virus Research*, 106, 103-116.
- Gould, E. A., Coutard, B., Malet, H., Morin, B., Jamal, S., Weaver, S., Gorbalenya, A., Moureau, G., Baronti, C., Delogu, I., Forrester, N., Khasnatinov, M., Gritsun, T., De Lamballerie, X. & Canard, B. 2010. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Research*, 87, 111-124.

Referanser

- Graham, D. A., Fringuelli, E., Rowley, H. M., Cockerill, D., Cox, D. I., Turnbull, T., Rodger, H., Morris, D. & Mc Loughlin, M. F. 2012. Geographical distribution of salmonid alphavirus subtypes in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland and Ireland. *Journal of Fish Diseases*, 35, 755-765.
- Graham, D. A., Frost, P., Mclaughlin, K., Rowley, H. M., Gabestad, I., Gordon, A. & McLoughlin, M. F. 2011. A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1-6 using an experimental cohabitation challenge model. *Journal of Fish Diseases*, 34, 273-286.
- Graham, D. A., Wilson, C., Jewhurst, H. & Rowley, H. 2008. Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influence of cell line and temperature. *Journal of Fish Diseases*, 31, 859-868.
- Hardy, W. R. & Strauss, J. H. 1989. Processing the nonstructural polyproteins of Sindbis virus - nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *Journal of Virology*, 63, 4653-4664.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. & Fries, E. 1980. On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21-cells. *Journal of Cell Biology*, 84, 404-420.
- Herath, T. K., Ferguson, H. W., Thompson, K. D., Adams, A. & Richards, R. H. 2012. Ultrastructural morphogenesis of salmonid alphavirus 1. *Journal of Fish Diseases*.
- Hodneland, K., Bratland, A., Christie, K. E., Endresen, C. & Nylund, A. 2005. New subtype of salmonid alphavirus (SAV), Togaviridae, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway (vol 66, pg 113, 2005). *Diseases of Aquatic Organisms*, 67, 181-181.
- Hordvik, I. 2002. Identification of a novel immunoglobulin delta transcript and comparative analysis of the genes encoding IgD in Atlantic salmon and Atlantic halibut. *Molecular Immunology*, 39, 85-91.

- Hordvik, I., Voie, A. M., Glette, J., Male, R. & Endresen, C. 1992. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *European Journal of Immunology*, 22, 2957-62.
- Houghton, G. 1994. Acquired protection in Atlantic salmon *Salmo salar* parr and post smolts against pancreas disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 109-118.
- Jansen, M. D., Taksdal, T., Wasmuth, M. A., Gjerset, B., Brun, E., Olsen, A. B., Breck, O. & Sandberg, M. 2010. Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *Journal of Fish Diseases*, 33, 391-402.
- Jose, J., Snyder, J. E. & Kuhn, R. J. 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 4, 837-856.
- Karlsen, M., Hodneland, K., Endresen, C. & Nylund, A. 2006. Genetic stability within the Norwegian subtype of salmonid alphavirus (family *Togaviridae*). *Archives of Virology*, 151, 861-874.
- Karlsen, M., Villoing, S., Ottem, K. F., Rimstad, E. & Nylund, A. 2010a. Development of infectious cDNA clones of salmonid alphavirus subtype 3. *BioMed Central Research Notes*, 3, 241.
- Karlsen, M., Yousaf, M. N., Villoing, S., Nylund, A. & Rimstad, E. 2010b. The amino terminus of the salmonid alphavirus capsid protein determines subcellular localization and inhibits cellular proliferation. *Archives of Virology*, 155, 1281-1293.
- Kielian, M. & Helenius, A. 1985. pH-induced alterations in the fusogenic spike protein of Semliki Forest virus. *Journal of Cell Biology*, 101, 2284-2291.

Referanser

- Kongtorp, R. T., Stene, A., Andreassen, P. A., Aspehaug, V., Graham, D. A., Lyngstad, T. M., Olsen, A. B., Olsen, R. S., Sandberg, M., Santi, N., Wallace, C. & Breck, O. 2010. Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *Journal of Fish Diseases*, 33, 879-88.
- Koonin, E. V. & Dolja, V. V. 1993. Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses - implications of comparative analysis of aminoacid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 375-430.
- Koppang, E. O., Dannevig, B. H., Lie, O., Ronningen, K. & Press, C. M. 1999. Expression of MHC class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 473-489.
- Kristoffersen, A. B., Viljugrein, H., Kongtorp, R. T., Brun, E. & Jansen, P. A. 2009. Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003-2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 90, 127-136.
- Kuhn, J. R. 2007. Togaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, M. D. & Howley, P. M. (eds.) *Field virology 5th edition*. Lippincott Williams & Wilkins (LWW) pp 1001-1018.
- Kärber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologi*, 162, 480-483.
- Lanzrein, M., Schlegel, A. & Kempf, C. 1994. Entry and uncoating of enveloped viruses. *Biochemical Journal*, 302, 313-320.
- Larosa, D. F. & Orange, J. S. 2008. 1. Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, S364-9; quiz S412.

