



HÁSKÓLINN Í REYKJAVÍK
REYKJAVÍK UNIVERSITY

EINANGRUN Á HÝALÚRONIDASAGENI
ÚR SMÁMÝI. HÝALÚRONIDASI ER LÍKLEGUR
OFNÆMISVAKI Í SUMAREXEMI Í HESTUM

Sigríður Kristín Rúnarsdóttir

Lífeindafræði

Umsjónarkennari: Martha Á. Hjálmarsdóttir
verkfræðideild
Leiðbeinandi: Sigurbjörg Þorsteinsdóttir
Vilhjálmur Svansson

Tækni- og
Vor 2007

Efnisyfirlit

1. INNGANGUR	1
1.1 SUMAREXEM Í HESTUM	1
1.1.1 EINKENNI	2
1.1.2 ORSAKAVALDUR OG ÁHÆTTUÞÆTTIR	2
1.1.3 MEÐFERÐ	3
1.2 ÓNÆMISKERFIÐ	4
1.2.1 LÍFFÆRI OG FRUMUR ÓNÆMISKERFISINS	4
1.2.2 MEÐFÆDDA ÓNÆMISKERFIÐ	6
1.2.3 ÁUNNA ÓNÆMISKERFIÐ	7
1.2.4 ÓNÆMISVAKAR OG ÓNÆMISSVAR	7
1.2.5 OFNÆMISVAKAR OG OFNÆMISSVAR	8
1.2.6 OFNÆMI AF GERÐ Í	10
1.3 SMÁMÝ	11
1.4 OFNÆMISVAKAR Í BIT- OG STUNGUFLUGUM	12
1.5 HÝALÚRONIDASI	15
1.5.1 FLOKKUN HÝALURONIDASA OG VIRKNI	15
1.5.2 ÞRÍVÍDDARBYGGING HÝALÚRONIDASA	16
1.5.3 VIRKNI HÝALÚRONIDASA Í BITFLUGUM	17
1.7 AÐFERÐAÐFRÆÐI	18
1.7.1 GERÐ CDNA SAFNS	18
1.7.2 HÖNNUN VÍSA	18
1.7.3 KEÐJUVERKANDI FJÖLLIÐUN, PCR - HOT START PCR	18
1.7.3 RAFDRÁTTUR Á AGARÓSAHLAUPI	21
1.7.4 RAÐGREININGAR PCR OG RAÐGREINING	22
2. MARKMIÐ VERKEFNIS	23
3. EFNI OG AÐFERÐIR	24
3.1 KEÐJUVERKANDI FJÖLLIÐUN (PCR)	26
3.2 RAFDRÁTTUR PCR AFURÐAR Á AGARÓSAHLAUPI	27
3.3 PCR AFURÐA RAFDRÁTTUR OG ODDA PCR	29
3.3.1 PCR AFURÐA RAFDRÁTTUR	29
3.3.2 ODDA PCR	30
3.4 BIGDYE RAÐGREININGAR PCR	32
3.4.1 HREINSUN PCR AFURÐAR MEÐ EXOSAP	32
3.4.2 LJÓSMÆLING EXOSAP AFURÐAR	33
3.4.3 RAÐGREININGAR PCR	34
3.4.4 HREINSUN Á BIGDYE SÝNUM FYRIR RAÐGREININGU	35
3.5 ÚRVINNSLA Á NIÐURSTÖÐUM	36
4. NIÐURSTÖÐUR	37

4.1 NIÐURSTÖÐUR ÚR KEDJUVERKANDI FJÖLLIÐUN (PCR)	37
4.2 NIÐURSTÖÐUR ÚR RAÐGREININGU	53
4.3 NIÐURSTÖÐUR – SAMANTEKT	57
5. UMRÆÐUR	60
VIÐAUKI I	64
VIÐAUKI II	65
VIÐAUKI III	66
VIÐAUKI IV	67
VIÐAUKI V	68
VIÐAUKI VI	72
VIÐAUKI VII	76
VIÐAUKI VII	76
VIÐAUKI VIII	79
VIÐAUKI IX	86
ÞAKKIR	87
6. HEIMILDASKRÁ	88

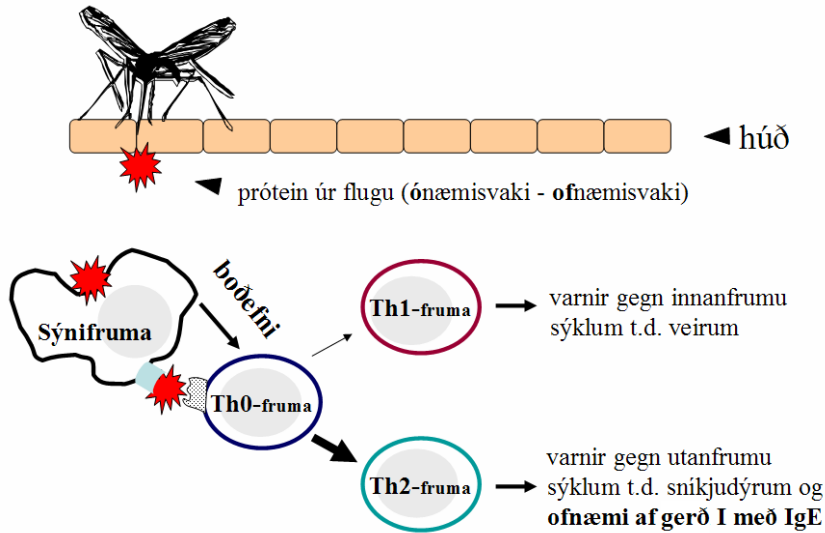
Listi yfir skammstafanir

ADP	Adenine diphosphat
as	Amínósýrur
bp	Base pair (basapör)
cDNA	Complementary DNA
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate: dATP, dTTP, dCTP, dGTP
ddNTP	Dideoxyribonucleotide triphosphate: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP
E. coli	Escherichia coli
EBR	Ethidíum brómíð
Fw	Forward (áfram)
HA	Hyaluronic acid (hýaluronsýra)
HGS	Hyaluroglucosaminidase (hýlúronidasi)
IFN	Interferon (frumuboði)
Ig	Immunoglobulin (ónæmisglóbúlín: byggingarheiti mótefna)
IL	Interleukin (hvítfrumuboðefni)
kb	Kilo bases (kílóbasar)
KDa	Kilo-Dalton
min	Mínútur
MHC	Major histocompatibility complex (vefjaflokkasameind)
PCR	Polymerase chain reaction (keðjuverkandi fjölliðun)
PGD	Prostaglandin (bólgumiðlandi efni)
LTC	Leukotrin (bólgumiðlandi efni)
Rev	Reverse (afturábak)
rpm	Rounds per minute (hringir á mínútu)
RSB	Restriction stop buffer
sek	Sekúndur
Spp.	Species (tegundir)
TA	Annealing temperarture (bindihitastig)
TBE	Tris-borat EDTA
TNF	Tumor necrosis factor (boðefni)
TM	Melting temperature (bræðsluhitastig)

1. Inngangur

1.1 Sumarexem í hestum

Sumarexem (equine insect bite hypersensitivity eða sweet itch), er langvinnur árstíðarbundinn húðsjúkdómur í hestum, vegna ofnæmisviðbragða af völdum smámýs af ættkvíslinni *Culicoides* (Broström, Larsson, & Troedsson, 1987; Halldórsdóttir, Lazary, Gunnarsson, & Larsen, 1991). Við bit spýtir flugan inn próteinum sem valda ofnæmi af gerð I (hypersensitivity type I) sem er bráðaofnæmi og því fylgir framleiðsla á IgE mótefnum (Anderson, Belton, & Kleider, 1988; Wilson, Harwood, Björnsdóttir, Marti, & Day, 2001). Á seinni stigum ber líka á ofnæmi af gerð IV (hypersensitivity type IV) sem eru síðbúin ofnæmisviðbrögð (delayed hypersensitivity) (Fadok & Greiner, 1990; Halldórsdóttir & Larsen, 1989). Í ofnæmissvari framleiða og losa mastfrumur (mast cells) og basafrumur (basophiles) histamín, sulfidoleukotriene og aðra bólgubætti (Marti et al., 1999).



Mynd 1. Sumarexem af völdum smámýs próteina

Smámýið bitur hestinn og spýtir inn próteinum sem valda T_H2 ónæmissvari. Ónæmissvarið verður að ofnæmissvari með framleiðslu IgE mótefna. Mynd eftir Sigurbjörgu Þorsteinsdóttur.

1.1.1 Einkenni

Fyrstu sjáanlegu einkennum sumarexems lýsa sér með litlum sárum á húð hesta, sem myndast þegar þeir nudda sér upp við hluti í umhverfinu vegna kláða af völdum flugnabitsins. Með tímanum geta sárin orðið stærri og sýking komist í þau. Önnur hefðbundin einkennum eru þykkun húðar, hárlós og hrúðurmyndun sem verður vegna endurtekinna ofnæmisviðbragða. Sárin eru oftast við fax, tagl og bóga/herðarkamb en einnig á kviði, höfði, síðum, háls og bringu (Anderson et al., 1988; Björnsdóttir, Sigvaldadóttir, Broström, Langvad, & Sigurðsson, 2006).

1.1.2 Orsakavaldur og áhættuþættir

Faraldsfræðileg rannsókn sem var gerð á árunum 1997-1998 í Danmörku, Svíþjóð og Þýskalandi sýndi að yfir 50% íslenskra hesta, sem hafa verið fluttir út, fá sumarexem eftir tveggja ára dvöl í nýjum heimkynnum, ef þeir eru á flugusvæðum og ekki varðir gegn smámýinu (Björnsdóttir et al., 2006). Aðeins 6-9% íslenskra hesta sem eru fæddir erlendis, þjást af sumarexemi (Broström et al., 1987; Halldórsdóttir & Larsen, 1991; Reiher, 2004). Tíðni sumarexems fer eftir hversu mikið hestarnir eru útsettir fyrir smámýinu. Í því sambandi skiptir máli fjöldi ára frá útflutningi þeirra, lífsskilyrði fyrir smámýið í beitilöndunum svo sem ræktun beitilands, rakastig á beitilandi, skjól og opin vatnssvæði, en smámýið þrífst best í heitu og röku umhverfi (Björnsdóttir et al., 2006; Blackwell, 2001). Samanburðarrannsókn á öðrum kynjum hesta á sömu svæðum hefur ekki verið gerð, en talið er að þættir eins og breytt umhverfi, breytt veðráttu, ný flóra auk álags vegna flutninga hafi neikvæð áhrif á ónæmiskerfi íslensku hestanna sem gerir þá berskjaldaða (Björnsdóttir et al., 2006).

Flest hestakyn geta fengið sumarexem en algengi er misjafnt á milli landa og landsvæða. Sjúkdómurinn er ekki þekktur í hestum á Íslandi þar sem smámý lifir ekki þar (Björnsdóttir et al., 2006). Á hinn bóginn er bitmý (*Simulium vittatum*, „black fly“) algengt. Bitmýið bítur spendýr og þó það valdi ekki sumarexemi er helmingur hesta sem eru með sumarexem líka komnir með ofnæmi gegn bitmýi. Þetta bendir til sameiginlegra ofnæmisvaka í *Culicoides* spp. og *Simulium* spp. Ástæðan fyrir því að hestar á Íslandi fá ekki sumarexem getur verið sú að þeir eru útsettir fyrir bitmýi í mun

styttri tíma en hestar sem dvelja annars staðar í Evrópu og eru bitnir af smámýi. Á Íslandi lifir bitmýið einungis 2-3 mánuði á ári og einkum við straumvatn, auk þess sem veðráttá í landinu er því óhagstæð (Hellberg et al., 2006).

1.1.3 Meðferð

Það er ekki til nein meðferð við sumarexemi í hestum en reynt hefur verið að notast við antihistamín lyf í bráða tilvikum. Lyfin virka mjög takmarkað þar sem þau hindra einungis virkni histamíns, sem er bólgumiðlandi efni, en við bráðaofnæmi losna einnig önnur bólgumiðlandi efni svo sem sertónín, kínín og prostaglandín. Notkun á glúkórcorticósteróíðum hefur borið ágætis árangur í sumum tilfellum, en þau virka bólgueyðandi. Ókostur við notkun þeirra er að langvarandi notkun á cortíkósterum getur valdið bælingu á ónæmiskerfinu sem getur leitt til sýkinga auk annarra aukverkana sem langvarandi steranotkun getur orsakað (Anderson et al., 1988). Einnig er notast við róandi smyrsl (sterar + staðdeyfilyf) til að draga úr einkennum (Blackwell, 2001).

Besta leiðin til að halda einkennum niðri er að hindra aðgengi smámýsins að hestunum. Flestar tegundir *Culicoides* eru virkastar við sólarupprás og sólsetur á sumrin og því er mælt með því að hafa hestana í húsi á þeim tíma sólarhringsins. Einnig er ráðlegt að halda hestunum á vindasömum, þurrum beitolöndum, eða nota sérútbúnað á breiðum á þá og hindra þar með aðgengi flugnanna að þeim (Anderson et al., 1988; Björnsdóttir et al., 2006).



Mynd 2. Sumarexems hestur

Hestur með ábreiðu til varnar smámýsbiti. Mynd frá Sigurbjörgu Þorsteinsdóttur.

1.2 Ónæmiskerfið

Ónæmiskerfið er varnarkerfi líkamans gegn sýklum og öðrum meinvöldum. Það eru ákveðin líffæri og frumur sem taka þátt og tilheyra ónæmiskerfinu. Í hryggdýrum er ónæmiskerfinu skipt í tvo þætti, meðfædda og áunna ónæmiskerfið, sem vinna saman við að vernda líkamann gegn sýklum sem eru honum skaðlegir (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a).

1.2.1 Líffæri og frumur ónæmiskerfisins

Frumur ónæmiskerfisins eru upprunnar frá blóðmyndandi stofnfrumum í beinmerg sem skiptast í mergfrumuforvera og eitifrumuforvera. Sumar frumutegundir þroskast í beinmergnum en aðrar fara með blóði til annarra líffæra og ná fullum þroska þar (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a).

Mergfrumuforverar eru forverar kornfruma (granulocytes), stórátfruma (macrophages), angafruma (dendritic cells) og mastfruma (mast cells) meðfædda ónæmiskerfisins. Stórátfrumur eru ein þriggja tegunda átfruma og eru dreifðar út um alla líkamsvefi. Þær þroskast úr einkjörnungum (monocytes) í stórátfrumur við það að

fara úr blóði yfir í vefi þar sem þær virkjast. Angafrumur eru sérhæfðar í því að taka upp ónæmisvaka í blóði og tjá þá á yfirborði sínu svo að T- eitilfrumur geti greint þá. Mastfrumur þroskast í vefjum. Þær halda sig aðallega nálægt litlum æðum og þegar þær virkjast losa þær frá sér efni sem hefur áhrif á gegndræpi æða. Mastfrumur eru best þekktar fyrir hlutverk sitt í ofnæmissvari en þær eru einnig taldar skipta máli í að vernda yfirborð slímhúða gegn meinvöldum. Kornfrumum er skipt í þrjár tegundir; dauffrumur (neutrophiles), sýrufrumur (eosinophiles) og basafrumur (basophiles). Framleiðsla kornfruma eykst í ónæmissvari en líftími þeirra er stuttur. Dauffrumur eru átrumur og eru lang algengastar og mikilvægastar í meðfæddu ónæmisviðbragði. Sýrufrumur eru taldar gegna mikilvægu hlutverki í sníkjudýrasýkingum. Basafrumur eru taldar gegna svipuðu hlutverki og mastfrumur (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a).

Eitilfrumuforverar eru forverar eitilfruma (lymphocytes) og náttúrulegra drápsfruma (natural killer cells, NK). Eitilfrumur skipast í B-eitilfrumur og T-eitilfrumur. B-eitilfrumur þroskast í mótefnamyndandi plasmafrumur þegar þær virkjast en T-eitilfrumur skiptast í tvo flokka T-fruma; CD4 jákvæðar (CD4⁺) T-hjálparfrumur og CD8 jákvæðar (CD8⁺) T-drápsfrumur (cytotoxic T cells). CD4⁺ T-hjálparfrumur skiptast í tvo undirflokkar. Annar undirflokkurinn nefnist T_{H1} frumur, og hinn T_{H2} frumur. Ofnæmi af gerð I er á T_{H2} braut. CD4⁺ T- hjálparfrumur framleiða ónæmisboðefni (cytokines) og flakkboða (chemokines) í ónæmissvari. Þær bregðast við innanfrumusýklum með því að virkja stórátfrumur og T-drápsfrumur sem drepa veirusýktar frumur. Við utanfrumusýklum virkja þær aðallega mótefnaframleiðslu B-fruma (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a).

Líffærum ónæmiskerfisins er skipt í frumeitilvefi; beinmerg og hóstarkirtil (thymus), þar sem eitilfrumur eru virkjaðar, og eitilvefi; eitlar og milta, þar sem ónæmissvar áunna ónæmiskerfisins hefst og eitilfrumum er viðhaldið. Bæði B-frumur og T-frumur myndast í beinmerg en B-frumur þroskast í beinmerg en T- frumur ferðast með blóði til hóstarkirtils og þroskast þar (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a).

1.2.2 Meðfædda ónæmiskerfið

Meðfædda ónæmiskerfið er fyrsta varnarkerfi líkamans sem greinir innrásaraðila sem sýkil og ræsir ónæmiskerfið til varnar. Það greinir líka á milli mismunandi tegunda sýkla. Kerfið er samsett úr nokkrum mismunandi varnarþáttum og varnarþröskuldar eins og húð, slímhúð, munnvatn, tárökvi og lágt sýrustig meltingarvegarins eru mjög virkir þættir. Ef sýkill kemst aftur á móti innfyrir þessa þröskulda taka frumur og efnarþættir meðfædda ónæmiskerfisins við. Efnarþættir eru til dæmis leysiensím, interferón, defensin og magnakerfið (complement system) (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005c; Ledin, 2004).

Frumur meðfædda ónæmiskerfisins eru átfrumur sem bindast, gleypa og melta meinvalda. Helstu átfrumurnar eru stóráttfrumur og dauffrumur. Aðrar mikilvægar frumur sem taka þátt í meðfæddu ónæmissvari eru náttúrulegar drápsfrumur sem hafa það hlutverk að virkja stóráttfrumur og drepa sýktar frumur og krabbameinsfrumur, auk sýrufruma sem seyta efnum úr granúlum sínum á sýkla sem eru of stórir til að hægt sé að gleypa þá (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005c; Ledin, 2004).

Það sem virkjar meðfædda ónæmiskerfið eru ákveðin mynstur á yfirborði sýkla svo sem fitufjölsykrungar (lipopolysaccharides) á gram neikvæðum bakteríum eða ómetýleruð CpG stef. Þessi mynstur geta virkað sem bindlar sem bindast Toll viðtökum (Toll-like receptors) á yfirborði varnarfruma svo sem stóráttfruma, dauffruma og angafruma. Aðrir virkjunarþættir geta verið áthúðun af völdum magnapróteinsins C3b, mótefna eða lektína (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005c; Ledin, 2004).

Einn helsti eiginleiki meðfædda ónæmiskerfisins er sá hversu fljótt það bregst við innrás sýkils. Flestar þær frumur og efnarþættir sem taka þátt í ónæmissvari eru þegar til staðar á þeim stöðum sem sýkilinn getur mögulega komist inn. Ræsing meðfædda ónæmiskerfisins er undanfari ræsingar á áunna ónæmiskerfinu (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005c; Ledin, 2004).

1.2.3 Áunna ónæmiskerfið

Áunna ónæmiskerfið einkennist af ónæmisminni sem nýtist í endurteknum sýkingum af sama sýkli og er undirstaða bólusetninga. Kerfið er þar að auki mjög sérvirkt, greinir á milli allra hugsanlegra gerða af ónæmisvökum og getur greint á milli eigin og framandi sameinda (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a; Ledin, 2004).

Áunna ónæmiskerfinu er skipt í tvö kerfi; vessabundna ónæmiskerfið og frumubundna ónæmiskerfið. B-frumur, sem framleiða mótefni, tilheyra vessabundna ónæmiskerfinu og T-frumur sem tilheyra frumubundna ónæmiskerfinu. Báðar frumutegundirnar þekkja ákveðna ónæmisvaka með hjálp himnubundna viðtaka sem þær hafa á yfirborði sínu. Hver og ein eitifruma tjáir einungis eina tegund viðtaka á yfirborði sínu sem þekkir eina tegund ónæmisvaka (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a; Ledin, 2004).