- Larsen, R., Rokenes, T. P. & Robertsen, B. 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, 78, 7938-7944.
- Levinson, R. S., Strauss, J. H. & Strauss, E. G. 1990. Complete sequence of the genomic RNA of O'Nyong-nyong virus and its use in the construction of Alphavirus phylogenetic trees. *Virology*, 175, 110-123.
- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y. A., Boshra, H., Gelman, A. E., Lapatra, S., Tort, L. & Sunyer, J. O. 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7, 1116-1124.
- Liljestrom, P. & Garoff, H. 1991. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *Journal of Virology*, 65, 147-154.
- Lillehaug, A., Jensen, B., J., Sindre, H. & Brun, E. 2012. Bekjempelse av PD 2007-2011. *Veterinærinstituttets rapportserie*.
- Linn, M. L., Gardner, J., Warrilow, D., Darnell, G. A., McMahon, C. R., Field, I., Hyatt, A. D., Slade, R. W. & Suhrbier, A. 2001. Arbovirus of marine mammals: A new alphavirus isolated from the elephant seal louse, *Lepidophthirus macrorhini*. *Journal of Virology*, 75, 4103-4109.
- Lopez-Doriga, M. V., Smail, D. A., Smith, R. J., Domenech, A., Castric, J., Smith, P. D. & Ellis, A. E. 2001. Isolation of salmon pancreas disease virus (SPDV) in cell culture and its ability to protect against infection by the 'wild-type' agent. *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 505-22.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
- McLoughlin, M. F. & Graham, D. A. 2007. Alphavirus infections in salmonids - a review. *Journal of Fish Diseases*, 30, 511-531.

Referanser

- Mcloughlin, M. F., Nelson, R. N., McCormick, J. I., Rowley, H. M. & Bryson, D. B. 2002. Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 25, 33-43.
- Mcvicar, A. H. 1987. Pancreas disease of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Scotland - epidemiology and early pathology. *Aquaculture*, 67, 71-78.
- Mohanty, J. 2006. Antigens and antibodies. In: Swain, P., Sahoo, P. K. & Ayyappan, S. (eds.) *Fish and shellfish immunology: An introduction*. Delhi: Narendra Publishing house. pp 47-70.
- Montgomery, S. A. & Johnston, R. E. 2007. Nuclear import and export of Venezuelan equine encephalitis virus nonstructural protein 2. *Journal of Virology*, 81, 10268-10279.
- Moody, C. E., Serreze, D. V. & Reno, P. W. 1985. Non-specific cytotoxic activity of teleost leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 9, 51-64.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F. L., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. & Aguet, M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defence. *Science*, 264, 1918-1921.
- Munro, A. L. S., Ellis, A. E., Mcvicar, A. H., Mclay, H. A. & Needham, E. A. 1984. An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37, 571-586.
- Nakanishi, T., Fischer, U., Dijkstra, J. M., Hasegawa, S., Somamoto, T., Okamoto, N. & Ototake, M. 2002. Cytotoxic T cell function in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 26, 131-139.
- Nelson, R. T., Mcloughlin, M. F., Rowley, H. M., Platten, M. A. & McCormick, J. I. 1995. Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with pancreas disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22, 25-32.

- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J. & Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 807-825.
- Nylund, A., Plarre, H., Hodneland, K., Devold, M., Aspehaug, V., Aarseth, M., Koren, C. & Watanabe, K. 2003. Haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in Norway: pathology and associated virus-like particles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 15-27.
- Paredes, A. M., Brown, D. T., Rothnagel, R., Chiu, W., Schoepp, R. J., Johnston, R. E. & Prasad, B. V. V. 1993. Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9095-9099.
- Petterson, E., Sandberg, M. & Santi, N. 2009. Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 32, 477-479.
- Plouffe, D. A., Hanington, P. C., Walsh, J. G., Wilson, E. C. & Belosevic, M. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*, 12, 266-277.
- Poppe, T., Rimstad, E. & Hyllseth, B. 1989. Pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 9, 83-85.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W. L., Strauss, J. H. & Weaver, S. C. 2001. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of Virology*, 75, 10118-10131.
- Rabinovitch, M. 1995. Professional and nonprofessional phagocytes - an introduction. *Trends in Cell Biology*, 5, 85-87.
- Randelli, E., Buonocore, F. & Scapigliati, G. 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 326-340.