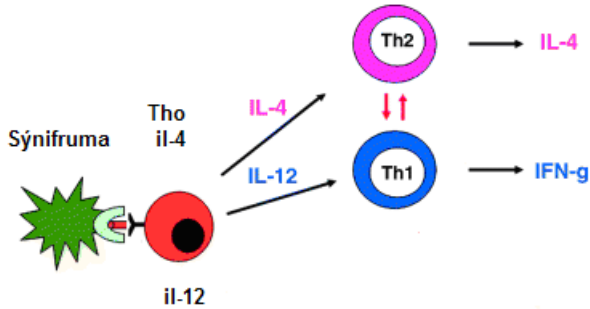
1.2.4 Ónæmisvakar og ónæmissvar

Ónæmisvakar eru hverskonar efni sem áunna ónæmiskerfið bregst við með ónæmissvari sem er T-frumusvar og mótefnasvar. Ónæmisvakar eru oftast prótein en geta einnig verið kolvetni, kjarnsýrur og fleiri sameindir (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a).

Þegar angafruma tekur upp ónæmisvaka brýtur hún hann niður í peptíð sem hún flytur aftur út á yfirborð sitt og umbreytist við það í sýnifrumu (antigen presenting cell). Peptíðin bindast á annaðhvort MHC I eða MHC II sameindir (major histocompatibility complexes) sem síðan bindast viðtökum T-fruma og virkja þær. CD4⁺ T-hjálparfrumur bindast ónæmisvaka sem er á MHC II sameind á sýnifrumu, og taka þátt í örvun B-frumu þroskunar og sérhæfingu vessabundins ónæmis. Þær sjá líka um að virkja T-drápsfrumur og stórátfrumur í frumubundnu ónæmi. CD8⁺ T-drápsfrumur bindast ónæmisvaka sem er á MHC I sameind á sýnifrumu og drepa veirusýktar frumur og krabbameinsfrumur með frumurofi (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a; Ledin, 2004).

T-frumur framleiða ónæmisboðefni sem eru próteinsameindir með lítinn mólþunga. T-hjálparfrumur í hvíld framleiða ekki ónæmisboðefni en þegar þær virkjast

verða þær að T_H0 frumum sem síðar sérhæfast í T_H1 frumur eða T_H2 frumur eftir því hvert sýnifruma stýrir þeim. T_H1 ónæmissvar tekur aðallega þátt í frumubundnu ónæmi en T_H2 ónæmissvar tekur þátt í örvun á vessabundnu ónæmi með framleiðslu mótefna (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005a; Ledin, 2004).



Mynd 3. Ónæmissvar

Sýnifruma (angafruma) sýnir T_H0 hjálparfrumu ónæmisvaka, og stýrir henni með boðefnum sem T_H0 hjálparfruma bregst við. IL-4 stýrir ónæmissvari inná T_H2 braut sem T_H2 frumur framleiða meðal annars sjálfar, en einnig mastfrumur og basafrumur. Ónæmisboðefnið IL-12, sem meðal annars stórátfrumur og angafrumur framleiða, veldur sérhæfingu T_H0 fruma í T_H1 frumur. Innanfrumu bakteríur og veirur valda einnig T_H1 ónæmissvari. IFN- γ (g) sem T_H1 frumur framleiða veldur frumubundnu ónæmi með virkjun stórátfruma, dauffruma og T-drápsfruma. Einnig örvar boðefnið IgG mótefnamyndun sem örvar frumuát ónæmisvaka. Svartar örvar tákna jákvæða virkni en rauðar örvar tákna hamlandi virkni. Mynd breytt frá Romagnani, 2006. Myndatexti frá Ledin, 2004.

1.2.5 Ofnæmisvakar og ofnæmissvar

Ofnæmisvaki er ónæmisvaki sem ónæmiskerfið ætti ekki að bregðast við undir eðlilegum kringumstæðum. Ofnæmisvakar valda því ofnæmissjúkdómum þar sem ónæmiskerfið bregst við skaðlausum vaka með myndum IgE mótefna (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005b). Það eru nokkur atriði sem ofnæmisvakar eiga sameiginlegt;

Stærð: Ofnæmisvakar eru oft lítil prótein eða þættir (15-40 kDa) tengdir próteinum (Ledin, 2004).

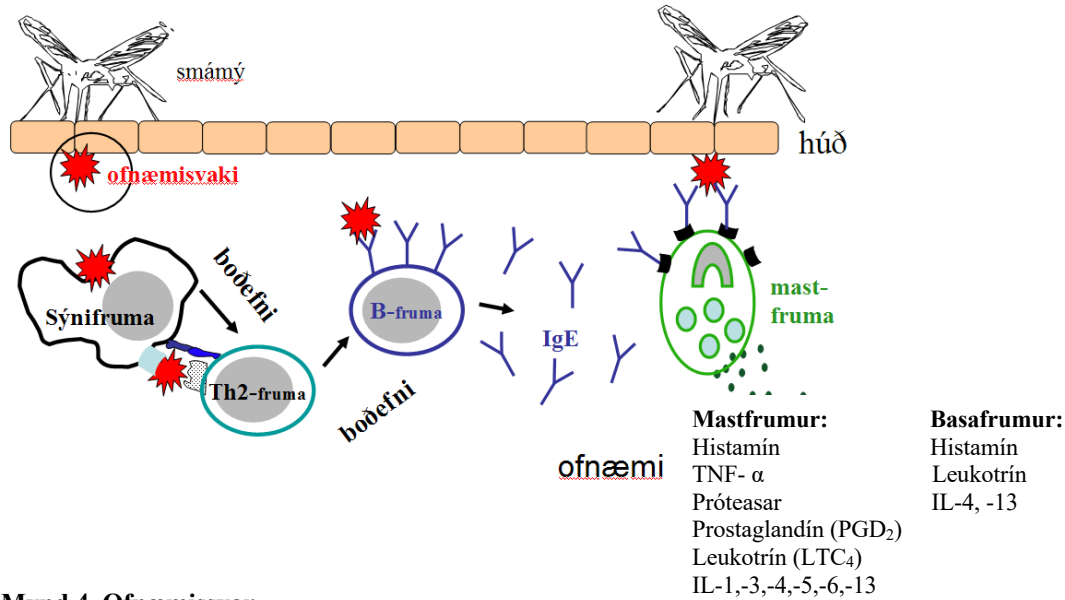
Skammtastærð: Útsetning fyrir mörgum litlum skömmtum af vaka hefur oft meiri áhrif heldur en fáir stórir skammtar (Ledin, 2004).

Innkomuleið: Ofnæmisvakar sem komast inn fyrir varnarþröskulda líkamans vekja oftast IgE mótefnasvar ef þeir koma inn um húð eða öndunarveg, heldur en um

meltingarveg (intraperiotenal = innankviðarhols) (Ledin, 2004). Algengir ofnæmisvakar eru ensím, en líffræðileg virkni þeirra auðveldar þeim innrás (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005b).

Ónæmisglæðir: Ofnæmisvakar sem gefnir eru í litlum skömmtum með alum geta auðveldlega orðið ofnæmisvakar þar sem alum er T_H2 stýrandi ónæmisglæðir (Ledin, 2004).

Til þess að vaki geti valdið ofnæmi þarf einstaklingur að verða útsettur fyrir honum að minnsta kosti tvisvar sinnum. Ofnæmissvari er því hægt að skipta í tvö stig sem eru næming og svörun. Þegar ónæmiskerfið kemst í kynni við ofnæmisvaka í fyrsta sinn tekur sýnifruma hann upp og brýtur hann niður í peptíð sem bindast MHC II sameind. Í eitlum stýrir sýnifruma ónæmissvarinu inná T_H2 braut og ofnæmisvaka sértækar B-frumur framleiða IgE mótefni. IgE mótefnin fara síðan út í blóðið þar sem þau bindast viðtökum (FcεRI) á yfirborði mastfruma í vefjum og basafruma í blóði. Þessi frumbinding veldur næmingu. Þegar ónæmiskerfið verður vart við ofnæmisvakann aftur síðar, fara einkenni ofnæmis að gera vart við sig. Ofnæmisvakinn ræsir mastfrumur og basafrumur með því að krossbinda IgE á yfirborði þeirra sem síðan veldur losun á þeim efnum úr frumunum sem valda einkennum ofnæmis, sjá mynd 4 (Janeway, C. A. jr., Travers, Walport, & Shlomchik, 2005b; Ledin, 2004).



Mynd 4. Ofnæmissvar

Histamín veldur auknu gegndræpi æða, próteasar brjóta niður vefjabyggingar, IL-3 örvar fjölgun mastfruma, PGD₂ veldur berkjusamdrætti og gerir dauffrumum viðvart á meðan LTC₄ örvar slím framleiðslu. Mastfrumur eru aðallega bundnar við yfirborð vefja og eru tiltölulega langlífir en basafurumur ferðast um með blóði og hafa stuttan líftíma. Mynd endurbætt frá Sigurbjörgu Þorsteinsdóttur. Myndatexti frá Ledin, 2004.

1.2.6 Ofnæmi af gerð I

Ofnæmi af gerð I er svokallað bráðaofnæmi þar sem einkenni geta komið fram á mjög stuttum tíma eftir að ofnæmisvaki hefur ræst ónæmiskerfið. Framleiðsla IgE mótefna er eitt helsta merki um bráðaofnæmi sem veldur losun bólguþátta og annarra efna úr mastfrumum og basafurumum. Helmingunarlíftími IgE mótefna í sermi er mjög stuttur en mótefnin eru bundin mótefnaviðtökum á mastfrumum eða basafurumum í vikur eða jafnvel mánuði (Ledin, 2004). Það getur skýrt af hverju sumir hestar með sumarexem hafa einkenni á veturna þrátt fyrir að smámýið sé ekki á kreiki á köldustu mánuðum ársins (Anderson et al., 1988). Síðbúið ofnæmissvar sem er T-frumu miðlað fylgir oft bráðaofnæmi (Ledin, 2004).

1.3 Smámý

Ættkvíslin *Culicoides* tilheyrir ætt lúsmýa (Ceratopgonidae) sem eru tvívængjur (diptera). Um það bil 1400 tegundir eru þekktar innan ættkvíslarinnar og eru þær dreifðar nánast um allan heiminn nema á Norðuheimskautslandi, Suðurheimskautslandi, Nýja Sjálandi og í syðstu hluta SuðurAmeríku (Blackwell, 2001).

Culicoides eru bitflugur og eru um 50 tegundir innan ættkvíslarinnar þekktar sem svokallaðir ferjur¹ fyrir sýkla og sníkjudýr í menn og aðrar lífverur (Blackwell, 2001). Flugan er ekki nema um 0,5 µg að þyngd, 1-2 mm að lengd og vængjalengd hennar er um 1-2 mm (Blackwell, 2001; Featherstone, 2006; Nielsen & Nielsen, 2002). Vegna stærðar sinnar þrífst flugan best í heitu (>10°C), röku og lygnu umhverfi. Tegundirnar þrífast við mismunandi aðstæður og eru því mismunandi eftir landsvæðum. Til dæmis er tegundina *Culicoides nubeculosus* aðallega að finna á beitolöndum og fjölgar flugan sér í taði (Blackwell, 2001).

Smámý er skæðast frá maí til september, þegar heitt er í veðri (Featherstone, 2006). Flugurnar eru virkastar í ljósaskiptum, við sólarupprás og sólsetur, þegar þær nærast (Blackwell, 2001). Fullvaxta flugur nærast aðallega á blómasykri, en einnig á trjåkvoðu og rotnandi plöntum (Featherstone, 2006). Eftir frjóvgun þarf kvenflugan á blóði að halda til að verpa. Misjafnt er á milli smámýstegunda á hvaða dýri kvenflugurnar kjósa að nærast, en ef umhverfisaðstæður eru óhagstæðar eru þær tækifærissinnar og bíta það sem er þeim næst. Vitað er að lyktarskyn og sjónrænir þættir spila inni valið á fæðu og á þetta við um aðrar tegundir bitflugna svo sem bitmý og moskítóflugur (Blackwell, 2001). Kvenflugan notar neðri kjálka og munnlimi til að bíta gat á húð dýrsins. Síðan myndar hún pípu úr munnlimunum sem hún stingur í bitsárið og spýtir inn munnvatni sem inniheldur æðavíkkandi og bólguvaldandi efni ásamt blóðstorkuhindra og sýgur um leið upp blóðið (Featherstone, 2006; Wilson et al., 2001). Um leið og hún hefur lokið við máltíðina losar hún frá sér ferómón, sem er lyktarhormón, sem laðar að aðrar kvenflugur. Kvenflugan getur verpt allt frá nokkrum tugum eggja til hundrað. Egginn klekjast út á innan við sólarhring og fjögur lirlustig

¹ Ferja: smitberi sem ber sýkil frá einum hýsli til annars.

koma í kjölfarið. Fjórða lírfustigið er dvalastig á veturinn og um vorið umbreytist lírfan í púpu í örfáa daga sem þroskast í fullvaxta flugu,(Blackwell, 2001), sem lifir í 20-30 daga (Featherstone, 2006).



Mynd 5. *Culicoides* sp. og *Simulium* sp.

Kvenflugurnar nærast á blóði til að geta verpt. *Culicoides* sp. til vinstri *Simulium* sp. til samanburðar, til hægri. Myndir sóttar þann 10.04.07 af:<http://www.socgenmicrobiol.org.uk/JGVDirect/18705/Figs/F5.jpg> og <http://www3.imperial.ac.uk/portal/pls/portallive/docs/1/889900.JPG>

1.4 Ofnæmisvakar í bit- og stunguflugum

Allt bendir til þess að ofnæmisvakar sumarexems sé að finna í munnvatnskirtlum smámýs kvenflugunnar. Þegar flugan bítur fórnarlamb sitt spýtir hún inn vökva með ýmsum efnum. Prótein seyði úr munnvatnskirtlum *C. variipennis* innihalda blóðstorkuhindra sem kemur í veg fyrir virkni storkufaktors Xa, mólþungi 28 kDa, æðavíkkandi prótein, 22-23 kDa og apýrasa, 35 kDa, sem hindrar ADP-hvetjandi blóðflöguvirkjun. Öll þessi prótein skipta miklu máli fyrir smámýið þegar það nærast og eru öll líkleg til að vera ofnæmisvakar í hrossum sem fá sumarexem (Wilson et al., 2001).

Íslenskir hestar í Sviss voru rannsakaðir til að komast að því hvaða prótein í smámýinu væru að bindast IgE mótefnum í sermi þeirra hesta sem þjáðust af sumarexemi. Fjöldi ofnæmisvaka í munnvatnskirtlum smámýs og mólþungi voru athugaðir með ónæmisþrykki. Seyti úr munnvatnskirtlum *Culicoides nubeculosus* var rafdreigið. Alls voru 68 íslenskir hestar rannsakaðir; 42 sumarexemshestar og 26 heilbrigðir hestar til samanburðar. Fimm prótein, 48, 47, 22, 15 og 13 kDa, bundu IgE

úr 50% eða fleiri af sumarexemshestunum og eru því talin vera aðalofnæmisvakar (major allergens). Prótein með mólþunga 32 og 19 kDa bundu IgE úr þriðjungi hestanna og 7 hestar af 42 með sumarexem höfðu IgE sem bast próteini með mólþunga 75 kDa. Einn hestur sem sýndi engin einkenni sumarexems hafði einnig IgE sem batt 75 kDa próteinbandið og greindist nokkrum mánuðum síðar með exem. Í heildina voru tíu IgE bindandi prótein í munnvatnskirtlum flugunnar með mólþunga 75, 66, 52, 48, 47, 32, 22/21, 19, 15, 13/12 kDa. Tvö, 66 og 52 kDa prótein bundu oftast IgG mótefni í sermi hestanna en IgE mótefni (Hellberg et al., 2006).

Moskítóflugur eru að finna í flestum löndum, og fyrir utan að vera sýklaferjur, valda bit þeirra óþægindum og jafnvel ofnæmi. Ofnæmisvakana eru að finna í munnvatnsseyti flugnanna, en flugur með sundurskorna munnvatnskirtla valda ekki ofnæmi, en þær geta nærst og verpt eggjum. Um það bil 20 prótein hafa verið greind í munnvatni moskítóflugunnar *Aedes aegypti*, sjá töflu 1 (Peng, Estelle, & Simons, 2004):

Tafla 1. *Aedes aegypti* munnvatnsprótein. Greindir ofnæmisvakar í flugunni eru feitiletraðir (Peng et al., 2004).

Prótein nafn	Sameindapungur (kDa)
α -amylasi 1	81,5
Apyrasi	68
α –glukosidasi	67
Esterasi	65
Anticoagulant factor Xa	54
Aed a X ₁	44
Aed a X ₂	37
Female specific prótein, D7 (Aed a 2)	37
Female specific prótein, D7 (Aed a 3)	30
Sialokínin	1,4
Anti-tumor necrosis factor	Óþekkt
Lýsozým	Óþekkt

A. aegypti er talin vera skæðasti moskítóskaðvaldurinn í heiminum og hefur marga sameiginlega ofnæmisvaka með öðrum moskítótegundum, svo sem *Culex pipiens quinquefasciatus* (Peng et al., 2004). Ofnæmisvakinn hýalúronidasi hefur meðal annars fundist í *Cx. quinquefasciatus* (Ribeiro, Charlab, Pham, Garfield, & Valenzuela, 2004).

Fjögur prótein í *A. aegypti* hafa verið greind sem ofnæmisvakar í flugunni og eru feitletruð í töflu 1. Apyrasi er adenosine triphosphate diphosphohydrolasi sem hindrar ADP-hvetjandi blóðflöguvirkjun. Aed a 2, D7 próteinið, er upprunanlega próteinið sem skilgreinir stóra fjölskyldu af D7-skyldum próteinum. Líffræðileg virkni Aed a 3 próteinsins er ekki þekkt, en α -glukosidasi er leysanlegt glýkóprótein sem moskítóflugur seyta þegar þær nærast á sykri og blóði (Peng et al., 2004).

Munnvatnsprótein í tíu moskítótegundum, dreifðum um allan heim, voru rannsökuð. Í heildina fundust 3-16 prótein í hverri tegund sem bundu IgE, úr fólki með moskítóofnæmi, í ónæmisþrykki og voru á bilinu 16-95 kDa (Peng et al., 2004).

Nokkrar tegundir stunguflugna valda ofnæmi í mönnum og dýrum þegar þær stinga. Flugurnar tilheyra ætt æðvængja (Hymenoptera) og eru *Apoidea* (býflugur), *Vespoidea* (wasps, hornets og yellow jackets; vespur og geitungar), og *Formicidae* (fire ants; maurar). Tafla 2 sýnir ofnæmisvakana sem er að finna í þessum skordýrum (Fitzgerald & Flood, 2006).

Tafla 2. Ofnæmisvakar í býflugum, vespum/geitungum og maurum. Megin ofnæmisvakarnir í stunguflugunum eru feitlettraðir (Fitzgerald & Flood, 2006; King & Spangfort, 2000).

Skordýrategund	Ofnæmisvaki
Býflugur	Phospholipasi A₂ Hýalúronidasi Mellitín Acid phosphatasi Mastfrumu degranulating peptíð (Peptíð 401) Minimine Apamín Biogenic amín
Vespur/Geitungar	Phospholipasi A₁ Hýalúronidasi Antigen 5 Biogenic amín Kínín Mastfrumu degranulating peptíð Acid phosphatasi
Maurar	Phospholipasi Biogenic amín Hýalúronidasi Piperidines

Mellitín í býflugum er prótein sem breytir gegndræpi frumuhimna og veldur losun histamíns. Próteinið er talið vera aðal orsakavaldur staðbundins sársauka auk þess veldur það losun katelkóamína sem ásamt phospholipasa A₂ veldur innanæðar rauðkornarofi. Hýalúronidasi breytir gegndræpi frumuhimna og með því að brjóta niður kollagen auðveldar ensímið öðrum ofnæmisvöldum inngöngu í vefi (Fitzgerald & Flood, 2006). Mellitín er um það bil 30-50% af þurrvigarrúmmáli stunguvökva býflugna (bee-venom) en hefur minni ofnæmisvirkni en hýalúronidasi og phospholipasi. Acid phosphatase er glýkóprótein sem getur valdið histamínlosun úr basafrumum (Hoffman, 2006). Peptíð 401 veldur losun bólgubátta úr mastfrumum og apamín er taugaeitur sem verkar á mænuna. Í vespum og geitungum eru það meðal annars kíín sem valda sársauka á stungustað. Aðalofnæmisvaki þessara stunguflugna er antigen 5, en líffræðileg virkni próteinsins er ekki þekkt (Fitzgerald & Flood, 2006).

1.5 Hýalúronidasi

Hýalúronidasar (HGS) er flokkur ensíma sem sjá um niðurbrot hýalúronsýru. Virkni ensímanna tengist einnig niðurbroti brjóskefja og brjósksúlfata (chondroitin sulfates), en sundrunarhvarfið er mun hægvir kara (Stern & Jdrzejjas, 2006).

1.5.1 Flokkun hýaluronidasa og virkni

Hýalúronidösósum er skipt í þrjá megin flokka eftir virkni; tvo flokka af endo- β -N-acetylhexoaminidösósum (hryggdýra-HGS og bakteríu-HGS) og einn flokk af endo- β -glucuronidösósum (blóðsugu-HGS) (Stern & Jdrzejjas, 2006).

Hýalúronidasar hryggdýra nýta sér vatnsrof við niðurbrot hvarfefna. Hvörfín eru innanfrumu sundrunarferli (nonprocessive endolytic process) sem gefa að mestu leyti af sér fjórsýkrur (tetrasaccharides). Í bakteríum eru hýalúronidasaensím sem kallast eliminasar eða lyasar. Eliminasar brjóta niður glýkogen tengi með β -elimination með því að bæta nýju, ómettuðu tengi við sameindina. Endo- β -glucuronidasa er að finna í blóðsugum sem eru liðormar og í vissum krabbadýrum. Lítið er vitað um þennan flokk ensíma en virkni þeirra er talin líkjast meira ensímvirkni hýalúronidasa í hryggdýrum meira en bakteríum (Stern & Jdrzejjas, 2006).

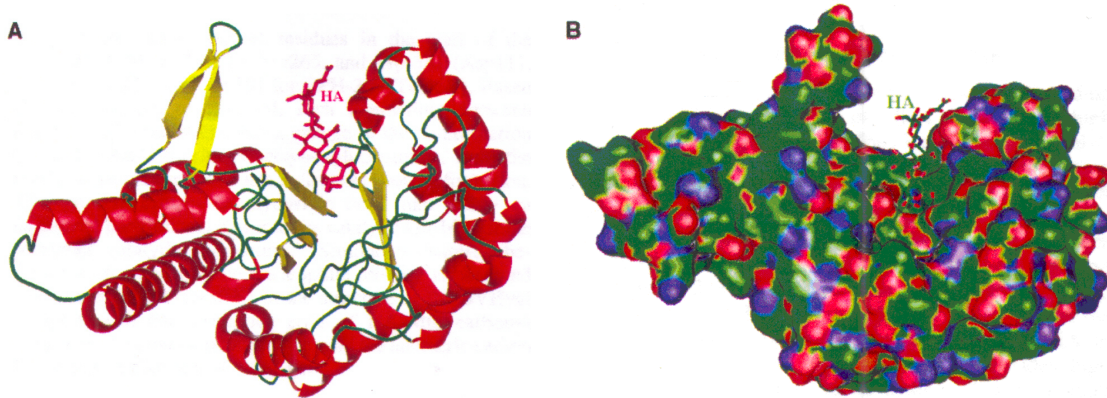
Auk þess sem hýalúronidasasím hryggdýra nýta sér vatnsrof við niðurbrot hvarfefna til hvötunar efnahvarfa þá hafa þau einnig transglycosidasavirkni með getuna til þess að krosstengja hýalúronsýrukeðjur. Að öllum líkindum geta ensímin einnig krosstengt hýalúronsýrukeðjur við keðjur brjóskvefja eða brjóksúlföt en þessi virkni hefur ekki verið nægjanlega rannsökuð og staðfest (Stern & Jedrzejewski, 2006).

1.5.2 Þrívíddarbygging hýalúronidasasa

Birt hefur verið þrívíddarbygging hýalúronidasasa úr stunguvökvakirtlum býflugna (bee venom). Próteinið er hnattlaga og fengust þær upplýsingar með röntgenkristallografi. Byggingin af ensíminu sýnir að rifa liggur þvert yfir sameindina og er nægjanlega stór til að rúma hýalúronsýrufjölliðu. Yfirborð rifunnar er þakið með varðveittum amínósýru afleiðum sem eru að mestum hluta til jákvætt hlaðnar eða vatnsfælnar. Þetta leiðir til þess að hýalúronsýran, sem er neikvætt hlaðin og hefur á yfirborði sínu vatnsfælinn sykruhring, getur bundist. Á annarri hlið raufarinnar er hvetjandi hlið (catalytic site) sem er umlukt örvandi amínósýruafleiðunni Glu113 (glutamic sýra). Niðurbrotshvörfin fara fram í raufinni á ensíminu þar sem hýalúronsýran binst (Stern & Jedrzejewski, 2006).

Viðauki I sýnir samanburð á amínósýruröð hýalúronidasasa býflugunnar *Apis mellifera* og smámýinu *Culicoides sonorensis* (einungis hluti af geninu/próteininu hefur verið raðgreint).

Hýalúronidasi í býflugum hefur svipaða virkni og sama ensím í hryggdýrum. Hýalúronidasar hryggdýra tilheyra flokki ensíma sem eru kolvetnisvirk og tilheyra glycosidase fjölskyldu nr. 56. Höfundar sérútbúins gagnagrunnar sem heldur utan um þessar flokkanir, setja ensím með svipaða DNA röð og próteinbyggingu í sama flokk. Hægt er að nálgast þennan gagnagrunn á vefsíðunni afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html (Stern & Jedrzejewski, 2006).



Mynd 6. Þrívíddarbygging hýalúronidasa úr býflugu

- A. $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel bygging próteinsins. Raufin þar sem hýalúronisýran (HA) og bygging sameindarinnar er sýnd. Mynd breytt frá Stern & Jedrzejas, 2006.
- B. Yfirborðsmynd af próteininu. Frumefni ensímsins eru í mismunandi litum. Kolfni (C): grænt, nitur (N): fjólublátt, Súrefni (O): rautt og brennisteinn (S):gult. HA er sýnd þar sem hún binst raufinni á ensíminu. Mynd breytt frá Stern & Jedrzejas, 2006.

1.5.3 Virkni hýalúronidasa í bitflugum

Hýalúronidasi í býflugum er náskyldur sama ensími í öðrum æðvængjum (Hymenoptera) og mynda þessi ensím krossvirkni í ofnæmissvari. Hýalúronidasi í æðvængjum verkar sem endo- β -N-acetyl-D- hexoaminidasi og brýtur þar með hýalúronsýru niður í fjórsykrur. Hýalúronsýra er slím fjölsykra og er í ríkulegu magni í bandvef spendýra og virkar ensímið því sem einskonar útbreiðslu þáttur. Eftir að æðvængja hefur stungið auðveldar ensímið gegnflæði annarra efna sem flugan seytir frá sér (Soldatova et al., 1998).

Rannsókn, sem var gerð á virkni hýalúronidasa í bitmýi, sýndi að virkni ensímsins minnkaði allverulega eftir að flugan hafði nærst á blóði. Þessar niðurstöður benda til þess að ensíminu hafi verið seytt eftir blóðmáltíð. Auk þess gáfu niðurstöðurnar til kynna að skordýr sem nærðust á blóði seyttu þessu tiltekna ensími í þeim tilgangi að dreifa blóðstorkuheftandi þáttum sem finnast í munnvatni þeirra nálægt bitstað og jafnvel í þeim tilgangi að stækka bitsárið. Þar að auki er ensímið talið hafa áhrif á ofnæmissvar fórnarlambins og hafi þýðingu við arboveiru-smitun en flugan getur borið veiruna (Ribeiro, Charlab, Rowton, & Cupp, 2000).

1.7 Aðferðafræði

1.7.1 Gerð cDNA safns

cDNA-safn er útbúið með því að einangra RNA úr viðkomandi líffæri eða frumum. RNA-safnið er síðan notað sem eftirmyndunarmót til nýmyndunar DNA-safns með hjálp afturvirks umrita. DNA-sýnið sem notast er við í þessu verkefni er λ -Zap II cDNA-safn sem er útbúið úr um það bil 1400 munnvatnskirtlum *Culicoides nubeculosus* flugunnar og framleitt af GATC Biotech í Þýskalandi.

1.7.2 Hönnun vísa

Til að ná sem bestum árangri í keðjuverkandi fjölliðun (PCR) þurfa vísarnir sem notast er við að uppfylla ákveðin skilyrði (Strachan & Read, 2004a):

Stærð: Æskileg stærð vísa er á bilinu 18-25 basar að lengd.

Basasamsetning: GC-innihald vísanna á að vera á bilinu 40-60%.

Bræðsluhitastig (TM): Mismunur á TM hita tveggja vísa sem eru notaðir saman á ekki að vera meira en 5°C.

3' endi: 3' endi annars vísisins á ekki að vera mótsvarandi neinum hluta í hinum vísinum þannig að þeir geti parast.

Mótsvarandi raðir innan sama vísis: Ef 5' endi vísis getur bundist 3' enda sínum, það er að vísirinn hefur í sér mótsvarandi raðir, veldur það því að röðin myndar tvíþátta DNA sem getur ekki bundist DNA-röðinni sem magna á upp.

1.7.3 Keðjuverkandi fjölliðun, PCR - Hot start PCR

Keðjuverkandi fjölliðun er aðferð til að fjölfalda ákveðið svæði í DNA-mengi, svo sem eitt ákveðið gen, með hjálp vísa. Vísarnir eru hannaðir til að bindast sitt hvoru megin við það svæði á erfðaefninu sem óskað er eftir að fjölfalda. Aðferðin byggir á því að tvíþátta DNA er eðlissvipt með hita svo að tveir einþátta DNA strengir myndist sem eru mót hvor af öðrum. Vísarnir tveir bindast DNAnu og vinna hvor í sína átt, annar áfram (forward) og hinn afturábak (reverse). Saman vinna vísarnir úr gagnstæðri átt og magna

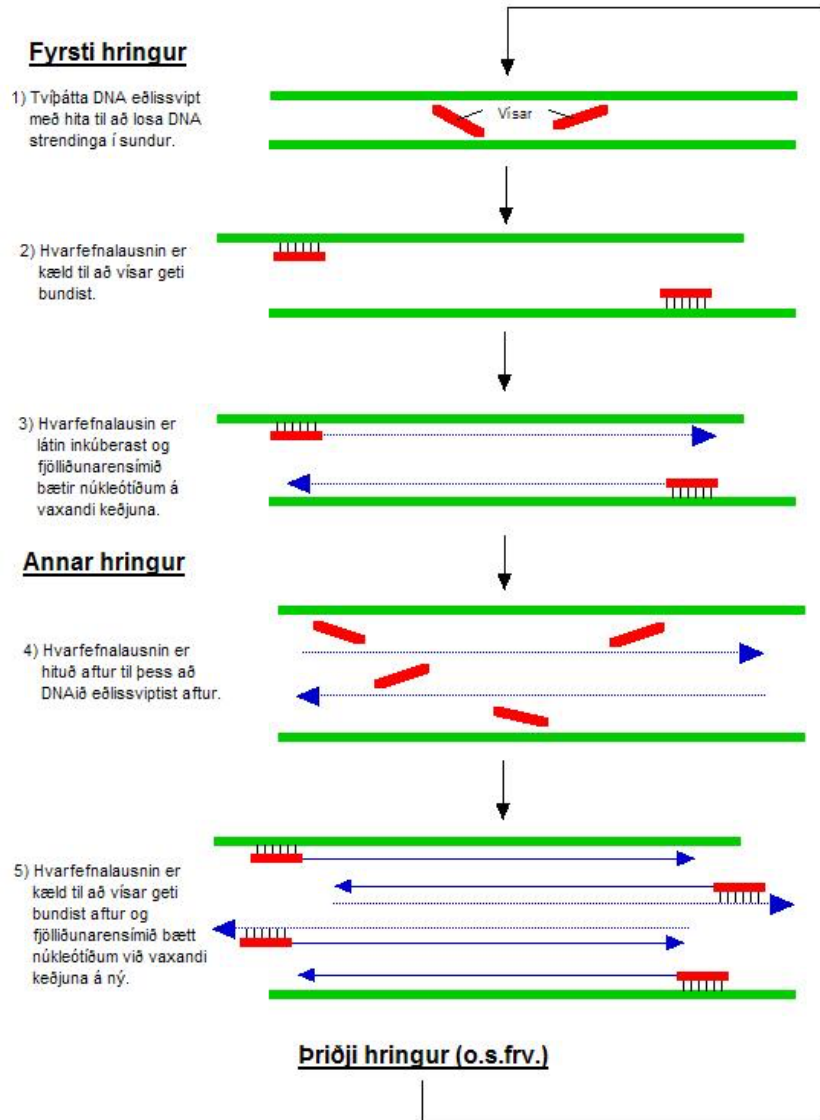
upp svæðið sín á milli. Lykilatriðið til að þetta geti átt sér stað er notkun hitaþolins fjölliðunarensíms (polymerasa) sem bætir nukleótíðum (dNTP) á vaxandi keðjuna og býr þannig til afrit af frumritinu. Nýja DNA-afritið er síðan notað sem mót til að gera annað afrit og þannig magnast sama svæðið á milli vísanna upp með keðjuverkandi fjölliðun. Hitaþolna fjölliðunarensímið sem meðal annars er unnið úr hitakæru bakteríunni *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymerasi). Ókostur þessa ensíms er sá að það skortir 3'→5' exonúkleasa virkni og getur því ekki leiðrétt þær villur sem eiga sér stað í eftirmynduninni. Annað fjölliðunarensím, sem nefnist Pfu polymerasi og er unnið úr bakteríunni *Pyrococcus furiosus*, hefur aftur á móti þennan kost umfram Taq-fjölliðunarensímið og hefur notkun þess því aukist (Strachan & Read, 2004a).

Fjölliðunarhvarfinu er skipt í þrjá þætti sem koma hver á eftir öðrum og mynda eins konar hringhvarf (Strachan & Read, 2004a):

DNA eðlissvipting: Tvíþátta DNA er eðlissvipt í einþátta DNA-strengi með hita, oftast á bilinu 93°C - 95°C.

Tenging vísa: Hér eru vísarnir að bindast einþátta DNAinu. Bindi hitastigið (TA = annealing temperature) er oftast á bilinu 50-70°C, en það fer eftir bræðsluhitastigi (TM = melting temperature) vísanna. Það er góð þumalfingursregla að hafa TA um það bil 5°C lægra en TM. Því hærra sem hitastigið er því minni líkur eru á því að vísarnir bindist ósértækt.

DNA-nýmyndun (lenging): Lengingin fer oftast fram við 70°C – 75°C, þar sem fjölliðunarensímið bætir nukleótíðunum við vaxandi keðjuna.



Mynd 7. Keðjuverkandi fjölliðun (PCR)

Myndin sýnir hvernig PCR hvarfið gengur.

Mynd sótt þann 15.04.07 af: <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/109/GeneticEngineering3.gif>, og texti á mynd íslenskaður.

Fjölliðunarhvarfið er látið ganga mislengi, en það þarf að minnsta kosti 25 hringi til þess að nægjanlegt magn af DNA magnist upp þannig að það sé sjáanlegt í agarósa eða pólýakrílamíðhlaupi. Virkni fjölliðunarensímsins er líka takmarkandi og oftast virkar Taq-fjölliðunarensím ekki fyrir fleiri en 25-30 hringi (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989a).

Hot-start PCR er aðferð sem hefur verið þróuð til að auka sértækni PCR-hvarfsins. Með því að blanda sama öllum PCR hvarfefnum áður en fyrsta eðlissvipting fer fram geta vísarnir frekar bundist ósértækt. Til að minnka möguleikann á því er Taq-fjölliðunarensíminu ekki bætt út í sýnin fyrr en þau hafa náð um það bil 60°C hita. DNA nýmyndun byrjar því ekki fyrr en sértæk binding á milli vísa og DNA-móts hefur átt sér stað (Strachan & Read, 2004a).

1.7.3 Rafdráttur á agarósaflaupi

Agarósi er línuleg fjölliða sem er unninn úr þörungum og er notaður til rafdráttar á DNA-bútum. Rafdráttur á agarósaflaupi er hefðbundin aðferð til að aðgreina, einangra og hreinsa DNA-búta. Þessi tegund hlaups getur aðgreint DNA-búta sem eru allt frá 200 basa pör upp í um það bil 50 kb að stærð (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989b).

Nokkrir þættir hafa áhrif á það hversu hratt DNA bútarnir aðgreinast á hlaupinu (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989b):

DNA sameindapungur: Því meiri sem sameindapunginn er því hægar fer DNAið í hlaupinu.

Styrkur agarósaflaups: Því meiri sem styrkur agarósa er í hlaupi þeim mun betri aðgreining fæst á stærð DNA-sameinda.

Lögun DNA sameindar: Hringlaga og línulaga DNA-sameindir ferðast mishratt eftir hlaupinu.

Rafspennustyrkur: Því meiri sem spennan er því minni verður aðgreiningin.

Stefna rafsviðs: DNA-sameindir sem eru stærri en 50-100 kb að lengd fara eftir hlaupinu á sama hraða ef stefna rafsviðsins helst stöðug. Sé stefnunni breytt reglulega eru stærri sameindir lengur að skipta um stefnu en minni sameindir.

Basasamsetning og hitastig: Basasamsetning DNA-sameindar og hitastig rafdráttarins hefur ekki mikil áhrif á það hversu hratt DNA-sameindin fer í hlaupinu ef hitastigið helst á bilinu 4°C-30°C.

Áhrif innskotslitarefna: Ethidíum brómíð er flúrljómandi litur sem er notaður til að gera DNA í agarósaflaupi sjáanlegt í útfjólubláu ljósi. Litarefnið minnkar rafdráttar

hreyfigetu línulegs DNA um 15% með því að fara inn á milli basapara og gera þau stífari.

Samsetning rafdráttardúa: Hraði DNA í rafdrætti er háður samsetningu og jónastyrk dúa. Því meiri sem jónastyrkurinn er því hraðar fer DNAið eftir hlaupinu.

1.7.4 Raðgreiningar PCR og raðgreining

Raðgreining byggist á því að notuð eru dideoxy-núkelótíð (ddNTP's) auk þeirra hefðbundnu núkleótíða (dNTP's) sem eru í DNA. Dideoxy-núkleótíð eru í raun eins byggð og venjuleg núkleótíð, nema þau innihalda vetnishóp (hydrogen group) á 3' kolefni í stað hydroxyl hóps (OH). Þegar þessi umbreyttu núkleótíð eru innlimuð í raðgreiningar-PCR, hindra þau að fleiri núkleótíð geti tengst. Þetta er vegna þess að phosphódíester tengi getur ekki myndast á milli dideoxy-núkleótíðsins og næsta núkleótíðs sem vill tengjast og stoppar því DNA-keðjan á þeim stað (Strachan & Read, 2004b).

Áður en DNAið er raðgreint er framkvæmt svokallað raðgreiningar-PCR þar sem DNA er eðlissvipt í einþátta DNA með hita. DNA-sýni er blandað saman við hvarfefnalausn sem inniheldur eimað vatn, dúa, vísi, ddNTP auk DNA-fjölliðunarensíms sem bætir núkleótíðunum á vaxandi DNA-keðjuna. Dideoxy-núkleótíðin eru flúrmerkt hvert með sínum lit (**G**, **A**, **T**, **C**) svo hægt sé að þekkja þau í „hlaupinu“. Út úr hvarfinu myndast einþátta DNA-bútar sem eru mislangir sökum þess að tilviljunin ein ræður því hvenær flúrmerkti basinn kemst inn. Raðgreiningar-PCR lausnin (hvarfefni + sýni) er hreinsuð áður en hún er sett í raðgreiningartækið. Í raðgreiningartækinu er glerpípusúla með hlaupi sem sýnin eru rafdregin í. Neðst í hlaupinu er leiser sem skýtur inn ljósi af ákveðinni bylgjulengd sem flúrmerktu basarnir bregðast við og flúrljóma við mismunandi bylgjulengdir, þegar þeir fara framhjá honum í rafdrættinum. Ljósið frá leisernum endurkastast og toppur myndast fyrir hvern basa/lit. Niðurstöður eru síðan gefnar upp í eins konar línuriti þar sem litaðir toppar (fjórir litir = einn fyrir hvern basa) koma fram og gefa til kynna staðsetningu basans í DNA-röðinni (Strachan & Read, 2004b). Myndir sem sýna hvernig góðar og slæmar raðgreiningar líta út eru í viðauka IX.

2. Markmið verkefnis

Markmið verkefnisins var að klóna og raðgreina hyaluronoglucosaminidase-genið úr λ -ZapII cDNA safni, útbúnu úr munnvatnskirtlum *Culicoides nubeculosus* smámýsins.