Referanser

- Roberts, R. J. 2001. The immunology of teleosts. *In: Roberts, R. J. (ed.) Fish Pathology*. Saunders W. B., London, pp. 133-150.
- Robertsen, B. 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 172-191.
- Robertsen, B. 2008. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 351-357.
- Rowley, H. M., Doherty, C. E., Mcloughlin, M. F. & Welsh, M. D. 1998. Isolation of salmon pancreas disease virus (SPDV) from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal of Fish Diseases*, 21, 469-471.
- Rubio-Godoy, M. 2010. Teleost fish immunology. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1, 43-57.
- Ryman, K. D. & Klimstra, W. B. 2008. Host responses to alphavirus infection. *Immunological Reviews*, 225, 27-45.
- Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 778-809.
- Schlesinger, S. & Schlesinger, M. J. 2001. The viruses and their replication. *In: Knipe, D. M. & Howley, P. M. (eds.) Fields virology*. Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 895-916.
- Snow, M., Black, J., Matejusova, I., Mcintosh, R., Baretto, E., Wallace, I. S. & Bruno, D. W. 2010. Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origins of salmon pancreas disease in aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91, 177-188.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E. & Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4, 89-101.

- Spearman, C. 1908. The method of right and wrong cases (constant stimuli) with Gauss formulae. *British Journal of Psychology*, 2, .227-242.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. 1994. The Alphaviruses - gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58, 806-806.
- Sun, B., Robertsen, B., Wang, Z. & Liu, B. 2009. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 547-58.
- Sun, B. J., Skjaeveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jorgensen, J. & Robertsen, B. 2011. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of Virology*, 85, 9188-9198.
- Swain, P. 2006. Specific defence mechanisms of fish: The basis of antibody production and cell-mediated immune response. In: Swain, P., Sahoo, P., K. & Ayyappan, S. (eds.) *Fish and shellfish immunology: An introduction*. Delhi: Narendra publishing house.
- Tadiso, T. M., Lie, K. K. & Hordvik, I. 2011. Molecular cloning of IgT from Atlantic salmon, and analysis of the relative expression of τ , μ and δ in different tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 139, 17-26.
- Taksdal, T., Olsen, A. B., Bjerkas, I., Hjortaas, M. J., Dannevig, B. H., Graham, D. A. & Mcloughlin, M. F. 2007. Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 30, 545-558.
- Todd, D., Jewhurst, V. A., Welsh, M. D., Borghmans, B. J., Weston, J. H., Rowley, H. M., Mackie, D. P. & Mcloughlin, M. F. 2001. Production and characterisation of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 101-108.

Referanser

- Villoing, S., Bearzotti, M., Chilmonczyk, S., Castric, J. & Bremont, M. 2000. Rainbow trout sleeping disease virus is an atypical alphavirus. *Journal of Virology*, 74, 173-183.
- Wahlberg, J. M. & Garoff, H. 1992. Membrane fusion process of Semliki Forest virus I: Low pH induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *Journal of Cell Biology*, 116, 339-348.
- Walker, J., M. & Wilson, K. 2000a. Electrophoretic techniques. In: Walker, J., M. & Wilson, K. (eds.) *Principles and techniques of practical biochemistry*, 5th ed. pp: 580-618.
- Walker, J., M. & Wilson, K. 2000b. Immunochemical techniques. In: Walker, J., M. & Wilson, K. (eds.) *Principles and techniques of practical biochemistry*, 5th ed. pp: 206-262.
- Warr, G. W. 1995. The immunoglobulin genes of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 19, 1-12.
- Watts, M., Munday, B. L. & Burke, C. M. 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*, 79, 570-574.
- Welsh, M., Weston, J., Borghmans, B. J., Mackie, D., Rowley, H., Nelson, R., Mcloughlin, M. & Todd, D. 2000. Biochemical characterization of salmon pancreas disease virus. *Journal of General Virology*, 81, 813-820.
- Wergeland, H. I. & Jakobsen, R. A. 2001. A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 44, 183-190.
- Weston, J. H., Graham, D. A., Branson, E., Rowley, H. M., Walker, I. W., Jewhurst, V. A., Jewhurst, H. L. & Todd, D. 2005. Nucleotide sequence variation in salmonid alphaviruses from outbreaks of salmon pancreas disease and sleeping disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66, 105-111.

- Whyte, S. K. 2007. The innate immune response of finfish - a review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 1127-1151.
- Workenhe, S. T., Rise, M. L., Kibenge, M. J. T. & Kibenge, F. S. B. 2010. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*, 47, 2525-2536.
- Xu, C., Guo, T. C., Mutoloki, S., Haugland, O., Marjara, I. S. & Evensen, O. 2010. Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication in vitro. *Journal of Virology*, 84, 8903-8912.
- Zhang, Y. G., Burke, C. W., Ryman, K. D. & Klimstra, W. B. 2007. Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *Journal of Virology*, 81, 11246-11255.
- Zheng, C. Y., Ma, G. H. & Su, Z. G. 2007. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. *Electrophoresis*, 28, 2801-2807.
- Zou, J., Bird, S. & Secombes, C. 2010. Antiviral sensing in teleost fish. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 4185-4193.