Notast var við ferjuvísa auk vísa sem útbúnir voru eftir birtri hýalúronidasa genaröð úr *Culicoides sonorensis* (viðauki IV), ásamt vísnum sem útbúnir voru eftir raðgreindri röð *C. nubeculosus* með litninga-labbi (chromosomal walking) (viðauki V). Auk þess var notast við vísa sem útbúnir voru eftir vel varðveittum amínósýrusvæðum á hýalúronidasagenum bitflugna (viðauki VI). Með því að bera saman stærð sama gens í öðrum skordýrum má áætla að genið sé 900-1200 basapör (viðauki III).

3. Efni og aðferðir

Sýni:

Tafla 3. Munnvatnskirtlasafn úr *Culicoides nubeculosus*

Sýni	Þynning
λ-Zap II cDNA KN694	Óþynnt [$1,75 \times 10^{11}$ pfu/mL]
λ- Zap II cDNA KN694	1:5
λ- Zap II cDNA KN694	1:10

Eliane Marti sem starfar við Háskólann í Bern handplokkaði 1400 munnvatnskirtla úr *C. nubeculosus*, og λ-Zap II cDNA safnið var framleitt af GATC Biotech í Þýskalandi.

Vísar: Vísar eru pantaðir frá TAG Copenhagen. Sjá hönnun vísa í viðaukum IV, V og VI.

Tafla 4. Ferjuvísar

Vísar	T _m (°C)	Basaröð
M13 (-40) – Fw	52,8	5' - GTT TTC CAG TCA CGA -3'
T7 – Fw	53,2	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
ZAP II E-Ad.seq – Fw (17)	61,8	5' - TC TGG ACC TTG GCT GTC ACT C -3'
ZAP II X-Ad.seq – Rev (32)	62,1	5' - GAT GTC TCG TAA GGT CCT CCG T -3'

T_m: Melting temperature (bræðsluhiti)

Fw: Forward (áfram)

Rev: Reverse (afturábak)

E-Ad.seq: EcoR I adapter sequence primer

X-Ad.seq: Xho I adapter sequence primer

Tafla 5. Sértekir vísar

Vísar	Tm (°C)	Basaröð
Cn.HGS.82 – Rev	53,2	5'- CAC AGC CAT TTA ATG CGA TT -3'
Cn.HGS.83 – Rev	55,3	5'- CCA CAG CCA TTT AAT GCG AT -3'
Cn.HGS.93 – Rev	57,3	5'- CGA CAA TAT CCC ACA GCC AT -3'
Cn.HGS.96 – Rev	57,3	5'- CAT CGA CAA TAT CCC ACA GC -3'
Cn.HGS.163 – Rev	57,3	5'- CCC ACG AAC AAA TTG GAC TC -3'
Cn.HGS.182 – Rev	57,3	5'- GAT ATC CTT CAC GCA TTC GC -3'
Cul.s3 (17) – Fw	53,2	5'- TAA TAT GAA TGG CGG TGC AA -3'
Cul.s3 (501) – Rev	53,8	5'- AAA TAT TTC AGG TCA TTA TGA CAA A -3'
Cul.s3 R2 – Rev	53,2	5'- TTG CAC CGC CAT TCA TAT TA -3'
C.son GGVPQEG – Fw	59,8	5'- GGA GGA GTT CCA CAA GAA GGA -3'
C.son WGYAFP – Fw *	54,0	5'- TGG GGA TAT TAT GCA TTT CCA -3'
C.son FPYCFNMN – Rev	59,6	5'- GCC ATT CAT ATT AAA ACA ATA CGG AAA TC-3'
C.nub. GGVPQEG – Fw *	59,8	5'- GGT GGT GTA CCA CAA GAA GGA -3'
C.nub. GGVPQEG – Rev	59,8	5'- TCC TTC TTG TGG TAC ACC ACC -3'
C.son MCN- HGS (Fw)	55,8	5'- ATG TGT AAT CAA TAT CAA ATG AAT TTT TCA -3'
C.son TYE-HGS (Fw)	52,5	5'- ACA TAT GAA GTT TAT CAA AAT GGA -3'
C.son FRG-HGS (Fw)	50,1	5'- TTT AGA GGA AAT GCA ATT TCA -3'
C.son SIL-HGS (Fw)	52,0	5'- TCA ATT TTG TAT GAT CCA GGA -3'
C.son SIL-HGS (Rev)	52,0	5'- TCC TGG ATC ATA CAA AAT TGA -3'

Tm: Melting temperature (bræðsluhiti)

Fw: Forward (áfram)

Rev: Reverse (afturábak)

* Vísarnir voru ekki notaðir, því þeir náðu inná svæði sem hafði tekist að raðgreina áður en þeir voru prófaðir.

3.1 Keðjuverkandi fjölliðun (PCR)

Tæki:

PCR tæki: PTC–200; Peltier Thermal Cycler frá MJ RESEARCH.

Tafla 6. PCR hvarfblanda (heildarmagn 20 µL/sýni)

Hvarfefni	Magn per sýni (µL)	Mastermix (µL)*
DNA	1	-
Thermodúi	2	2 x fjöldi sýna
dNTP (2 mM)	1	1 x fjöldi sýna
Fw. vísir (20 pmól/µL)	1	-
Rev. vísir (20 pmól/µL)	1	-
Taq DNA fjölliðunarensím	0,1	-
dH ₂ O	13,9	13,9 x fjöldi sýna

*Blanda skal mastermix fyrir eitt aukasýni, til að tryggja nægilegt magn fyrir öll sýnin.

Thermodúi: ThermoPol Buffer frá New England Biolabs_{Inc.}

dNTP: 10 mM dNTP blanda frá MBI Fermentas.

Taq DNA fjölliðunarensím: Taq DNA polymerase frá New England Biolabs_{Inc.}

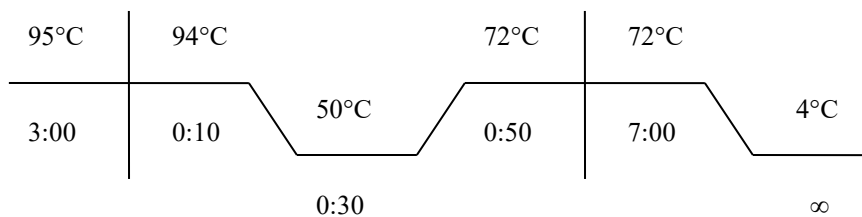
Aðferðarlýsing:

1. Byrjað er á að blanda mastermix í sérútbúnu PCR húddi til að forðast DNA mengun í sýni. Merkt eru tvö eppendorf glös, annað fyrir mastermix (M) og hitt fyrir polymix (P).
2. Í mastermix glasið er fyrst sett dH₂O, þarnaest thermodúa og að lokum dNTP. Blanda varlega.
3. (Polymix: 0,1 x fjöldi sýna + X µL af mastermix = 1 µL í sýni). X µL af mastermixi eru settir í polymix glasið og X µL af Taq-fjölliðunarensími er bætt úti. Heildarmagn af polymixi á að samsvara því að 1 µL af polymixi fer í hvert sýni í PCR tækinu. (ath. 1µL á að vera afgang).
4. 16 µL af mastermixi eru settir í PCR sýnaglös + 1 µL af Fw vísir + 1 µL af Rev vísir.
5. 1 µL af DNA er bætt út í PCR sýnaglösin fyrir utan PCR húddið. Ath. DNA sýni má aldrei fara í PCR húddið.

PCR prógram - Hot start:

1. Tækið er sett af stað og látið ná að minnsta kosti 60°C.
2. Sýnaglösín eru sett í tækið og 1µL af polymix er bætt úti glösín, lok sett á og tækinu lokað. Ath. hér skal hafa hraðar hendur svo að sýnin gufi ekki upp.
3. 95°C í 3:00 mín (eðlissvipting erfðaefnis).
4. 94°C í 0:10 mín (eðlissvipting erfðaefnis).
5. 50°C í 0:30 mín (binding vísa við DNA mót – TA) TA fer eftir TM vísa.
6. 72°C í 0:50 mín (lenging).
7. 72°C í 7:00 mín (lenging).
8. 4°C endalaust.

Skref 4 til 6 er endurtekið 29 sinnum.



3.2 Rafdráttur PCR afurðar á agarósahlaupi

Tæki:

Rafdráttarker: POWER PAC 300 frá BIO RAD.

Framköllunartæki: UVP, White/UV Transilluminator.

Prentari fyrir framköllunartæki: SONY Digital graphic printer, UP-D860E.

Tafla 7. LE Agarósa hlaup

Efni	Magn (1% lítið hlaup)	Magn (1% stórt hlaup)	Magn (1,5% lítið hlaup)
Agarósi*	0,3 g	0,5 g	0,45 g
0,5 x TBE dúi	30 mL	50 mL	30 mL
Ethidíum brómíð (EBR)**	2 dropar	2-3 dropar	2 dropar

*Því meiri sem styrkur agarósa er í hlaupi því betri aðgreining fæst á litlum DNA sameindum.

**Þar sem ethidíum brómíð er krabbameinsvaldandi efni skal umgangast það með varúð.

Agarósi: Seakem®LE Agarose frá Cambrex Bio Science Rockland, Inc.

TBE: Tris-borat EDTA (viðauki VI).

Hlaupið er steypit í loftræstu öryggishúddi og er gert meðan á PCR hvarfi stendur.

Aðferðarlýsing:

1. Plast hlaupmót er jafnvægisstillt þannig að hlaupið verði alveg lárétt og sýni í réttum fleti.
2. Agarósa og 0,5 x TBE dúa er blandað saman í keiluflösku og hitað í örbylgju þar til agarósinn er leysist upp í dúanum og lausnin verður alveg tær.
3. Lausnin er kæld með því að halla flöskunni og setja botn hennar undir kalda vatnsbunu. Ekkert vatn má komast ofan í flöskuna.
4. Tveir dropar af ethidíum brómíð eru settir út í lausnina og blandað lauslega og svo er henni er hellt í hlaupmótið. Loftbólur eru fjarlægðar ef þær hafa myndast.
5. Greiða/mót fyrir 8-15 brunna er stungið í hlaupið eftir að því hefur verið hellt. Hvaða stærð af greiðu/móti er notuð hverju sinni, fer eftir því hversu mikið rúmmál á að rafdraga.
6. Hlaupið storknar á 15-20 mínútum.
7. Þegar sýni eru tilbúin til rafdráttar er greiðan tekin úr hlaupinu og því komið fyrir í rafdráttarkeri. Gæta skal þess að nægjanlegur dúi sé í kerinu þannig að hann fljóti yfir hlaupið.
8. Sýnum og stærðarviðmiði (ladder) er hlaðið á hlaupið.
9. Lok er sett á og tæki sett af stað. Rafdregið er við 70 V í 30-35 mínútur. DNA sýni sem eru neikvætt hlaðin við hlutlaust pH fara frá katóðu (- skauti) til anóðu (+ skauts) en EBR fer í þveröfuga átt.
10. Eftir rafdrátt er tekin mynd af hlaupinu í tæki sem lýsir útfjólubláu ljósi og er stjórnað af forriti (Grab-IT) í tölvu sem það er tengt við. Tölvun er tengd við prentara sem prentar út mynd af hlaupinu.

Tafla 8. Blöndun sýnis fyrir rafdrátt (10 µL í hvern brunn)

Efni	Magn (µL)
DNA (PCR afurð)	1
10 x RSB	1
dH ₂ O	8

10 x RSB: RSB dúi (Restriction Stop Buffer) er hleðslulitur sem er notaður við rafdrátt. Hlutverk hans er að þyngja sýnin svo að þau dreifist jafnt og haldist niðri í brunnunum og fljóti ekki uppúr. Auk þess gefur hann sýnunum lit sem auðveldar hleðslu sýna á hlaupið. 1,5 µL af RSB dúna er notaður fyrir hverja 10µL sem á að rafdraga (viðauki VII).

“Ladder” er 1 Kb DNA stigi, sem er notaður sem stærðarviðmið í rafdrætti. Stigin hentar vel til að stærðargreina línulegt, tvíþátta DNA sem er allt frá 500 bp til 12 Kb, og út frá honum er hægt að áætla hversu stór böndin eru sem myndast í rafdrætti. Venjulega eru notaðir 1-2 µL af efninu í hvern rafdrátt/brunn (viðauki VII).

3.3 PCR afurða rafdráttur og Odda PCR

3.3.1 PCR afurða rafdráttur

Tæki:

Rafdráttarker: POWER PAC 300, BIO RAD.

Framköllunartæki: UVP, White/UV Transilluminator.

Prentari fyrir framköllunartæki: SONY Digital graphic printer, UP-D860E.

Ef vísar bindast ósérstækt í PCR hvarfi og mörg bönd myndast í rafdrætti þarf að einangra böndin með odda PCRi. Sýnin eru rafdregin aftur og meira magn af sýni notað í hvern brunn. Þetta er gert í þeim tilgangi að fá sterkari bönd sem öll eru vel aðskilin.

Tafla 9. LE Agarósa hlaup

Efni	Magn (1% lítið hlaup)	Magn (1,5% lítið hlaup)
Agarósi	0,3 g	0,45 g
0,5 x TBE dúi	30 mL	30 mL
Ethídium brómíð (EBR)	2 dropar	2 dropar

Blöndun sýnis:

Sé ætlunin að notast við óþynnta PCR afurð (DNA) er 1,5 µL af 10xRSB bætt út í sýnið fyrir hverja 10 µL sem á að rafdraga. Breytilegt er hversu mikið magn af DNA er rafdreigið hverju sinni en því meira DNA sem er notað því sterkara band fæst. Sé ætlunin að þynna sýnið er eimað vatn (dH₂O) notað til þess.

Ladder: BRL 1 Kb (1-2 µL)

Rafdráttur: 70 volt í 30–60 mín. Því lengur sem rafdreigið er því betri aðskilnaður fæst á milli DNA banda. Gæta skal þess að rafdraga ekki of lengi því að böndin geta náð út fyrir hlaupið. Þar sem DNA og ethídium brómíð fara í gagnstæðar áttir í rafdrætti getur of langur rafdráttartími valdið því að illa gengur að greina DNAið í agarósahlaupinu.

3.3.2 Odda PCR

Tæki:

UV tæki: FOTODYNE Incorporated.

PCR tæki: PTC-200, Peltier Thermal Cyclers frá MJ RESEARCH.

Odda PCR er gert í þeim tilgangi að einangra mörg rafdráttarbönd í sama sýni og magna þau upp til að hægt sé að raðgreina þau. Aðferðin er hefðbundin keðjuverkandi fjölliðun. Pípettuodda er stungið ofan í rafdráttarband á agarósahlaupi og látinn ofan í PCR hvarfefnablöndu með viðeigandi vísun.

Tafla 10. PCR hvarfblanda (heildarmagn 20 μL /sýni)

Hvarfefni	Magn per sýni (μL)	Mastermix (μL)*
DNA	Magn af pípettuoddi	-
Thermodúi	2	2 x fjöldi sýna
dNTP (2mM)	1	1x fjöldi sýna
Fw. vísir (20 pmól/ μL)	1	-
Rev. vísir (20 pmól/ μL)	1	-
Taq DNA fjölliðunarensím	0,1	-
dH ₂ O	14,9	14,9 x fjöldi sýna

*Blanda skal mastermix fyrir eitt aukasýni til að tryggja nægilegt magn fyrir öll sýnin.

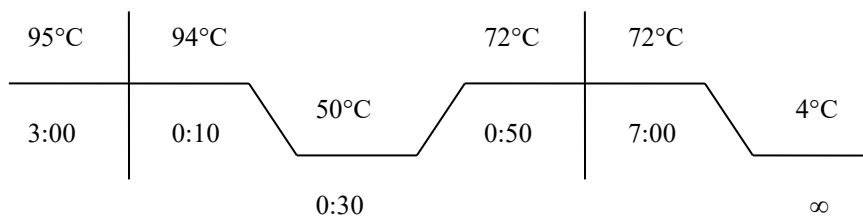
Aðferðarlýsing:

- Byrjað er á að blanda mastermix í sérútbúnu PCR húddi til að forðast DNA mengun í sýni. Merkt eru tvö eppendorf glös, annað fyrir mastermix (M) og hitt fyrir polymix (P).
- Í mastermix glasið er fyrst sett dH₂O, þar næst thermodúa og að lokum dNTP. Blanda varlega.
- (Polymix: 0,1 x fjöldi sýna + X μL af mastermix = 1 μL í sýni)
X μL af mastermixi eru settir í polymix glasið og X μL af Taq-fjölliðunarensími er bætt úti. Heildarmagn af polymixi á að samsvara því að 1 μL af polymixi fer í hvert sýni í PCR tækinu, (ath. 1 μL á að vera afgang.)
- 17 μL af mastermixi er sett í PCR sýnaglös + 1 μL af Fw vísi + 1 μL af Rev vísi.
- Agarósaflaup sem inniheldur PCR afurðar rafdrátt er sett ofan á tæki sem lýsir útfjólubláu (UV) ljósi. UV ljósið gerir kleift að böndin sjáist og pípettuodda er stungið í þau bönd sem óskað er eftir að magna upp. Böndin eru skorin út með einnota skurðblöðum, sett í eppendorf glös og síðan í frysti (-20°C). (Ath. nota skal sér skurðblað fyrir hvert band til að forðast DNA mengun á milli sýna.)

PCR prógram - Hot start:

1. Tækið er sett af stað og látið ná að minnsta kosti 60°C.
2. Sýnaglösin eru sett í tækið og 1µL af polymixi er bætt úti glösin, lok sett á og tækinu lokað. Ath. hér skal hafa hraðar hendur svo að sýnin gufi ekki upp.
3. 95°C í 3:00 mín.
4. 94°C í 0:10 mín.
5. 50°C í 0:30 mín.
6. 72°C í 0:50 mín.
7. 72°C í 7:00 mín.
8. 4°C endalaust.

Skref 4 til 6 er endurtekið 29 sinnum.



3.4 BigDye raðgreiningar PCR

3.4.1 Hreinsun PCR afurðar með ExoSAP

Tæki:

PCR tæki: PTC-200, Peltier Thermal Cyclers frá MJ RESEARCH.

PCR afurð er hreinsuð með ExoSAP til að brjóta niður allt einþátta DNA.

Tafla 11. Blöndun PCR afurðar með ExoSAP

Efni	Magn (µL)
PCR afurð	10
ExoSAP-IT	4

ExoSAP-IT: ExoSAP-IT® frá USB®. Efnið inniheldur exonukleasa og fosfatasa sem brýtur niður allt einþátta DNA. Notaðir eru 2 µL fyrir hverja 5 µL af PCR afurð.

Aðferðarlýsing:

1. PCR afurð og ExoSAP-IT er blandað saman í PCR sýnaglös og þau sett í PCR tækið.

PCR prógram:

1. 37°C í 15 mín.
2. 80°C í 15 mín. (Afsvirkjun ensíma).

Sýnin eru geymd í frysti (-20°C) ef raðgreining er ekki gerð samdægurs.

3.4.2 Ljósmeiing ExoSAP afurðar

ExoSAP afurð er ljósmeið til að staðfesta hversu mikið magn af DNA er í sýni.

Tæki:

Ljósmeilir: GeneQuant *pro* frá Biochrom.

Kúvetta: 5 mm Quartz ultramicro frá Biochrom.

Tafla 12. Þynning sýnis fyrir ljósmeiingu (1:10 – 10 µL)

Efni	Magn (µL)
ExoSAP afurð	1
dH ₂ O	9

Aðferðarlýsing:

1. Sýnin eru þynnt 1:10 í dH₂O.
2. Kveikt er á ljósmeilitækinu og það stillt á DNA.
3. 10 µL af dH₂O eru ljósmeiðir til að núllstilla tækið.
4. Sýnin eru meið hvert af öðru og niðurstöður skráðar niður jafn óðum. Ath. kúvettan er skoluð á milli hvers sýnis með 15 µL af dH₂O.
5. Í lokin er kúvettan skoluð 3-5 sinnum með 150 µL af dH₂O einu sinni með 150 µL af 100 mM NaOH og í lokin með 150 µL af 100 mM HCL.

3.4.3 Raðgreiningar PCR

Tæki:

PCR tæki: PTC-200, Peltier Thermal Cycler frá MJ RESEARCH.

Tafla 13. PCR hvarfblanda (10 µL/sýni)

Hvarfefni	Magn per sýni (µL)	Mastermix (µL) *
BigDye	1	1 x fjöldi sýna
Dúi	1,5	1,5 x fjöldi sýna
Vísir (2µM)	1,6	-
DNA	1	-
dH ₂ O	4,9	4,9 x fjöldi sýna

* Blanda skal mastermix fyrir eitt aukasýni til að tryggja nægilegt magn fyrir öll sýnin.

BigDye: BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit frá Applied Biosystems.

BigDye er ljósnæmur og inniheldur AmpliTaq DNA fjölliðunarensím, dúa, dNTP og ddNTP.

Dúi: BigDye[®] Terminator v1.1; v3.1 5x Sequencing Buffer frá Applied Biosystems.

Aðferðarlýsing:

1. Byrjað er á að blanda mastermix í sérútbúnu PCR húddi til að forðast DNA mengun í sýni. Merkt er eitt eppendorf glas sem búið er að hylja að utan með álpappír til að forðast að ljós komist að BigDye lausninni.
2. Í mastermix glasið er fyrst sett dH₂O, þarnæst dúa og að lokum BigDye. Blanda varlega. BigDye lausnin er tekin út úr frysti rétt áður en hún er sett út í mastermixið til að forðast sem mest aðgengi ljóss að henni. Á sama tíma skal slökkva ljós í PCR húddi til öryggis.
3. 7,4 µL af mastermixi eru settir í PCR sýnaglös + 1,6 µL af Fw vísi eða 1,6 µL af Rev vísi. (Ath. fyrir hvert DNA sýni sem á að raðgreina er gert tvöfalt raðgreiningar PCR þar sem Fw vísir fer í annað glasið og Rev vísir í hitt.)
4. 1 µL af DNA er bætt út í PCR sýnaglösin fyrir utan PCR húddið. (Ath. DNA sýni má aldrei fara í PCR húddið.)

PCR prógram:

96°C í 1 mín.

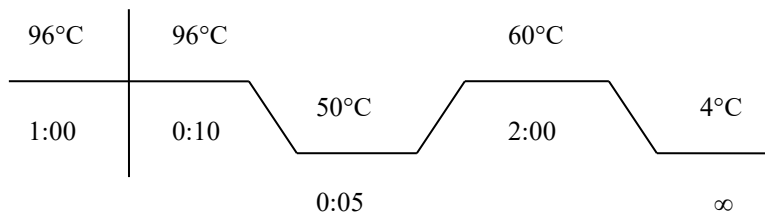
96°C í 10 sek.

50°C í 5 sek. (Hitastigið ræðst af því við hvaða hitastig PCR hvarfið var keyrt við).

60°C í 2 mín.

4°C endalaust.

Skref 2 til 4 er endurtekið 29 sinnum.



PCR hvarfblandan er hreinsuð fyrir raðgreiningu en hér má stoppa og geyma sýni í frysti (-20°C).

3.4.4 Hreinsun á BigDye sýnum fyrir raðgreiningu

Tæki:

Skilvinda: Eppendorf centrifuge 5417C.

Hitablokk: THERMO-BLOCK, TDB 120 frá BIOSAN.

Raðgreiningartæki: ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer frá Applied Biosystems.

Raðgreiningar tölvuforrit: Sequencer™ 4,0 frá Gene Codes Corporation.

Aðferðarlýsing:

1. Merkja 500 µL eppendorf glös og setja 40µL af 75% ísóprópanóli í hvert glas.
2. Færa BigDye raðgreiningar PCR afurð yfir í glösin.
3. Vortexa (sett á hristara) í 5-10 sek. til að blanda saman.
4. Inkúbera í 15 mín. við stofuhita, má vera lengur, hér er DNA að falla út.
5. Spinna í 30 mín. á 14.000 rpm (fara strax í næsta skref, ef það er ekki hægt þarf að spinna í 2 mín. áður en haldið er áfram.)
6. Pípettera flot af (skvettu í vaskinn.)

7. Bæta 100µL af 75% isóprópanóli út í hvert glas.
8. Vortexa í 5-10 sek.
9. Spinna í 5 mín á 14.000 rpm.
10. Pípettera flot af (eða skvetta í vaskinn og draga rest upp með pípettu.)
11. Þurrka opin glös við 90°C í hitablokk í 1 mín. (má frysta hér til að geyma, -20°C.)
12. Leysa upp botnfall í 15µL TSR (Template Supression Reagent, ABI PRISM® frá Applied Biosystems) eða formamíði.
13. Láta standa aðeins við stofuhita.
14. Vortexa.
15. Hita í 2 mín. við 95°C (lokuð glös.)
16. Vortexa.
17. Spinna stutt niður, aðeins í nokkrar sekúndur.
18. Setja á ís eða í 4°C ef það á ekki að fara strax í raðgreiningartæki, má frysta ef geyma á sýni lengi (-20°C.)
19. Sett í raðgreiningartæki.
20. Niðurstöður eru skoðaðar í Sequencer™ 4,6 tölvuforriti frá Gene Codes Corporation að raðgreiningu lokinni.

3.5 Úrvinnsla á niðurstöðum

Niðurstöður raðgreininga voru bornar saman við aðrar DNA raðir sem birtar hafa verið á netinu. Öll forrit af netinu og vefsíður sem voru notaðar við vinnslu á verkefninu koma fram í viðauka II.

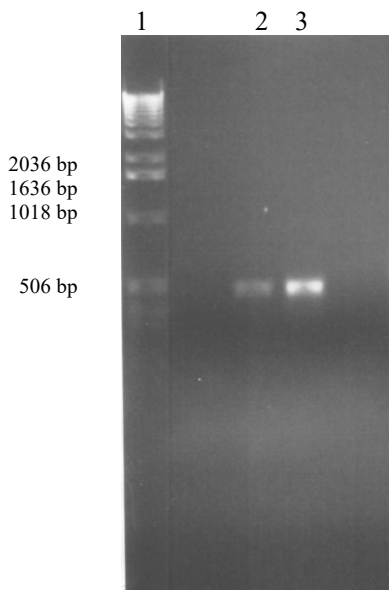
4. Niðurstöður

4.1 Niðurstöður úr keðjuverkandi fjölliðun (PCR)

1. PCR-1

Það tókst að magna upp um það bil helming HGS-gensins úr λ -cDNA safninu, þynntu 1:10, með vísunum Cul.s3 (17) – Fw og Cul.s3 (501) – Rev.

Vísarnir gáfu um það bil 500 basapara (bp) band í rafdrætti, sjá mynd 8.



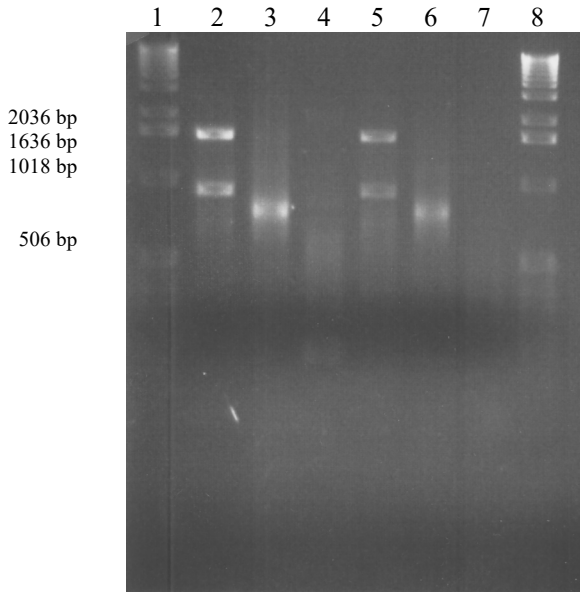
Mynd 8. PCR-1

1. 1 Kb Ladder
2. Cul.s3 (17) – Fw + Cul.s3 (501) – Rev: ~ 506 bp band
3. Cul.s3 (17) – Fw + Cul.s3 (501) – Rev: ~ 506 bp band

Sýnin í brunnnum 3 og 4 voru raðgreind, sjá raðgreiningu – 1, bls. 53.

2. PCR-2

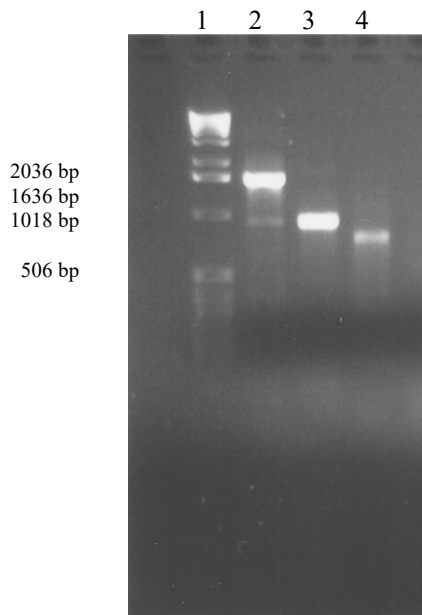
Vísarnir M13 (-40) – Fw, T7 – Fw og Cul.s3 (501) – Rev mögnuðu upp DNA bönd á bilinu ~ 900 bp – 1600 bp úr λ -cDNA safninu þynntu 1:10 og 1:5, sjá mynd 9:



Mynd 9. PCR-2

1. 1 Kb Ladder
2. og 5. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 (501) – Rev (1:10) og (1:5): ~ 1600 bp og 1000 bp bönd.
3. og 6. T7 – Fw + Cul.s3 (501) – Rev (1:10) og (1:5): ~ 900 bp band.
4. og 7. ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) + Cul.s3 (501) – Rev (1:10) og (1:5): Ekkert
8. 1. Kb Ladder

Böndin í brunnum 2 og 3 voru einangruð með odda PCRi fyrir raðgreiningu, sjá mynd 10.



Mynd 10. Odda PCR-2

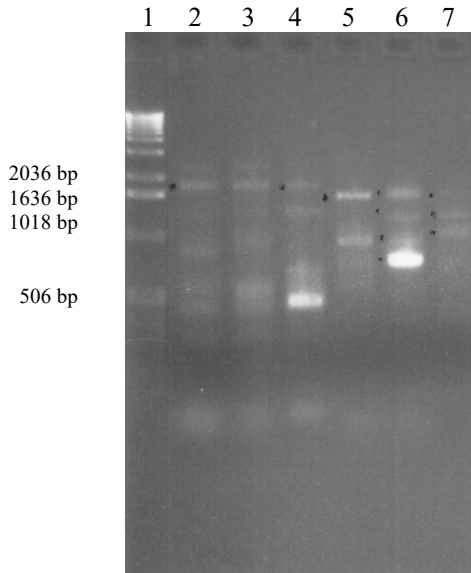
1. 1 Kb Ladder
2. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 (501) – Rev: ~ 1600 bp band + auka band
3. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 (501) – Rev: ~ 1000 bp band
4. T7 – Fw + Cul.s3 (501) – Rev: ~ 900 bp band.

1636 bp bandið í brunni 2 var einangrað aftur með odda PCRi. Þegar bandið var orðið stakt í sýninu var sýnið raðgreint ásamt sýnunum úr brunni 3 og 4.

Raðgreiningin var slæm og gaf engar niðurstöður. Sjá mynd af slæmri raðgreiningu í viðauka IX. Ekki þótti ástæða til að endurtaka raðgreininguna þar sem önnur sýni sem voru keyrð í sömu keyrslu gáfu fullnægjandi niðurstöður.

3. PCR-3

Vísarnir Cul.s3 (17) – Fw, M13 (-40) – Fw, Cn.HGS.82 – Rev, Cn.HGS.83 – Rev og Cn.HGS.93 – Rev, mögnuðu upp DNA bönd á bilinu ~ 500 bp – 1800 bp úr λ -cDNA safninu þynntu 1:10, sjá mynd 11:



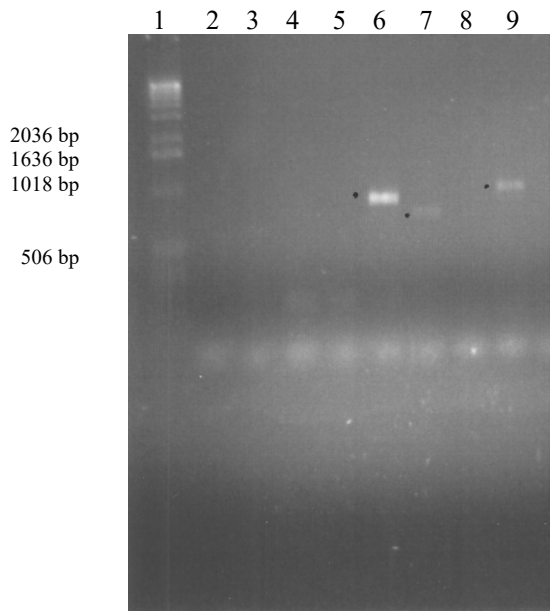
Mynd 11. PCR-3

1. 1 Kb Ladder
2. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.82 – Rev: (var ekki einangrað)
3. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: (var ekki einangrað)
4. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: ~1800 bp band
5. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.82 – Rev: ~ 1600 bp band
6. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: ~ 1600 bp, 1400 bp, 1000 bp, 800 bp bönd
7. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: ~ 1600 bp, 1400 bp, 1000 bp bönd

Böndin í brunnnum 4, 5, 6 og 7 voru einangruð með odda PCRi fyrir raðgreiningu.

Merkt er við böndin með punktum.

Ekki tókst að ná fram öllum böndunum með odda PCRinu, einungis þrjú bönd mögnuðust aftur upp, sjá mynd 12.



Mynd 12. OddaPCR-3

1. 1 Kb Ladder
2. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: Ekkert
3. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.82 – Rev: Ekkert
4. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: Ekkert
5. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: Ekkert
6. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: ~ 1000 bp band
7. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: ~ 800 bp band
8. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: Ekkert
9. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: ~ 1000 bp band

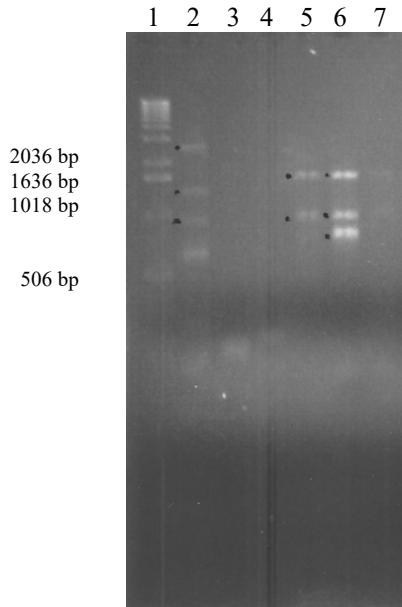
Sýnin í brunnnum 6, 7 og 9 voru raðgreind.

Raðgreiningin var slæm og gaf engar niðurstöður. Ekki þótti ástæða til að endurtaka raðgreininguna þar sem önnur sýni sem voru keyrð í sömu keyrslu gáfu fullnægjandi niðurstöður.

4. PCR-4

Vísarnir Cul.s3 (17) – Fw, M13 (-40) – Fw, Cn.HGS.96 – Rev og Cn.HGS.163 – Rev, mögnuðu upp DNA bönd á bilinu ~ 800 bp – >2000 bp úr λ -cDNA safninu þynntu

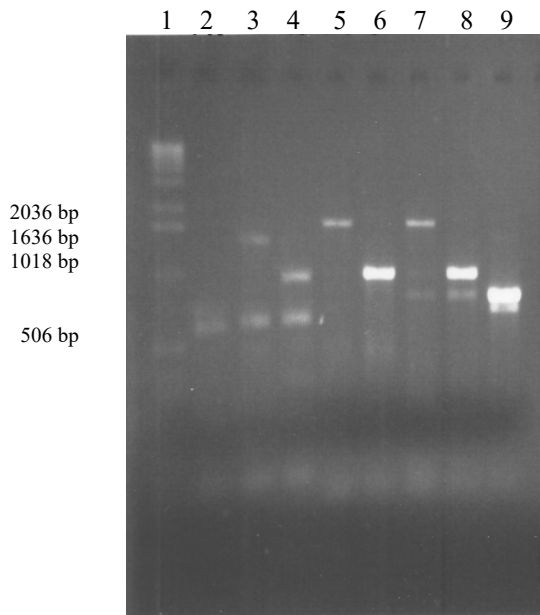
1:10, sjá mynd 13:



Mynd 13. PCR-4

1. 1 Kb Ladder
2. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: ~ >2000 bp, 1500 bp, 1000 bp bönd
3. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: Ekkert
4. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.182 – Rev: Ekkert
5. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: ~ 1600 bp, 1000 bp bönd
6. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: ~ 1600 bp, 1000 bp, 800 bp bönd
7. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.182 – Rev: Ekkert

Böndin í brunnum 2, 5 og 6 voru einangruð með odda PCRi fyrir raðgreiningu. Merkt er við böndin með punktum, sjá mynd 14.



Mynd 14. Odda PCR-4

1. 1 Kb Ladder
2. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: 1 band
3. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: 2 bönd
4. Cul.s3 (17) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: 2 bönd
5. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: ~ 1600 bp band
6. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: ~ 1000 bp band
7. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: 2 bönd
8. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: 2 bönd
9. M13 (-40) – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: 2 bönd

Ekki fengust alveg hrein bönd með odda PCRinu en beðið var með að einangra böndin í brunnnum 2-4 og 7-9. Stöku böndin í brunnnum 5 og 6 voru raðgreind.

Raðgreiningin var slæm og gaf engar niðurstöður. Ekki þótti ástæða til að endurtaka raðgreininguna þar sem önnur sýni sem voru keyrð í sömu keyrslu gáfu fullnægjandi niðurstöður.

5. PCR-5 – Athugun á hitastigi

Þar sem PCR hvörf 2-4 gáfu ágætis bönd í rafdrætti, en niðurstöður raðgreininga komu illa út var ákveðið að skoða TM og TA hitastig vísa nánar til að þrengja skilyrði PCR hvarfsins. PCR hvörf 1-4 voru öll keyrð við TA = 50°C.

Vísunum var raðað upp, TM þeirra skráð niður og TA þeirra reiknað út með því að draga 5°C frá TM, sjá töflu 14.

Tafla 14. TA vísa reiknað út frá TM

Vísar	TM – 5°C (°C)	TA (°C)
Cul.s3 (17) – Fw	53,2 – 5	48,2
M13 (-40) – Fw	52,8 – 5	47,8
T7 – Fw	53,2 – 5	48,2
ZAP II E-Ad.seq – Fw (17)	61,8 – 5	56,8
Cn.HGS.82 – Rev	53,2 – 5	48,2
Cn.HGS.83 – Rev	55,3 – 5	50,3
Cn.HGS.93 – Rev	57,3 – 5	52,3
Cn.HGS.96 – Rev	57,3 – 5	52,3
Cn.HGS.163 – Rev	57,3 – 5	52,3
Cn.HGS.182 – Rev	57,3 – 5	52,3
Cul.s3 (501) – Rev	53,8 – 5	48,8

Markmiðið var að endurtaka PCR með sömu vísunum til að reyna að ná upp nothæfari böndum til raðgreiningar eða að sjá hvort ný bönd mynduðust við breytt TA.

Fimm PCR hvörf voru keyrð við fimm mismunandi hitastig: 48°C, 49°C, 52°C, 53°C og 56°C.

PCR hvörfín með breyttu TA voru borin saman við fyrri PCR hvörf með sömu vísun og TA = 50°C. Samanburður leiddi í ljós að sömu bönd voru að myndast við breytt TA nema í þremur tilfellum.

Við TA = 48°C, 52°C og 53°C kom fram eitt stakt ~ 800-1000 bp band sem hafði ekki komið fram áður við TA = 50°C.

Eftirtaldir vísar gáfu þessi bönd:

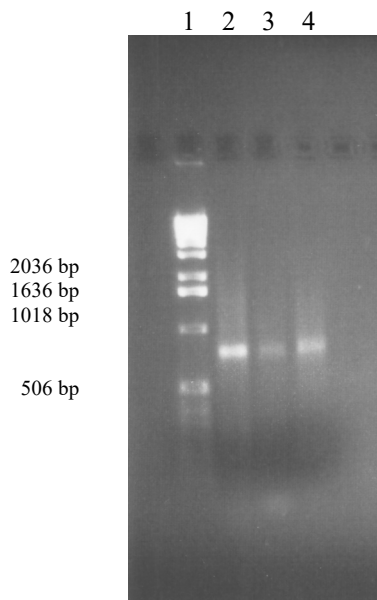
T7 – Fw

Cn.HGS.82 – Rev: TA = 48°C

Cn.HGS.93 – Rev: TA = 52°C

Cn.HGS.163 – Rev: TA = 53°C

Böndin voru einangruð með odda PCRi sem var keyrt við TA = 50°C, sjá mynd 15.



Mynd 15. Odda PCR-5

1. 1 Kb Ladder
2. T7 – Fw + Cn.HGS.82 – Rev: ~ 800-1000 bp band
3. T7 – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: ~ 800-1000 bp band
4. T7 – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: ~ 800-1000 bp band

Sýni úr brunnum 2-4 voru raðgreind.