Vedlegg

6. Vedlegg

6.1. Oppskrifter på løsninger benyttet i dette masterarbeidet

Celleproduksjon

- Vekstmedium TO-celler (200 ml)
 - o FBS (BioWhittaker 14-701F) 10,0 ml
 - o L-glutamine, 200mM (BioWhittaker 17-605E) 2,0 ml
 - o Non essential amminoacid (NEAA)
(BioWhittaker 13-114E) 2,0 ml
 - o Gentamicin sulfate, 50mg/ml
(BioWhittaker 17-518L) 200,0 µl
 - o MEM (Minimum essential medium med
Hank´s balanced salt solution (HBSS)
uten L-glutamin) (BioWhittaker 12-127F) 185,8 ml

Virusproduksjon

- Smittemedium 1 PD (200ml)
 - o FBS (BioWhittaker 14-701F) 4,0 ml
 - o L-glutamine, 200mM (BioWhittaker 17-605E) 2,0 ml
 - o Non essential amminoacid (NEAA)
(BioWhittaker 13-114E) 2,0 ml
 - o Gentamicin sulfate, 50mg/ml
(BioWhittaker 17-518L) 200,0 µl
 - o MEM (Minimum essential medium med
Hank´s balanced salt solution (HBSS)
uten L-glutamin) (BioWhittaker 12-127F) 191,8 ml

- Smittemedium 2 PD (200ml)
 - o L-glutamine, 200mM (BioWhittaker 17-605E) 2,0 ml
 - o Non essensial amminoacid (NEAA) 2,0 ml
 - o Gentamicin sulfate, 50mg/ml
(BioWhittaker 17-518L) 200,0 µl
 - o MEM (Minimum essential medium med
Hank´s balanced salt solution (HBSS)
uten L-glutamin) (BioWhittaker 12-127F) 195,8 ml

Virusisolering

- Sukrosegradient
 - TNE-buffer
 - o Tris base (Fluka) 1,2114 g
 - o NaCl (Sigma) 5,8410 g
 - o EDTA (Sigma) 0,3722 g
 - o ddH₂O 1 liter

pH justeres til 7,2.
 - 65 % sukrose (500,0 ml)
 - o 325 g sukrose (Fluka) til 500 ml TNE-buffer
 - 25% sukrose (200 ml)
 - o 77 ml av 65% sukroseløsningen til 123 ml TNE-buffer

Analyse av proteiner

- SDS-PAGE
 - 10% (w/v) APS
 - o Ammonium persulfat (Sigma) 100,0 mg
 - o ddH₂O 1,0 ml

Lages rett før bruk

Vedlegg

- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
 - o Tris base 30,3 g
 - o ddH₂O 80,0 ml

juster pH til 8,8

- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 - o Tris base 6,0 g
 - o ddH₂O 60,0 ml

juster pH til 6,8

- Prøvebuffer
 - o ddH₂O 3,55 ml
 - o 0.5M Tris-HCl, pH 6,8 1,25 ml
 - o Glycerol (Sigma) 2,5 ml
 - o 10 % (w/v) SDS (Sigma) 2,0 ml
 - o 0.5 % Bromophenol blue (BPB) 0,2 ml

Oppbevares i romtemperatur! 50,0 µl B-mercapthoetanol tilsettes 950,0 µl prøvebuffer

- Running buffer, pH 8,3
 - o Tris base 30,3 g
 - o Glycine (Sigma) 144,0 g
 - o SDS 10,0 g
 - o ddH₂O 1,0 l

pH skal ikke justeres, oppbevares ved 4 °C

- Separerende gel 12 %

	<u>2 geler</u>	<u>4 geler</u>
o ddH ₂ O	4,4 ml	8,8 ml
o 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml	5,0 ml
o 10% SDS	100,0 µl	200,0 µl
o 40 % acrylamide/BIS (Fluka)	3,0 ml	6,0 ml
o 10 % APS	50,0 µl	100,0 µl
o TEMED (Fluka)	5,0 µl	10,0 µl

- Konsentrerende gel 4 %
 - o ddH₂O 6,4 ml 9,6 ml
 - o 0.5M Tris-HCl, pH 6.8 2,5 ml 3,75 ml
 - o 10% SDS 100,0 µl 150,0 µl
 - o 40 % acrylamide/BIS 1,0 ml 1,5 ml
 - o 10% APS 50,0 µl 75,0 µl
 - o TEMED 5,0 µl 15,0 µl

- Native PAGE
 - Prøvebuffer (10,0 ml):
 - o ddH₂O 5,55 ml
 - o Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 1,25 ml
 - o Glycerol 3,0 ml
 - o 0,5 % Bromophenol Blue 0,2 ml

 - Running buffer, pH 8,3
 - o Tris base 30,3 g
 - o Glycine 144,1 g
 - o ddH₂O 1,0 l

pH skal ikke justeres, oppbevares ved 4 °C

 - 12 % akrylamide gel:
 - o ddH₂O 9,0 ml
 - o 40 % acrylamide/BIS 6,0 ml
 - o 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 5,0 ml

 - 4 % akrylamide gel:
 - o ddH₂O 9,75 ml
 - o 40 % acrylamide/BIS 1,5 ml
 - o 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 3,75 ml