Raðgreiningin var slæm og gaf engar niðurstöður. Ekkert viðmiðunarsýni var keyrt með keyrslunni.

6. PCR-6 – Athugun á styrk ExoSAP afurða

Þar sem raðgreiningar 2-5 komu illa út var farið að athuga hverjar ástæðurnar gætu verið. ExoSAP afurðir frá PCR-5 voru ljósmældar, sýni á mynd 15, til þess að athuga styrkinn á sýnunum fyrir raðgreiningu.

Tafla 15. Niðurstöður ljósmælingar á ExoSAP afurð PCR-5 (sýni á mynd 15)

Sýni	Styrkur (ng/μL)
1. T7 – Fw + Cn.HGS.82 – Rev	325
2. T7 – Fw + Cn.HGS.93 – Rev	273
3. T7 – Fw + Cn.HGS.163 – Rev	274

Framkvæmt var odda PCR á öllum sýnunum þremur í töflu 15 aftur, auk viðmiðunarsýnis. Einungis náðist að magna upp eitt sýni (sýni nr. 3 í töflu 15) aftur með odda PCRinu auk viðmiðunarsýnisins. Sýnin tvö voru hreinsuð með ExoSAP fyrir raðgreiningu og ljósmæld, sjá töflu 16.

Tafla 16. Niðurstöður ljósmælingar á ExoSAP afurð frá odda PCR (PCR - 6)

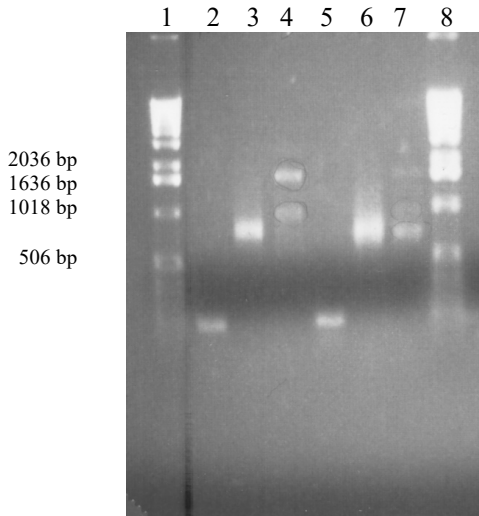
Sýni	Styrkur (ng/μL)
1. T7 – Fw + Cn.HGS.163 – Rev	188
2. Viðmiðunarsýni	154

Sýni 1 og 2 í töflu 16 voru raðgreind.

Raðgreining á viðmiðunarsýni tókst vel en raðgreining á sýni 1. (T7 – Fw + Cn.HGS.163 – Rev) var ekki fullnægjandi. Það sem var nothæft úr þeirri raðgreiningu var borið saman við aðrar DNA raðir sem birtar hafa verið á netinu (forrit í viðauka II) og reyndist raðgreinda röðin vera ferja (vektor).

7. PCR-7

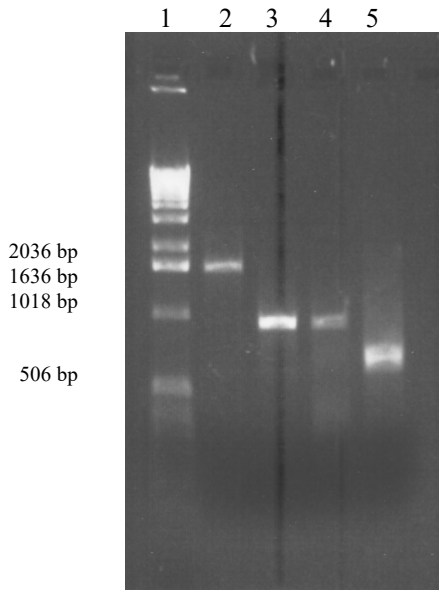
Vísarnir M13 (-40) – Fw, T7 – Fw, ZAP II E-Ad.seq – Fw, Cul.s3 R2 – Rev og C.son FPYCFNMN–Rev, mögnuðu upp DNA bönd á bilinu ~ <500 bp – 1600 bp úr λ -cDNA safninu þynntu 1:10, sjá mynd 16:



Mynd 16. PCR-7

1. 1 kB Ladder
2. ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) + Cul.s3 R2 – Rev: <500 bp band
3. T7 – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~ 800 bp band
4. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~1600 bp og 1000 bp bönd
5. ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) + C.son FPYCFNMN – Rev: <500 bp band
6. T7 – Fw + C.son FPYCFNMN – Rev: ~ 800 bp band
7. M13 (-40) – Fw + C.son FPYCFNMN – Rev: ~ 1000 bp og 800 bp bönd
8. 1 kB Ladder

Framkvæmt var odda PCR á sýnum úr brunnum 4 og 7 til að einangra böndin, sjá mynd 17.



Mynd 17. Odda PCR-7

1. 1 kB Ladder
2. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~1600 bp band
3. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~1000 bp band
4. M13 (-40) – Fw + C.son FPYCFNMN – Rev: ~ 1000 bp band
5. M13 (-40) – Fw + C.son FPYCFNMN – Rev: ~ 800 bp band

Sýnin úr brunnum 2-5 (mynd 17) voru raðgreind ásamt sýnum úr brunnum 2, 3 , 5 og 6, (mynd 16), sjá raðgreiningu – 7, bls. 54.

8. PCR-8 – Athugun á þynningum

Þegar niðurstöður úr PCR-6 og raðgreiningu-6 voru skoðaðar nánar kom í ljós að þegar styrkur DNA var minni kom raðgreiningin betur út, samanber niðurstöður ljósmælinga á ExoSAP afurðum í töflum 15 og 16.

Leiðarvísir raðgreiningartækisins mælir með að þegar notast er við BigDye raðgreiningar PCR eigi ekki að nota meira en 5-20 ng af DNA sé DNA búturinn sem verið er að raðgreina um 500-1000 bp. Ef búturinn er 1000-2000 bp er mælt með því að nota 10-40 ng af DNA.

Út frá þessum niðurstöðum var því ákveðið að ljósmæla ExoSAP afurð frá PCR-7 úr brunnum 2-5 á mynd 17.

Tafla 17. Niðurstöður ljómælingar á ExoSAP afurð frá PCR-7 úr brunnum 2-5 (mynd 17).

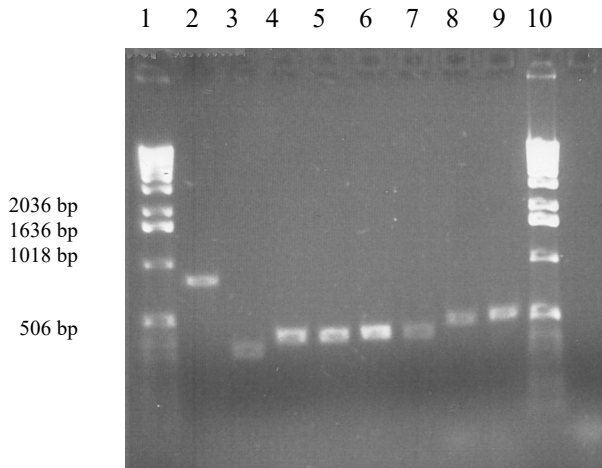
Sýni	Styrkur (ng/ μ L)
1. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~1600 bp band	207
2. M13 (-40) – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~1000 bp band	222
3. M13 (-40) – Fw + C.son FPYCFNMN – Rev: ~ 1000 bp band	287
4. M13 (-40) – Fw + C.son FPYCFNMN – Rev: ~ 800 bp band	252

ExoSAP afurðirnar voru því næst næst þynntar 1:10 (1 μ L DNA + 9 μ L dH₂O) og að lokum voru þynnt sýni raðgreind á hefðbundinn hátt.

Raðgreining með þynntum ExoSAP afurðum (1:10) kom ekki betur út en með óþynntum sýnum. Ekki þótti ástæða til að endurtaka raðgreininguna þar sem önnur sýni sem voru keyrð í sömu keyrslu gáfu fullnægjandi niðurstöður.

9. PCR-9

Vísarnir C.son GGVPQEG – Fw, Cul.s3 (501) – Rev, Cul.s3 R2 – Rev, Cn.HGS.82 – Rev, Cn.HGS.83 – Rev, Cn.HGS.93 – Rev, Cn.HGS.96 – Rev, Cn.HGS.163 – Rev og Cn.HGS.182 – Rev, mögnuðu upp DNA bönd á bilinu ~ <500 bp – 900 bp úr λ -cDNA safninu þynntu 1:10, sjá mynd 18:



Mynd 18. PCR-9

1. 1 kB Ladder
2. C.son GGVPQEG – Fw + Cul.s3 (501) – Rev: ~ 900 bp band
3. C.son GGVPQEG – Fw + Cul.s3 R2 – Rev: ~ < 500 bp band
4. C.son GGVPQEG – Fw + Cn.HGS.82 – Rev: ~ < 500 bp band
5. C.son GGVPQEG – Fw + Cn.HGS.83 – Rev: ~ < 500 bp band
6. C.son GGVPQEG – Fw + Cn.HGS.93 – Rev: ~ < 500 bp band
7. C.son GGVPQEG – Fw + Cn.HGS.96 – Rev: ~ < 500 bp band
8. C.son GGVPQEG – Fw + Cn.HGS.163 – Rev: ~ 500 bp band
9. C.son GGVPQEG – Fw + Cn.HGS.182 – Rev: ~ 500 bp band
10. 1 kB Ladder

Sýni úr brunnum 2-5 voru raðgreind, sjá raðgreiningu – 9, bls. 55. (Búist var við svipaðri raðgreiningu úr brunnum 6-9 og 4-5.)

10. PCR-10

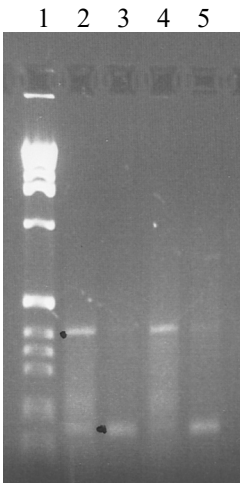
Vísarnir ZAP II E-Ad.seq – Fw og C.nub. GGVPQEG – Rev mögnuðu upp DNA bönd á bilinu ~ <220 bp – 400 bp úr λ -cDNA safninu þynntu 1:10, sjá mynd 19:

PCRið var framkvæmt við tvö hitastig, 50°C og 55°C þar sem TM vísanna er frekar hátt, ZAP II E-Ad.seq – Fw = 61,8°C og C.nub. GGVPQEG – Rev = 59,8°C.

Fyrri PCRið gaf tvö mjög óljós bönd, < 500 bp. Því var ákveðið að endurtaka PCRið á PCR afurðunum, auk þess að keyra annað PCR frá byrjun með því að blanda báða vísa uppá nýtt og blanda nýtt λ -cDNA safn (þynning 1:10) til að útiloka að hvarfefni væru orðin of gömul.

Fyrri PCRið var rafdreigið á 1% agarósahlaupi í 30 mín, en því meiri sem styrkur agarósa er í hlaupi því betri aðgreining fæst á litlum DNA bútum. Því var ákveðið að rafdraga seinna PCRið á 1,5% agarósahlaupi í 40 mín til að tryggja góða aðgreiningu og til að meta betur stærð bandanna.

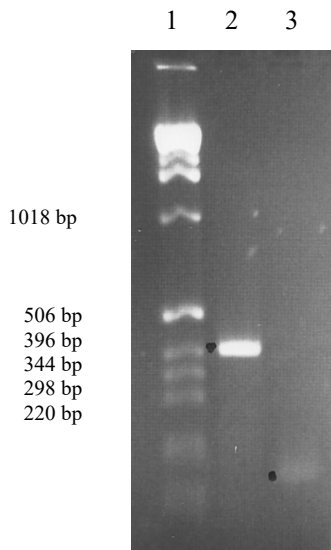
1018 bp
506 bp
396 bp
344 bp
298 bp
220 bp



Mynd 19. PCR-10 (1,5% agarósahlaup)

1. 1 kb Ladder
2. ZAP II E-Ad.seq – Fw + C.nub. GGVPQEG – Rev: (PCR af PCR afurð; 50°C) ~ 400 bp band
3. ZAP II E-Ad.seq – Fw + C.nub. GGVPQEG – Rev: (Nýtt þynnt λ -cDNA safn 1:10; 50°C) ~ <220 bp
4. ZAP II E-Ad.seq – Fw + C.nub. GGVPQEG – Rev: (PCR af PCR afurð; 55°C) ~ 400 bp band
5. ZAP II E-Ad.seq – Fw + C.nub. GGVPQEG – Rev: (Nýtt þynnt λ -cDNA safn 1:10; 55°C) ~ <220 bp

Framkvæmt var odda PCR á sýnum úr brunnum 2 og 3 (50°C) til að einangra böndin, sjá mynd 20.



Mynd 20. OddaPCR-10 (1,5% agarósaflaup)

1. 1 kB Ladder

2. ZAP II E-Ad.seq – Fw + C.nub. GGVPQEG – Rev: (PCR af PCR afurð; 50°C) ~ 400 bp band

3. ZAP II E-Ad.seq – Fw + C.nub. GGVPQEG – Rev: (Nýtt þynnt λ -cDNA safn 1:10; 50°C) ~<220 bp

Sýni úr brunnnum 2 og 3 voru raðgreind.

Raðgreiningin á sýni 2 (~396 bp band) kom vel út en þegar próteinröðinni var borið saman við þekktar prótein raðir á netinu kom í ljós, að röðin skráði fyrir N-acetylneuraminate lyasa í *Escherichia coli* og öðrum bakteríum. Ekkert kom út úr raðgreiningu á sýni 3 (<220 bp band).

4.2 Niðurstöður úr raðgreiningu

1. Raðgreining - 1

Raðgreiningar PCR með vísunum Cul.s3 (17) – Fw og Cul.s3 (501) – Rev gáfu eftirtalda raðgreiningu (484 bp):

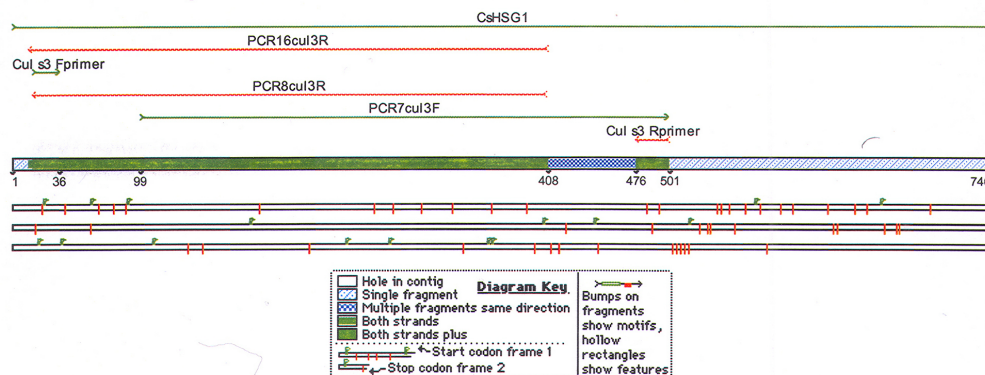
```
TTAATATGAATGGCGGTGCAAATATGAAAGAGGATTGTCCATCTAATGTAAAGAGGAAAATAATCGCATT  
AAATGGCTGTGGGATATTGTTCGATGTGGTTTTGCCTTCAGTTTATTTGAACAACAAAATAACAGCATCAC  
AAAGAGTCCAATTTGTTTCGTGGGCGAATGCGTGAAGGATATCGTGTGTCACAATTATCAAAAACAACAGT  
GAAACCACCAGTATACAGTTATTTGCGTTATGTTTACACGGACAACCTAAAATACATTTCAAATGAGGAT  
CTCAAACAATCAATTAAGTATCCAAAGAGCAAAAGGGTAGTGGATTAATATTTTGGGGCAGTTCATATG  
ATGTCAAACGAAAGATCAGTGTTTTGATTTTAGAAATTATGTTGATAATAATTTAGGACCAATTGTACT  
ATCAGCAAATGACAATACACCAAAAATTCTTACCCCAAATTTGTCATAATTGACCTGAAATATT
```

Pörun vísa við DNA röð er yfirstrikuð með grænu.

Amínósýruröðin (140 as):

```
CKEENNRKWLWDIVDVVLPVYLNNKITASQRVQFVRGRMREGYRVSQLSKQPVKPPVYSYLRYVYTDN  
LKYISNEDLKQSIKVSKEQKGSGLIFWGSSYDVKTKDQCFDFRNYVDNNLGPVLSANDNTPKILTPNLS
```

Raðgreindu basaröðinni og amínósýruröðinni úr *C. nubeculosus* og birtum röðum úr *C. sonorensis* eru bornar saman til að meta hversu líkar þær eru, sjá viðauka VIII.



Mynd 21. Raðgreining – 1

Myndin er úr Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu. Forritið blastar saman hluta af birtri HGS röð úr *C. sonorensis* (CsHGS1) og þeim hluta *C. nubeculosus* raðarinnar sem er raðgreind.

2. Raðgreining – 7

Raðgreiningar PCR með vísunum ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) og Cul.s3 R2 – Rev gáfu raðgreiningu sem náði yfir 285 bp og 94 as.

Raðgreiningar PCR með vísunum ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) og C.son FPYCFNMN – Rev gáfu raðgreiningu sem náði yfir 293 bp og 97 as.

Raðgreining með vísun frá PCR-7 var endurtekin með þynntum ExoSAP afurðum (1:2), sjá útskýringu við PCR-8.

Raðgreiningin kom í heild sinni ekki betur út með þynntum ExoSAP afurðum (1:2).

Raðgreiningar PCR með vísunum ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) og Cul.s3 R2 – Rev gáfu raðgreiningu með þynntri ExoSAP afurð (1:2) sem náði yfir 125 bp og 41 as.

Basaraðirnar eru settar saman í Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu sem býr til eina röð úr þeim öllum sem nær yfir lengra svæði. Basaröðin er því næst þýdd yfir í prótein röð með expasy translate tool forritinu.

Basaröðin (308 bp):

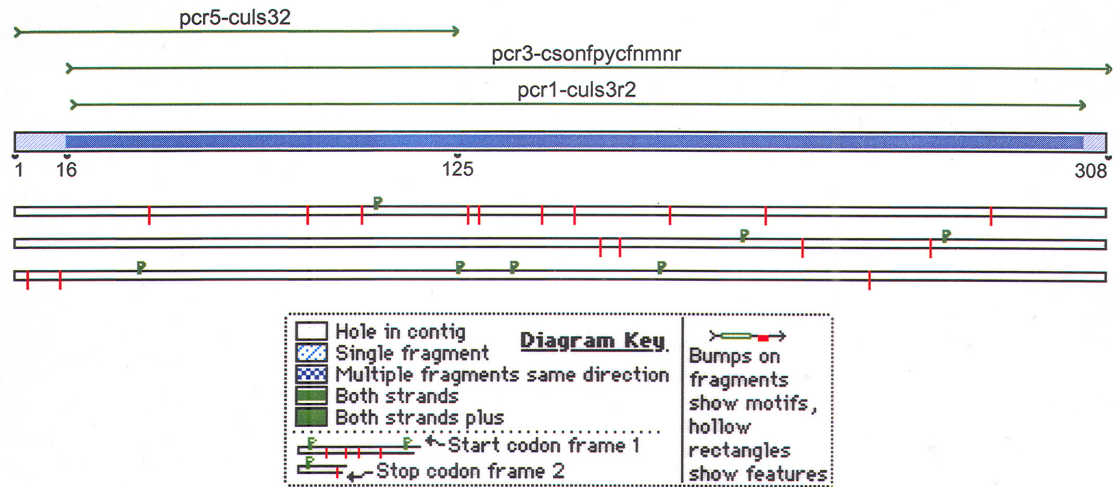
```
CGTAAATATTTTGAAC TTTACCGTTTCTTCTACAAATGAACGACCAGCTGTTTCAAATTCACGAGCTGCC  
TCTTCTTCAATTAAC TTTCTTGCTCCATAATCTATGCTTTCTTTGCACCAATTTATATGATAAATCCTTAT  
ATGGCTGTAACACACCTGAATTTTGACGATAAATCGGTCGCCATGACTCAAATCAATCACTCCAATGCC  
TGAGAAATTTTGATCTGGTATCAAGGTATTAACACTTTTCAGCAAATAATCGATGTGTTCTTGTAATTT  
CCTTCTTGTGGTACACCACCATTTTCGTC
```

Amínósýruröðin (102 as):

```
RNGGVPQEGNLQEHIDYFAESVNTLIPDQNFSGIGVIDFESWRPIYRQNSGVLQPYKDL SYKLVQRKHRL  
WSKKLIEEEAAREFETAGRSFVEETVKFKIFT
```

Vísarnir eru utan raðgreiningarsvæðisins, en raðgreinda basaröðin og amínósýruröðin úr *C. nubeculosus* og birtar raðir HGS úr *Aedes aegypti* eru bornar saman til að meta hversu líkar þær eru, sjá viðauka VIII.

Raðgreining-7 er framar á geninu en raðgreining-1, en eftir átti að magna upp og raðgreina svæðið á milli þeirra. Við samanburð á amínósýruröðum annarra bitflugna sést að á þessu svæði er vel varðveitt amínósýruröð; FPYCFNMN.



Mynd 22. Raðgreining – 7

Myndin er úr Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu. Myndin sýnir raðirnar úr raðgreiningu-7 settar saman í eina röð.

3. Raðgreining – 9

Raðgreiningar PCR með vísunum C.son GGVPQEG – Fw og Cul.s3 (501) – Rev gáfu raðgreiningu sem náði yfir 461 bp/443 bp og 105 as/147 as.

Raðgreiningar PCR með vísunum C.son GGVPQEG – Fw og Cul.s3 R2 – Rev gáfu raðgreiningu sem náði yfir 304 bp/281 bp og 97 as/45 as.

Raðgreiningar PCR með vísunum C.son GGVPQEG – Fw og Cn.HGS.82 – Rev gáfu raðgreiningu sem náði yfir 355 bp/340 bp og 112 as/82 as.

Raðgreiningar PCR með vísunum C.son GGVPQEG – Fw og Cn.HGS.83 – Rev gáfu raðgreiningu sem náði yfir 231 bp/360 bp og 62 as/89 as.

Fjöldi aínósýra fer eftir lengsta opna lesramma sem expasy translate tool forritið gefur upp (forrit í viðauka II).

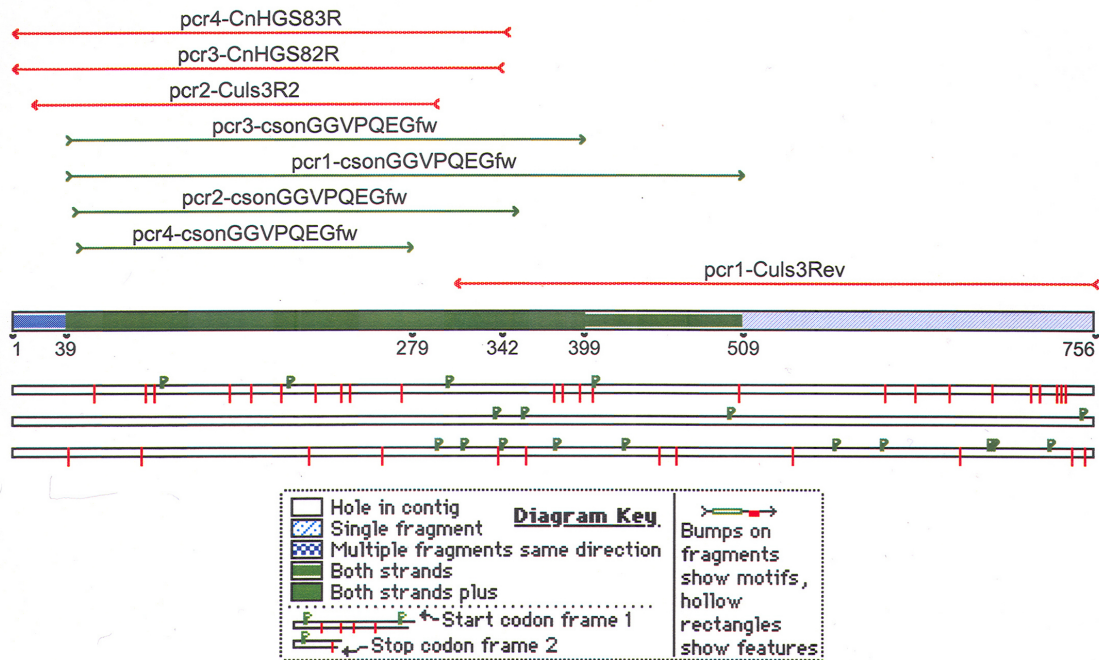
Basaraðirnar eru settar saman í Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu sem býr til eina samfellda (consensus) röð úr þeim öllum sem nær yfir lengra svæði. Basaröðin er því næst þýdd yfir í prótein röð með expasy translate tool forritinu.

Basaröðin (754 bp):

CAAGAAGGAAATTTACAAGAACACATCGATTATTTTGGCTGAAAGTGTTAATACCTTGATACCAGATCAAA
 ATTTCTCAGGCATTGGAGTGATTGATTTTGGATCATGGCGACCGATTTATCGTCAAAATTCAGGTGTGTT
 ACAGCCATATAAGGATTTATCATATAAAATGGTGCAAAGAAAGCATAGACTATGGAGCAAGAAGTTAATT
 GAAGAAGAGGCAGCTCGTGAATTTGAAACAGCTGGTCGTTTCATTTGTAGAAGAAACGGTTAAAGTTGCAA
 AATATTTACGTCCAAATGCAAATGGGGCTATTATGGATTTCCCATATTGTTTCAATATGAATGGTGGTGC
 AAATATGAAAGAGGATTGTCCATCTAATGTTAAAGAGGAAAATAATCGCATTAAATGGCTGTGGGATATT
 GTCGATGTGGTTTTGCCTTCAGTTTTATTTGAACAACAAAATAACAGCATCACAAAGAGTCCAATTTGTTTC
 GTGGGCGAATGCGTGAAGGATATCGTGTGTGACAATTATCAAAAACAACAGTGAAACCACCAGTATACAG
 TTATTTGCGTTATGTTTACACGGACAACCTAAAATACATTTCAAATGAGGATCTCAAACAATCAATTTAAA
 GTATCCAAAGAGCAAAGGGTAGTGGATTAATATTTTGGGGCAGTTCATATGATGTCAAACGAAAGATC
 AGTGTTTTGATTTTAGAAATTATGTTGATAATAATTTAGGACCAATGACTATCA

Aminósýruröðin (251 as)

QEGNLQEHI DYFAESVNTLIPDQNFSGIGVIDFESWRPIYRQNSGVLQPYKDL SYKLVQR
 KHLRWSKKLIEEEAAREFETAGRSFVEETVKVAKYLRPNKAWGYGFPYCFNMNGGANMK
 EDCPSNVKEENNRIKWLWDIVDVVLPVYLNNKITASQRVQFVRGRMREGYRVSQLSKQP
 VKPPVYSYLRYVYTDNLKYISNEDLKQSIKVSKEQKSGLI FWGSSYDVKTKDQCFDRN
 YVDNNLGPMTI



Mynd 23. Raðgreining - 9

Myndin er úr Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu. Myndin sýnir raðgreindu raðirnar úr raðgreiningu -9 settar saman í eina röð.

Raðirnar brúa bilið á milli raðgreiningar-1 og raðgreiningar-7.

Raðgreinda basaröðin og aminósýruröðin úr *C. nubeculosus* og birtar raðir úr *Aedes aegypti* eru bornar saman til að meta hversu líkar þær eru, sjá viðauka VIII.

4.3 Niðurstöður – Samantekt

Það tókst að klóna um það bil 75% hyaluronoglucosaminidase-gensins úr λ -ZAP II cDNA safni *Culicoides nubeculosus* í þremur skrefum. Ekki náðist að klóna fremsta hluta gensins. Búið er að raðgreina 824 basapör og 272 amínósýrur.

Basaröðin (824 bp):

```
CAATTATGACAAATTTGGGGTAAGAATTTTTGGTGTATTGTCATTTGCTGATAGTACAATTGGTCCTAAA  
TTATTATCAACATAATTTCTAAAATCAAAACACTGATCTTTTCGTTTTGACATCATATGAACTGCCCCAAA  
ATATTAATCCACTACCCTTTTGGTCTTTGGATACTTTAATTGATTGTTTGGATCCTCATTGAAATGTA  
TTTTAGGTTGTCCGTGTAAACATAACGCAAATAACTGTATACTGGTGGTTTTCACTGGTTGTTTTGATAAT  
TGTGACACACGATATCCTTCACGCATTCGCCCACGAACAAATTGGACTCTTTGTGATGCTGTTATTTTGT  
TGTTCAAATAAACTGAAGGCAAAACCACATCGACAATATCCACAGCCATTTAATGCGATTATTTTCCTC  
TTTAACATTAGATGGACAATCCTCTTTTCATATTTGCACCACCATTTCATATTTAAACAATATGGGAATCCA  
TAATAGCCCCATTTTGCATTTGGACGTAAATATTTTGCAACTTTAACCGTTTCTTCTACAAATGAACGAC  
CAGCTGTTTTCAAATTCACGAGCTGCCTCTTCTTCAATTAACCTTCTTGCTCCATAGTCTATGCTTTCTTTG  
CACCAATTTATATGATAAATCCTTATATGGCTGTAACACACCTGAATTTTACGATAAATCGGTCGCCAT  
GACTCAAATCAATCACTCCAATGCCTGAGAAATTTTGGATCTGGTATCAAGGTATTAACACTTTTCAGCAA  
AATAATCGATGTGTTCTTGTAAATTTCTTCTTGTGGTACACCACCATTTTCGTC
```

Amínósýruröðin (272 as):

```
RNGGVPQEGNLQEHIDYFAESVNTLIPDQNFSGIGVIDFESWRPIYRQNSGVLQPYKDLSYKLVQRKHRL  
WSKKLIEEEAAREFETAGRSFVEETVKVAKYLRPNAKWGYYGFPYCFNMGGANMKEDCPSNVKEENNRI  
KWLWDIVDVVLPVYLNKITASQRVQFVRGRMREGYRVSQLSKQPVKPPVYSYLRYVYTDNLKYISNED  
LKQSIKVSKEQKGSGLIFWGSSYDVTKDQCFDFRNYVDNNLGPVLSANDNTPKILTPNLS
```

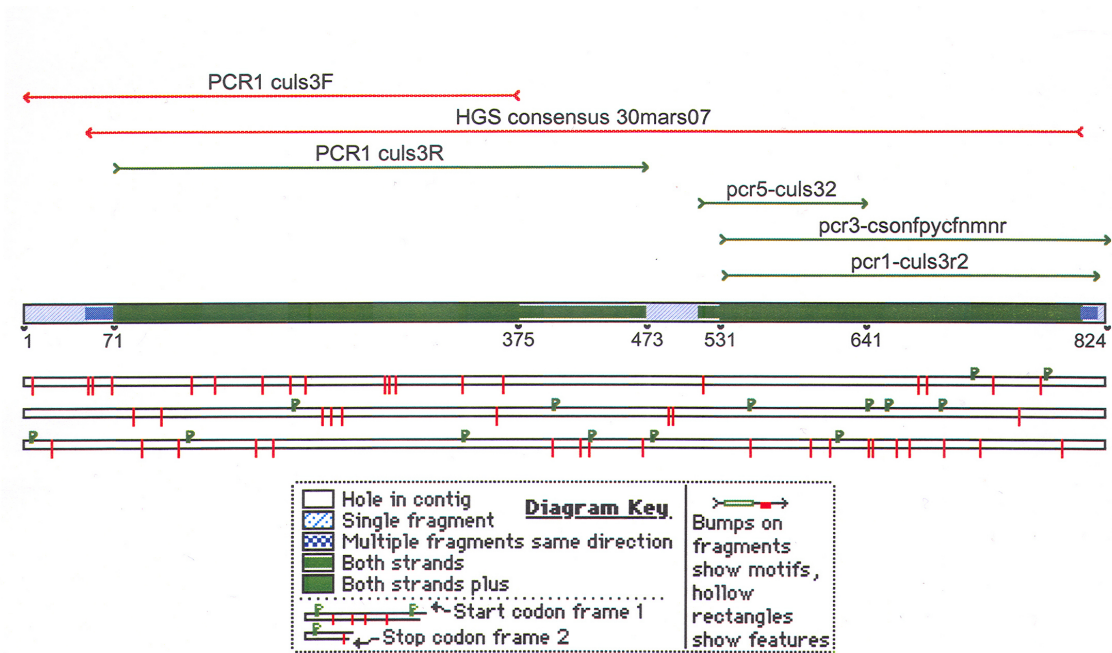
Með því að bera saman stærð HGS gensins í öðrum bit- og stunguflugum (viðauki III) má ætla að genið í *C. nubeculosus* sé um 900-1100 basapör að lengd.

Basaröðin og amínósýruröðin settar saman upp til að sjá hvaða basaröð skráir fyrir hverja amínósýru:

```
gacgaaatgggtggtaccacaagaaggaaatttacaagaacacatcgattatTTTTgctgaa
  R N G G V P Q E G N L Q E H I D Y F A E
agtgttaataccttgataccagatcaaaatTTctcaggcattggagtgattgattttgag
  S V N T L I P D Q N F S G I G V I D F E
tcatggcgaccgatttatcgtcaaaatTCaggtgtgttacagccatataaggatttatca
  S W R P I Y R Q N S G V L Q P Y K D L S
tataaattgggtgcaaagaaagcatagactatggagcaagaagttaattgaagaagggca
  Y K L V Q R K H R L W S K K L I E E E A
gctcgtgaatTTgaaacagctggctcgttcatTTgtagaagaaacggTTaaagTTgcaaaa
  A R E F E T A G R S F V E E T V K V A K
tatttacgtccaaatgcaaaatggggctattatggattcccatattgTTTTaatatgaat
  Y L R P N A K W G Y Y G F P Y C F N M N
ggTggTgcaaatatgaaagaggattgtccatctaattgTTaaagaggaaaataatcgcatt
  G G A N M K E D C P S N V K E E N N R I
aaatggctgtgggatattgtcgtatgtggTTTTgccttcagTTTTatttgaacaacaaaata
  K W L W D I V D V V L P S V Y L N N K I
acagcatcaciaaagagtccaatTTgttcgtgggcgaatgcgtgaaggatatcgtgtgtca
  T A S Q R V Q F V R G R M R E G Y R V S
caattatcaaaacaaccagtgaaaccaccagtatacagttatTTgcgttatgTTtacag
  Q L S K Q P V K P P V Y S Y L R Y V Y T
gacaacctaaaatacatttcaaatgaggatctcaaacaaatcaattaaagtatccaaagag
  D N L K Y I S N E D L K Q S I K V S K E
caaaagggtagtggattaatTTTTggggcagttcatatgatgtcaaaacgaaagatcag
  Q K G S G L I F W G S S Y D V K T K D Q
tgTTTTgattTTtagaaattatgTTgataataatTTaggaccaattgtactatcagcaaat
  C F D F R N Y V D N N L G P I V L S A N
gacaatacaccaaaaaatttcttaccoccaaatttgtcaTaaTTg
  D N T P K I L T P N L S - L
```

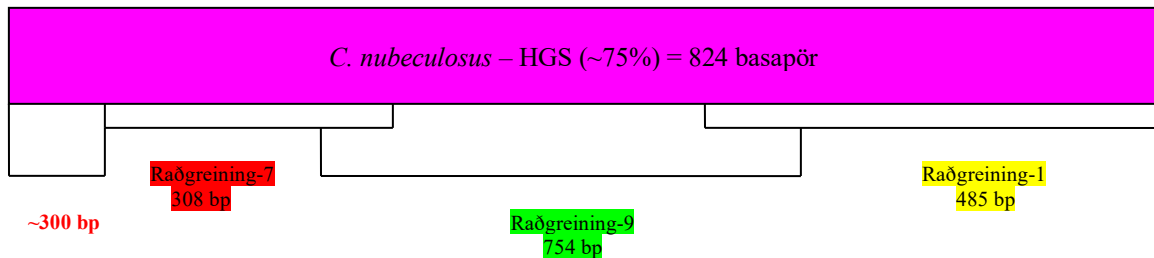
Stopptákninn – taa – er yfirstrikaður með rauðu. Það vantar byrjunina á röðinni og þar með byrjunartáknann.

Raðgreind basaröð og amínósýruröð HGS gensins úr *Culicoides nubeculosus* og birtum röðum úr *Aedes aegypti* er blastað saman til að meta hversu líkar þær eru, sjá viðauka VIII.



Mynd 24. Basaraðir úr raðgreiningum 1, 7 og 9 settar saman í eina röð.

Myndin er úr Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu. Myndin sýnir raðgreindu raðirnar úr raðgreiningum -1, -7 og -9 settar saman í eina röð, þ.e. 1-824. ~ 75% HGS gensins er 824 basapör.



Mynd 25. Einfölduð yfirlitsmynd af raðgreiningum HGS gensins í *C. nubeculosus*.

Yfirlitsmyndin sýnir gróflega hvernig raðgreiningarnar náðu yfir HGS genið. Um það bil 300 bp vantar fremst á genið.

5. Umræður

Markmið verkefnisins var að klóna og raðgreina hyaluroglucosaminidase genið (HGS-geníð) úr smámýi. Genið skráir fyrir ensíminu hýalúronidasa, sem er talið vera líklegur ofnæmisvaki í sumarexemi í hestum. Með því að klóna gen ofnæmisvakans er hægt að tjá og framleiða próteinið og prófa það síðan fyrir ofnæmisvirkni hjá hestum með sumarexem.

Hýalúronidasi er ensím sem finnst í hryggdýrum, bakteríum, blóðsugum (liðormum) og vissum krabbadýrum. Ensímið hefur samskonar virkni í öllum tegundunum, sem er að brjóta niður hýalúronsýru í fjórsykrur (Stern & Jedrzejewski, 2006). Hýalúronsýra er slímjölksykra sem finnst í miklu magni í bandvef, og þegar bit- og stunguflugur (æðvængjur) gera gat á yfirborð húðar, virkar ensímið sem einskonar útbreiðsluþáttur, sem auðveldar gegnflæði annarra eiturefna og blóðstorkuheftandi þátta sem flugan seytir, og auðveldar henni blóðupptöku (Ribeiro et al., 2000; Soldatova et al., 1998).

Hýalúronidasi hefur verið greindur sem megin ofnæmisvaki í stunguvökva hjá býflugum og vespum/geitungum (Fitzgerald & Flood, 2006). Auk þess hefur hann fundist og talinn hafa ofnæmisvirkni, hjá maurum (fire ants) (Fitzgerald & Flood, 2006), moskítóflugum (Ribeiro et al., 2004), og bitmýi (Ribeiro et al., 2000).

Í birtum *Culicoides sonorensis* genaröðum er röð sem hefur samsvörun við HGS-gen annara tegunda. Um það bil helmingur gensins hefur verið raðgreint í þessari smámýstegund, og er ensímið talið vera ofnæmisvaki líkt og hjá stunguflugum (Campbell et al., 2005). Með því að blasta raðgreindu röðinni í *C. sonorensis* á vefsíðunni, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, koma upp þær tegundir sem hafa mesta samsvörun í genaröðum sínum við þetta tiltekna gen. Ef stærðir genanna í hinum mismunandi tegundum eru bornar saman, má áætla að HGS-geníð í *C. sonorensis* sé á bilinu 900-1100 basapör. Gera má ráð fyrir að *C. sonorensis* og *C. nubeculosus* séu náskyldar, og því er hægt að áætla að genið sé svipað að stærð í *C. nubeculosus*. Sjá stærð HGS-gens í öðrum skordýrategundum í viðauka III.

Þar sem búið var að raðgreina 485 basapör af HGS-geninu í *C. sonorensis* þá var byrjað á að notast við þá röð til að útbúa vísa fyrir genið í *C. nubeculosus*, í þeirri von að genin væru nógu lík til að vísarnir gætu bundist. Vísarnir gáfu stakt band í rafdrætti og raðgreiningu upp á 484 basapör, (raðgreining-1). Út frá þeirri röð voru síðan útbúnir sex Rev vísar sem voru notaðir á móti ferjuvísunum. PCR hvörf með þessum vísunum gáfu ekki stök bönd í rafdrætti, en bönd sem mynduðust voru einangruð með odda PCR og raðgreind. Raðgreiningarnar gáfu ekki nothæfar niðurstöður.

Til þess að reyna að bæta PCRið og raðgreininguna, var athugað mismunandi hvarfhitastig og styrkur á DNA.