Vedlegg

- Sølvfarging

- Fiksering

- Metanol (Sigma) 200,0 ml
- Eddik syre (Sigma) 40,0 ml
- Fixative enhancer concentrate (Bio Rad) 40,0 ml
- ddH₂O 120,0 ml

- Fargeløsning :

- ddH₂O 35,0 ml
- Silver complex solution (Bio Rad) 5,0 ml
- Reduction Moderator solution (Bio Rad) 5,0 ml
- Image development reagent (Bio Rad) 5,0 ml
- Development accelerator solution (Bio Rad) 50,0 ml

Løsningen lages rett før bruk. Development accelerator solution (romtemperert) tilsettes resten av løsningen rett før farging

- Stoppløsning:

- Tilsett 5 % eddiksyre i 15 min.

- Comassie blue

- Fargeløsning:

- Coomassie blue R-250 (BioRad) 0,1 %
- EtOH 40 %
- Eddiksyre 10 %
- ddH₂O 50 %

Farges i 15 minutt eller over natt

- Avfarging:

- EtOH 20 %
- Eddik syre 10 %
- ddH₂O 70 %

Avfarges i 30 minutt eller over natt. Ved svake bånd kan det være lurt å avfarge i 30 minutt, da de kan forsvinne ved lang avfarging.

- Western blott
 - 10x Blottebuffer
 - Tris 7,57 g
 - Glycin 36,0 g
 - ddH₂O 250,0 ml

 - 10x TBS (200 mM Tris, 5 M NaCl, pH 7,5)
 - Tris 12,11 g
 - NaCl 146,1 g
 - ddH₂O 500,0 ml

 - 1x Blottebuffer
 - 10x blottebuffer 100,0 ml
 - metanol 200,0 ml
 - ddH₂O 700,0 ml

 - 1x TBS (20 mM Tris, 500 M NaCl, pH 7,5)
 - 10x TBS 100,0 ml
 - ddH₂O 900,0 ml

 - TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween-20 pH 7,5)
 - Tween-20 (Sigma) 350,0 µl
 - 1 x TBS 700,0 ml

 - Blokkeringsløsning (3 % tørrmelk i TBS-buffer)
 - Tørrmelk (Fluka) 3,0 g
 - TBS 100,0 ml

 - Antistoff buffer (1 % tørrmelk i TTBS-buffer)
 - Tørrmelk 2,0 g
 - TTBS 200,0 ml

Vedlegg

- Primærantistoff løsning
 - Kanin anti-TO fortynnes i antistoffbuffer 1:1000
 - Kanin anti-SAV fortynnes i antistoffbuffer 1:500

- Sekundær antistoff
 - Konjugat (geit anti-kanin) (DAKO) 33,0 µl
 - antistoff buffer 100,0 ml

- Horse radish peroxidase (HRP) substratløsning
 - 10x HRP fargebuffer (Bio Rad) 10,0 ml
 - ddH₂O 90,0 ml
 - HRP fargestoff B (Bio Rad) 600,0 µl
 - HRP fargestoff A (Bio Rad) 20,0 ml

Lages klar rett før bruk

Immuneteksjon

- ELISA

- PBS, pH 7,3
 - Na₂HPO₄·2H₂O (Sigma) 0,72 g
 - KH₂PO₄ (Fluka) 0,27 g
 - NaCl 8,5 g
 - ddH₂O 1,0 l

pH justeres til 7,3 og løsningen autoklaveres

- PBS-Tween (PBS-T)
 - 0,05 % Tween-20 i PBS

- Blokkeringsløsning
 - Tørrmelk 3,0 g
 - PBS-T 100,0 ml

- 0,1 M sitronsyre
 - o Sitronsyre (Sigma) 21,0 g
 - o ddH₂O 1,0 l

- 0,2 M Na₂HPO₄x2H₂O
 - o Na₂HPO₄x2H₂O 35,6 g
 - o ddH₂O 1,0 l

- Fosfat-citrat buffer, pH 5,0
 - o 0,1 M sitronsyre 24,3 ml
 - o 0,2 M Na₂HPO₄x2H₂O 25,7 ml
 - o ddH₂O 50,0 ml

- Substratløsning
 - o o-Phenyleneidamine (P-4664, Sigma) 1 tablett
 - o Løses i Fosfat-citrat buffer 37,5 ml
 - o 30 % H₂O₂ (tilsettes rett før bruk) (Sigma) 15,0 µl

- Immunfluorescens
 - PBS, pH 7,3
 - o Na₂HPO₄x2H₂O 0,72 g
 - o KH₂PO₄ 0,27 g
 - o NaCl 8,5 g
 - o ddH₂O 1,0 l

pH justeres til 7,3 og løsningen autoklaveres

 - PBS med 0,5 % BSA
 - o Albumin bovine serum (BSA) (Sigma) 0,5 g
 - o PBS, pH 7,3. 100,0 ml

 - Fiksering
 - o 3,7 % (w/v) formaldehyd (Sigma) i PBS i 10 min

Vedlegg

- Antistoff
 - Kanin anti-TO fortynnet 1:400
 - Kanin anti-SAV fortynnet 1:1000

- Konjugat (DAKO)
 - Alexa fluor 488 geit anti-kanin fortynnet i PBS 1:400
 - Alexa fluor 546 phalloidin fortynnet i PBS 1:40

6.2. Protokoll proteindialyse

INSTRUCTIONS

Thermo
SCIENTIFIC
Slide-A-Lyzer[®] Dialysis Cassettes

0729.8

Introduction

The Thermo Scientific Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette is a convenient device for low molecular weight contaminant removal, buffer exchange, desalting and sample concentration. The cassette membrane is composed of low-binding regenerated cellulose and features a hermetically sealed sample chamber to maintain the highest possible sample retention. These dialysis cassettes are manufactured using clean room conditions to ensure they are contaminant free. Samples are easily added and removed by penetrating the gasket with a hypodermic needle attached to a syringe. Once the needle is removed, the gasket reseals, ensuring that no sample is lost from the cassette during dialysis.

CAUTION: All Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes that have the word "Hydrate" on the cassette pouch must be hydrated before use. Also hydrate all cassettes when using with low sample volumes (i.e., 100-200 μ L in the 0.1-0.5mL cassettes, 0.5-1mL in the 0.5-3mL cassettes and 3-4mL in the 3-12mL cassettes) before use.

Hydrate Membrane

Perform the following steps for cassettes requiring hydration and for all cassettes used with low sample volumes:

1. Remove Slide-A-Lyzer Cassette from its pouch and slip into the groove of an appropriate size buoy.
2. Immerse cassette in dialysis buffer (Figure 1). Hydrate the 3.5-20K cassettes for 1-2 minutes and the 2K cassettes for at least 2 minutes.
3. Remove cassette from buffer and remove excess liquid by tapping the edge of the cassette gently on paper towels. **DO NOT BLOT THE MEMBRANE.**

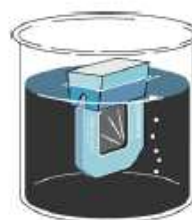


Figure 1. Membrane hydration

Add Sample

Note: Do not allow the needle to contact the membrane.

1. Fill the syringe with the sample, leaving a small amount of air in the syringe.
2. With the bevel sideways, insert the tip of the needle through one of the syringe ports located at a top corner of the cassette.
3. Inject sample slowly. Withdraw air by pulling up on the syringe piston (Figure 2).
4. Remove the syringe needle from the cassette while retaining air in the syringe.

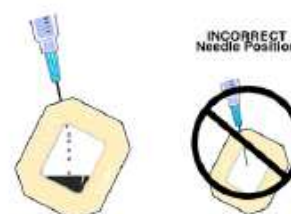


Figure 2. Sample addition

Remove Sample

Note: Use caution to avoid contacting the needle to the membrane.

1. Fill the syringe with a volume of air equal to the sample size. For low-volume samples, fill the syringe with a volume of air approximately equal to two times the sample volume.
2. With the bevel sideways, insert the tip of the needle through another syringe port located at a corner of the cassette. Inject air slowly into the cassette to separate the membranes.
3. Turn the unit so that needle is on the bottom and allow the sample to collect near the port. Withdraw the sample into the syringe (Figure 3).

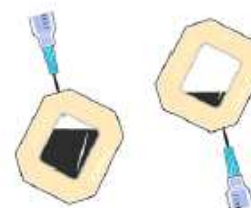


Figure 3. Sample removal

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 968-0747
(815) 968-7316 fax

www.thermoscientific.com/pierce

Detailed Procedure for Adding and Removing Samples

Note: Although quality assurance standards are stringent, there is always a slight chance of leakage. When dialyzing valuable samples, check the cassette for leaks by injecting and removing sterile ultrapure water immediately before adding the sample. Perform all cassette manipulations over a clean, dry work surface.

Note: Use white Slide-A-Lyzer Buoys (Product No. 66430) for 0.5 and 3mL cassettes. Use gray Slide-A-Lyzer Buoys (Product No. 66432) for 3-12mL cassettes.

1. Remove the Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette from its protective pouch by cutting along the dotted line.

Note: To prevent contamination, handle the cassette by the plastic frame only. Do not touch the membrane with ungloved hands. The cassette may be placed into the groove of a buoy for use as a cassette stand.

Note: For cassettes requiring hydration, see Caution (top of Page 1) and Figure 1. Hydration increases membrane flexibility and allows it to adjust more readily to the positive pressure created as the sample is added (Figure 2) and to the vacuum created when air is removed.
2. Attach the hub of the hypodermic needle to the Luer-Lok[®] Fitting of the syringe by firmly screwing it into place.

Note: Do not remove the plastic sheath from the needle until you are ready to fill the syringe with sample. Use caution to avoid injury from the hypodermic needle. Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes are designed for 18-gauge, 1-inch beveled needles (21-gauge, 1-inch beveled needles may also be used).
3. Remove the protective sheath from the hypodermic needle and fill syringe with sample by immersing the needle in the sample and then slowly drawing back on the syringe piston.

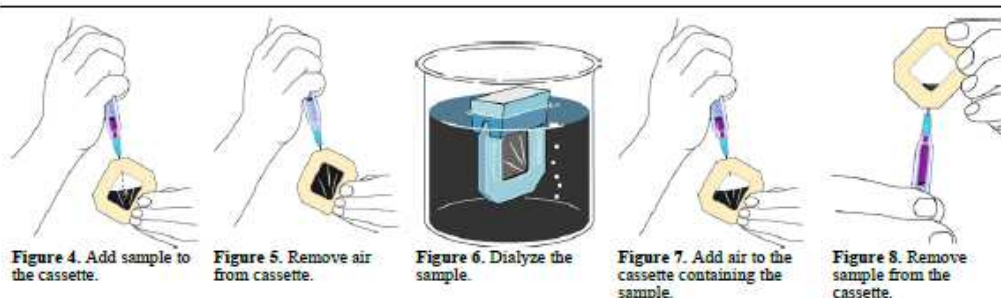
Note: When using small volumes, significant sample loss can occur in the syringe's dead volume or from binding to the syringe surfaces. To minimize sample loss, fill the syringe with a small volume of air before sample uptake and use the air to void the syringe's dead volume. Syringes with low binding potential, such as airtight plastic syringes without rubber or silicon plungers, also might minimize sample loss.
4. Remove cassette from the buoy. Penetrate gasket through one of the syringe ports at a corner of the cassette with the needle and inject sample. Mark the cassette corner with a permanent marker or record the number of the injected port.

Note: If the sample contains $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, use a fill volume that is $\leq 80\%$ of the cassette's total volume.

Caution: Penetrate gaskets to a minimal extent with the needle's beveled portion. Overextending the needle into the cavity may puncture the membrane. Figures 2 and 4 illustrate the proper method for filling the cassette. If the sample has a high protein concentration (e.g., 10mg/mL) fill cassette slowly to avoid foaming.
5. With the needle still in the cassette cavity, draw up on the piston to remove air (Figure 5) and to compress the membrane windows so the sample contacts the greatest surface area. Use caution to prevent the needle from contacting the membrane. Minimal air left inside the cassette with low sample volumes should not significantly affect dialysis efficiency.
6. Remove the syringe needle from the cassette while retaining the air in the syringe. The gasket reseals and the membrane cavity has no (or minimal) air in direct contact with the sample.
7. Slip the cassette into the groove of a buoy and float this assembly in the dialysis solution of choice (Figure 6).

Note: Dialyze for the amount of time sufficient to remove low molecular weight compounds for the specific downstream application. A typical dialysis procedure is as follows: 1) dialyze for 2 hours at room temperature or 4°C; 2) change the dialysis buffer and dialyze for another 2 hours; 3) change the dialysis buffer and dialyze overnight at 4°C. Use the dialysis buffer at 200-500 times the volume of the sample.
8. To remove sample, fill syringe with a volume of air at least equal to the sample size. For low-volume samples, fill syringe with a volume of air approximately equal to two times the sample volume.
9. Penetrate the gasket with the needle through a top, unused syringe guide port. Discharge air into cassette cavity to separate membranes, which prevents needle penetration of the membrane (Figures 3 and 7).

Note: Avoid penetrating the guide ports more than once to prevent gasket coring and subsequent sample loss.
10. Turn the unit so that needle is on the bottom and allow the sample to collect near the port. Withdraw the sample into the syringe (Figure 8).



Dialysis Membrane Chemical Compatibility

Note: The following ratings refer to chemical compatibility with the regenerated cellulose dialysis membrane. The plastic cassette frame and silicone-like gasket may leach, dissolve, deform or otherwise fail in certain strong acids and bases, alcohols, aromatic and chlorinated hydrocarbons and other chemicals (see asterisks in table) that are listed as being compatible with the dialysis membrane. Test solvents with a cassette before attempting to dialyze valuable samples.

Acetic acid, 25%	G	Ethyl acetate	G*	Nitric acid, <5%	G
Acetone	G*	Ethylene glycol	G	Nitric acid, >25%	N
Ammonium hydroxide, 1 N	F	Formaldehyde solution, 30%	G	Perchloric acid, 25%	N
Ammonium hydroxide, 25%	F	Formic acid, 100%	G*	Phosphoric acid, 25%	F
Ammonium sulfate, 1 M	G	Formic acid, 25%	G*	Potassium hydroxide, 1 N	N
Amyl acetate	G*	Hexane	G*	Propylene glycol	G
Benzene	G*	Hydrochloric acid, < 5%	G	Sodium hydroxide, 0.1 N	G
Benzyl alcohol	G*	Hydrochloric acid, >25%	N	Sodium hydroxide, 1 N	F
Butanol	G*	Hydrofluoric acid, 25%	F	Sulfuric acid, < 5%	G
Butyl acetate	G*	Hydrogen peroxide, 30%	G	Sulfuric acid, > 25%	N
Carbon tetrachloride	G*	Iodine solutions	N*	Tetrahydrofuran	G*
Chloroform	G*	Isopropyl alcohol	G	Toluene	G*
Dimethylformamide	F*	Methanol, < 50%	G*	Trichloroacetic acid, < 10%	F
Dioxane	F	Methyl acetate	G*	Trichloroacetic acid, > 25%	N
Ethanol, 70%	G	Methyl ethyl ketone	G*	Trichloroethylene	G*
Ethanol, 95%	G	Methylene chloride	G*	Xylene	G*

Legend: G = Good resistance; F = Fair resistance (pore swelling may occur); N = Not recommended
 *Chemicals known to adversely affect the plastic cassette frame; brief or dilute exposure might be compatible.

Thermo Scientific Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette Product Numbers and Descriptions

Cassette Size	Membrane Molecular-Weight Cutoff (MWCO)				
	2000	3500	7000	10,000	20,000
0.1-0.5mL*	66205 (10-pk)	66333 (10-pk) 66335 (Kit)	66373 (10-pk) 66375 (Kit)	66383 (10-pk) 66385 (Kit) 66454 (GI)	66005 (10-pk)
0.5-3mL	66203 (10-pk)	66330 (10-pk) 66332 (Kit)	66370 (10-pk) 66372 (Kit)	66380 (10-pk) 66382 (Kit) 66455 (GI)	66003 (10-pk)
3-12mL	66212 (8-pk)	66110 (8-pk) 66107 (Kit)	66710 (8-pk) 66707 (Kit)	66810 (8-pk) 66807 (Kit) 66453 (GI)	66012 (8-pk)
12-30mL	66230 (6-pk)	66130 (6-pk)	NA	66830 (6-pk) 66456 (GI)	66030 (6-pk)

Kits include package of cassettes, plus an equal number of float buoys, syringes and needles.

GI = Gamma (γ) Irradiated package of cassettes.

NA = Not Available.

*2K MWCO cassettes in this size are best used for 0.2-0.5mL samples.

Thermo Scientific Slide-A-Lyzer Membrane Specifications

MWCO	Suggested Hydration	Glycerol Content	Sulfur Content	Heavy Metals Content
2K	2 min. for all volumes	None	0.100%	Trace
3.5K	1 min. for all volumes	None	0.1-0.15%	Trace
7K	1 min. for low volumes	~ 13%	0.1-0.15%	Trace
10K	1-2 min. for all volumes	~ 21%	0.1-0.15%	Trace
20K	1 min. for low volumes	None	0.04%	Trace

Additional Information Available from Our Website

- Tech Tip #20: Dialysis: an overview
- Tech Tip #14: Perform labeling and other reactions in Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes
- Tech Tip #43: Protein stability and storage
- Tech Tip #6: Extinction coefficients guide
- Tech Tip #19: Remove detergent from protein samples
- Tech Tip #54: Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette and MINI Unit dimensions

Related Thermo Scientific Products

87730	Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes, 10K MWCO, 3mL, 10 each
87731	Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes, 10K MWCO, 15mL, 8 each
66494	Slide-A-Lyzer Syringe (1mL) and 18-Gauge Needles, 10 each
66490	Slide-A-Lyzer Syringe (5mL) and 18-Gauge Needles, 10 each
66493	Slide-A-Lyzer Syringe (20mL) and 18-Gauge Needles, 10 each
66430	Slide-A-Lyzer Buoys (White), for 0.5 and 3mL cassettes, 10 pack
66432	Slide-A-Lyzer Buoys (Grey), for 3-12mL cassettes only, 8 pack
66431	Slide-A-Lyzer Carousel Buoy, for 0.5 and 3mL cassettes (1 each)
66528	Slide-A-Lyzer Concentrating Solution, 200mL

Luer-Lok is a trademark of Becton-Dickinson.

This product ("Product") is warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation") and to be free from defects in material and workmanship. Unless otherwise expressly authorized in writing, Products are supplied for research use only. No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the original purchaser of the Product ("Buyer").

No other warranties, express or implied, are granted, including without limitation, implied warranties of merchantability, fitness for any particular purpose, or non infringement. Buyer's exclusive remedy for non-conforming Products during the warranty period is limited to replacement of or refund for the non-conforming Product(s).

There is no obligation to replace Products as the result of (i) accident, disaster or event of force majeure, (ii) misuse, fault or negligence of or by Buyer, (iii) use of the Products in a manner for which they were not designed, or (iv) improper storage and handling of the Products.

Current product instructions are available at www.thermoscientific.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2011 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.