Mælt er með því að hafa bindihitastig (TA) um það bil 5°C lægra en bráðnunarhitastig (TM) vísa, en því hærra sem TA er, því sértækari verður binding vísa við einþátta DNA. Til að spara tíma og fjölda PCR hvarfa voru flest hvörfin keyrð við TA = 50°C, sem var meðalhitastig flestra vísanna. Nokkur PCR hvörf voru keyrð aftur við fimm mismunandi hitastig (PCR-5). Sömu bönd mynduðust í rafdrætti við þessi hitastig og við TA = 50°C. Í þremur tilfellum myndaðist þó eitt nýtt greinilegt ca. 900 basapara band við TA = 48°C, 52°C og 53°C. Böndin voru einangruð með odda PCR sem var keyrt við TA = 50°C og stöku böndin að lokum raðgreind. Ekki fengust nothæfar niðurstöður, þannig að breyting á TA hitastigi PCR hvarfsins gaf önnur bönd í rafdrætti, en ekki betri raðgreiningu.

Fyrir BigDye raðgreiningar PCR er mælt með að nota ekki meira en 5-20 ng af DNA fyrir 500-1000 basapara bút og 10-40 ng fyrir 1000-2000 basaparbút. Reynt var að þynna sýni að þessum viðmiðum, en ekki fengust betri raðgreiningar niðurstöður með þynntum sýnum.

Með notkun tveggja nýrra sértækra vísna og ZAP II E-Ad.seq – Fw ferjuvísisins, tókst að raðgreina 308 basapör framarlega í HGS-geninu, (raðgreining-7). Annar sértæki vísirinn var gerður með því að snúa við Cul.s3 (17) – Fw í Rev (Cul.s3 R2 – Rev). Hinn var hannaður með því að athuga mjög vel varðveitt amínósýrusvæði í HGS-geni ýmissa bitflugna, FPYCFNMN (C.son FPYCFNMN). Raðgreinda svæðið sem fékkst

með þessum vísun náði ekki að fyrra svæðinu sem tekist hafði að raðgreina áður, heldur var eyða á milli þeirra.

Framarlega í seinni raðgreiningunni sem tókst var amínósýrusvæðið, GGVPQEG. Þetta amínósýrusvæði er einnig mjög vel varðveitt í mörgum bitflugum, en hannaður var Fw vísir yfir nákvæmlega þetta svæði með því að blasta saman HGS-genaröðum nokkurra bitflugna. Þar sem fleiri en ein basaröð getur skráð fyrir hverja amínósýru þá var reynt að séraðlaga vísir fyrir *C. sonorensis*, með því að notast við upplýsingar um amínósýrutákna fyrir þessa tegund, (vefsíða: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Culicoides+sonorensis+%5Bgbinv%5D&aa=1&style=GC>.) Á vefsíðunni sést hvaða þrjár basar eru líklegastir til að skrá fyrir hverja amínósýru í flugunni. Vísirinn fékk heitið C.son GGVPQEG – Fw.

Með því að nota C.son GGVPQEG – Fw vísinn á móti Rev vísun sem náðu inná fyrsta raðgreinda svæðið, tókst að magna upp eyðuna sem vantaði. Með vísunum tókst að raðgreina 754 basapör, (raðgreining-9).

Til að reyna að ná upp fremsta hluta gensins var hannaður Rev vísir eftir GGVPQEG svæðinu í *C. nubeculosus* flugunni og á móti notaður ZAP II E-Ad.seq – Fw ferjuvísirinn. Í rafdrætti kom fram band af réttri stærð, eða um 400 bp. Búið var að áætla að það vantaði um það bil 300-400 basapör fremst á genið. Bandið var ekki stakt í sýninu og því var það einangrað með odda PCR og að lokum raðgreint.

Raðgreiningin kom vel út en því miður var ekki um HGS-genið að ræða, heldur skráði röðin fyrir N-acetylneuraminate lyasa í *E. coli* og öðrum bakteríum, en í bakteríum eru hýalúronidasasím sem kallast lyasar. λ - ZAP II cDNA safnið í *C. nubeculosus* er framleitt í *E. coli* og því hafa vísarnir fundið sambærileg og jafnvel betri bindistaði í bakteríunni en á HGS-geni flugunnar. Þar sem þetta mistókst voru að lokum hannaðir nýir vísar eftir vel varðveittum amínósýruröðum í moskítóflugunni *Aedes aegypti* til að ná upp fremsta hluta gensins. Með því að bera saman HGS-genaraðir úr moskítóflugunum *A. aegypti* og *Anopheles gambiae* sést að genið í báðum flugunum byrjar á amínósýrunum MCNQ. M táknar amínósýruna methíónín, en öll gen byrja á upphafstáknanum ATG sem skráir fyrir methíónín. Því var hannaður Fw vísir eftir nákvæmlega þessu svæði en honum umbreytt í

C. sonorensis DNA röð. Vísirinn nær að vísu yfir aðeins lengra svæði en MCNQ, en frekar var notast við *A. aegypti* en *A. gambiae* sem „vísa-mót“, því með því að bera saman þann hluta HGS-genins sem búið var að raðgreina í *C. nubeculosus* þá fékkst 53% samsvörun milli amínósýruraðanna í *C. nubeculosus* og *A. aegypti*, en 51% samsvörun milli *C. nubeculosus* og *A. gambiae*. Fimm vísar voru hannaðir á þennan hátt, (síðustu vísar í töflu 5). Því miður tókst ekki að prófa vísanna sökum tímaskorts.

Í heildina tókst að klóna og raðgreina um það bil 75% af áætlaðri stærð hyaluroglucosaminidase geni *Culicoides nubeculosus*. Raðgreindir hafa verið 824 basar sem skrá fyrir 272 amínósýrur. Líklegt er að um það bil 300 basa vanti framan á genið.

Samkvæmt niðurstöðunum þá skiptir mestu máli að vísar séu sértækir og að þeir gefi stök bönd í rafdrætti til að raðgreiningar verði góðar.

Í framhaldi verkefnisins þarf að ná upp fremsta hluta gensins. Vonast er til að hægt sé að gera það með síðustu fimm vísunum sem voru hannaðir, (tafla 5). Þegar tekist hefur að klóna allt genið og raðgreina það, er ætlunin að klóna genið inná pQE ferju til tjáningar og framleiðslu í *E. coli* og inná FastBac HT ferju til tjáningar í Sf-9 skordýrafrumum. Tjáningarkerfið sem hentar best fyrir tjáningu skordýragena er svokallað baculoveirukerfi í skordýrafrumum. Í kerfinu er sykrun og önnur meðhöndlun próteina eftir þýðingu líkust því sem hún er *in vivo*. Hýalúronidasi úr býflugum hefur verið framleiddur bæði í *E. coli* og skordýrafrumum til að bera saman virkni próteinanna við náttúrulega próteinið. Hýalúronidasi sem var framleiddur í skordýrafrumum sýndi sömu líffræðilegu virkni og náttúrulegur hýalúronidasi, en ef ensímið var framleitt í *E. coli* hafði það einungis 20-30% af virkni ensímsins *in vivo* (Soldatova et al., 1998).

Þegar búið er að framleiða og hreinsa hýalúronidasann verður hann prófaður fyrir ofnæmisvirkni á sumarexemshestum. Reynist ensímið vera aðalofnæmisvaki, þ.e. 50% eða fleiri sumarexemshestar svara á það, verður hægt að nota það í þróun á ónæmismedferð gegn sumarexemi í hestum. Forsenda árangursríkrar ónæmismedferðar gegn ofnæmi er að hægt sé að framleiða nægilegt magn af hreinum ofnæmisvökum.

Viðauki I

Samanburður á hýalúronidasa amínósýruröð hjá býflugum (*Apis mellifera*) og smámýinu *Culicoides sonorensis*.

Upplýsingar um amínósýruraðir hýalúronidasana fengust á <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Culicoides sonorensis:

```
1 fpycfnmngg antkedcpn vkeendrikw lwdivdvvlp svylnnkita sqrvqfvrgr
61 mregyrvsq skqpvkppvy sylryvytdt lkyisnedlk qsikvskeqk gsgmifwgss
121 ydvtkdqcf dfrkyvdnnl gpillssndn tpkiltpnls
```

Apis mellifera (Býfluga):

```
1 msrplviteg mmigvllmla pinalllgfv qstpdnnktv refnvywnvp tfmchkyglr
61 feevseygi lqnmwmdkfrg eeiaailydpg mfpallkdpn gnvvarnggv pqlgnltkhl
121 qvfrdhling ipdksfpgvg vidfeswrpi frqnwaslqp ykklsvevvr rehpfwddqr
181 veqeakrrfe kyqqlfmeet lkaakrmrpa anwggyaypy cynltpnqps aqceattmqe
241 ndkmswlfes edvllpsvyl rwnltsgerv glvggrvkea lriarqmtts rkkvlpwywy
301 kyqdrdtdl sradleatlr kitdlgadgf iiwgssddin tkakclqfre ylnnelgpav
361 krialnnaan drltvdvsd qv
```

Amínósýruraðir flugnanna eru bornar saman á heimasíðunni

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Score = 102 bits (255), Expect = 5e-21, Method: Composition-based stats.

Identities = 58/166 (34%), Positives = 97/166 (58%), Gaps = 11/166 (6%)

```
Query 1 FPYCFNMNGGANTKEDCPNVKEENDRIKWLDIVDVVLPSVYLNNKITASQRVQFVRGR 60
+PYC+N+ + + C + +END++ WL++ DV+LPSVYL +T+ +RV V GR
Sbjct 218 YPYCYNLTPNQPSAQ-CEATTMQENDKMSWLFESDVLPSVYLRWNLTSGERVGLVGGR 276

Query 61 MREGYRVSQ---LSKQPVKPPVYSYLRYVYTDTLKY-IGNEDLKQSIKVSKEQKSGMIF 116
++E R+++ S++ V P Y Y Y D +S DL+ +++ + G I
Sbjct 277 VKEALRIARQMTTSRKKVLP----YYWYKYQDRRDTLRADLEATLRKITDLGADGFII 332

Query 117 WGSSYDVKTKDQCFDFRKYVDNNLGPIL--LSSNDNTPKILTNPNS 160
WGSS D+ TK +C FR+Y++N LGP + ++ N+N LT ++S
Sbjct 333 WGSSDINTKAKCLQFREYLNNELGPAVKRIALNNNANDRLTVDVS 378
```


Viðauki II

DNA forrit á netinu og vefsíður sem notaðar eru við vinnslu á verkefnum

1. Biology workbench

Forritið heldur utan um allar upplýsingar sem skráðar eru inni það, svo sem DNA raðir og amínósýruraðir. Einnig getur forritið borið saman DNA og amínósýruraðir auk þess að hanna vísa eftir basaröðum.

<http://workbench.sdsc.edu/>

2. ExPASy Translate tool

Forritið þýðir DNA raðir yfir í amínósýruraðir og kemur með tillögur um lesramma. Forritið sýnir amínósýruraðir með byrjunar- og stopptákna auk þess sem hægt er að skoða saman basaröðina og amínósýruröðin þannig að greinilegt er hvaða basaröð skráir fyrir hverja amínósýru.

<http://www.expasy.org/tools/dna.html>

3. Integrated DNA technologies – Oligo Analyzer

Forritið gefur upp ýmsar upplýsingar um vísa svo sem GC% innihald og útreiknað TM (melting temperature) hitastig þeirra. Einnig snýr forritið „forward“ vísunum yfir í „reverse“.

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

4. NCBI BLAST

Forritið ber saman bæði DNA raðir og amínósýruraðir við aðrar raðir sem birtar hafa verið á netinu.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

5. Pöntun vísa

Vísar eru pantaðir frá TAG Copenhagen.

www.tagc.com

Viðauki III

Samanburður á stærð hýalúronidasa gensins í nokkrum skordýrum, til að áætla stærð gensins í *Culicoides nubeculosus*.

Flugnategund	DNA-fjöldi bp	Prótein-fjöldi as
<i>Culicoides sonorensis</i> (partial cds)	485	160
<i>Aedes aegypti</i> (moskítófluga)	819	272
<i>Anopheles gambiae</i> (moskítófluga) (partial cds)	939	312
<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> (house mosquito)	954	317
<i>Apis mellifera</i> (býfluga)	1149	382
<i>Glyptapanteles indiensis</i> (vespa)	1077	358
<i>Tribolium castaneum</i> (hveitibjalla) (mRNA)	1077	358

Viðauki IV

Vísar sem Þórunn Sóley Björnsdóttir lífeindafræðingur og meistaranemi hefur hannað fyrir leit að ofnæmisvökum í *Culicoides nubeculosus*.

Eftirtaldir vísar voru hannaðir eftir birtri röð hýalúronídasagens í *Culicoides sonorensis*:

Cul.s3 (17) – Fw (5' - TAA TAT GAA TGG CGG TGC AA -3')

Cul.s3 (501) – Rev (5' - AAA TAT TTC AGG TCA TTA TGA CAA A -3')

Einungis er búið að raðgreina um helming gensins (746 bp):

```
GATTTCCGTATTGTTT TAAATATGAATGGCCGGTGCAA ACACGAAAGAGGATTGTCCGTCAAATGTCAAAGA
GGAAAATGACCGCATTAAATGGCTGTGGGATATAGTTCGATGTGGTTTTACCATCAGTATATTTAAACAAC
AAAATCACAGCATCACAGAGAGTCCAATTTGTGCGAGGTGCAATGCGTGAAGGATATCGTGTATCACAAT
TATCAAAAACAACAGTGAACCACAGTGTACAGTTATTTGCGTTATGTTTACACAGACACTTAAATA
CATTTCAAATGAGGATCTCAAACAGTCAATAAAAAGTATCCAAAAGAGCAAAGGGTAGTGGGAATGATATTT
TGGGGCAGTTCATATGATGTCAAACCAAAGATCAATGTTTTGATTTTAGAAAATATGTTGACAATAATT
TAGGACCAATTCTGTTATCATCGAATGACAATACACCGAAAATTCCTTACCCCAAA TTTGTCATAAATTGAC
CTGAAAATATTTATAATAATAATAATAATGGTATAAACTTAATAACATAATAATCATAAAATAAAAAATTGA
GTCAAAAATGTAATATAAAACCAAATAAAAAATAATTCACCAAATATTTGCCCATCGATTGATTAATAA
AAGAAAAATAAAATCAATAAAGATTTCTCATGAAAATACTAATAAAAAAATTGGACGTATTTTCTTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Þörun vísa við DNA röð er yfirstrikuð með grænu. TAA (rautt) er stopptákni.

Eftirtaldir ferjuvísar eru hannaðir eftir skerðisetaröðum (*EcoR* I og *Xho* I) sitt hvoru megin við innskotið í Zap ferjunni á λ-cDNA safninu:

ZAP II E-Ad.seq – Fw (17) (5' - TC TGG ACC TTG GCT GTC ACT C - 3')

ZAP II X-Ad.seq – Rev (32) (5' - GAT GTC TCG TAA GGT CCT CCG T - 3')

Eftirtaldir ferjuvísar fengust frá Guðbjörgu Ólafsdóttur M.Sc. í líffræði:

M13 (-40) – Fw (5' - GTT TTC CAG TCA CGA -3')

T7 – Fw (5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3')

PRODUCT SIZE: 107, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

4 LEFT PRIMER 62 20 58.65 40.00 7.00 2.00 AATCGCATTAAATGGCTGTG
RIGHT PRIMER 163 20 60.35 50.00 5.00 3.00 CCCACGAACAAATTGGACTC
PRODUCT SIZE: 102, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

Markmiðið er að notast bara við Rev vísa til að ná byrjuninni á geninu með hjálp ferjuvísis sem nær út fyrir genasvæðið. Notast var við Rev vísana sem forritið gaf upp auk þess að notast við Fw vísana með því að snúa þeim við og gera þá þar með Rev.

Tók Fw vísir nr. 63 og útbjó Rev í B. Workbench (**Rev vísir nr. 83**)

LEFT PRIMER 63 20 60.86 45.00 7.00 0.00 ATCGCATTAAATGGCTGTGG (Fw)

HGS1nub radgr19.1 63 F - reverse complement

>HGS1nub_radgr19.1_LEFT_PRIMER_opt, Reverse-Complement
CCACAGCCATTTAATGCGAT

Set Rev röðina inni forritið á

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

Forritið finnur líka út Rev röðina, þarf því í raun ekki að gera það í B.workbench.

SEQUENCE:

5'-CCA CAG CCA TTT AAT GCG AT -3'

COMPLEMENT:

5'-ATC GCA TTA AAT GGC TGT GG -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 45.0 %

MELT TEMP: 53.7 °C

Cn.HGS.83R

Prófaði að setja inn Fw röðina og fæ þá Rev og sama TM.

SEQUENCE:

5'-ATC GCA TTA AAT GGC TGT GG -3'

COMPLEMENT:

5'-CCA CAG CCA TTT AAT GCG AT -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 45.0 %

MELT TEMP: 53.7 °C

Rev vísir nr. 163

RIGHT PRIMER 163 20 60.35 50.00 5.00 3.00 CCCACGAACAAATTGGACTC

SEQUENCE:

5'- CCC ACG AAC AAA TTG GAC TC -3'

COMPLEMENT:

5'- GAG TCC AAT TTG TTC GTG GG -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 50.0 %

MELT TEMP: 54.0 °C

Cn.HGS.163R

Rev vísir nr. 93

LEFT PRIMER 73 20 60.74 50.00 4.00 2.00 ATGGCTGTGGGATATTGTCG (Fw)

HGS1nub radgr19.1 - 73 F - reverse complement

>HGS1nub_radgr19.1_LEFT_PRIMER_1, Reverse-Complement

CGACAATATCCCACAGCCAT

SEQUENCE:

5'- CGA CAA TAT CCC ACA GCC AT -3'

COMPLEMENT:

5'- ATG GCT GTG GGA TAT TGT CG -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 50.0 %

MELT TEMP: 54.9 °C

Cn.HGS.93R

Rev vísir nr. 182

RIGHT PRIMER 182 20 60.58 50.00 6.00 2.00 GATATCCTTCACGCATTCGC

SEQUENCE:

5'- GAT ATC CTT CAC GCA TTC GC -3'

COMPLEMENT:

5'- GCG AAT GCG TGA AGG ATA TC -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 50.0 %

MELT TEMP: 53.9 °C

Cn.HGS.182R

Rev vísir nr. 96

LEFT PRIMER 76 20 58.95 50.00 4.00 1.00 GCTGTGGGATATTGTCGATG (Fw)

HGS1nub radgr19.1 - 76 F - reverse complement

>HGS1nub_radgr19.1_LEFT_PRIMER_3, Reverse-Complement
CATCGACAATATCCCACAGC

SEQUENCE:

5'-CAT CGA CAA TAT CCC ACA GC -3'

COMPLEMENT:

5'-GCT GTG GGA TAT TGT CGA TG -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 50.0 %

MELT TEMP: 53.4 °C

Cn.HGS.96R

Rev vísir nr. 82

LEFT PRIMER 62 20 58.65 40.00 7.00 2.00 AATCGCATTTAAATGGCTGTG (Fw)

HGS1nub radgr19.1 - 62 F - reverse complement

>HGS1nub_radgr19.1_LEFT_PRIMER_4, Reverse-Complement
CACAGCCATTTAAATGCGATT

SEQUENCE:

5'-CAC AGC CAT TTA ATG CGA TT -3'

COMPLEMENT:

5'-AAT CGC ATT AAA TGG CTG TG -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 40.0 %

MELT TEMP: 51.6 °C

Cn.HGS.82R

Vísar hannaðir út frá raðgreindri röð *C. nubeculosus* (sjá raðgreiningu-7)

C. nubeculosus hefur vel varðveitt aminosýrusvæði í HGS geni sínu líkt og aðrar bitflugur svo sem *Aedes aegypti* (sjá viðauka VI). Fw og Rev vísar út frá yfirstrikaða aminosýrusvæðinu voru útbúnir til að ná meira af geninu upp.

GGVPQEGNLQEHIDYFAESVNTLIPDQNFSGIGVIDFESWRPIYRQNSGVLQPYKDLSYKLVQSKHRLWS
KKLIEEEAAREFETAGRSFVEETV

SEQUENCE:

5'-GGT GGT GTA CCA CAA GAA GGA -3' – C.nub GGVPQEG Fw

COMPLEMENT:

5'-TCC TTC TTG TGG TAC ACC ACC -3' – C.nub GGVPQEG Rev

LENGTH: 21

GC CONTENT: 52.4 %

MELT TEMP: 56.7 °C

Viðauki VI

Vísar hannaðir eftir vel varðveittum amínósýrusvæðum í skyldum bitflugum.

Cul.s3 Fw er umbreytt í Rev

Gert til að ná fremri hluta gensins upp á mótí ferjuvísi og mögulegum sértækum Fw vísi sem fæst með því að blasta saman nokkrum as-röðum/genaröðum moskítóflugna á <http://workbench.sdsc.edu/>

Cul.s3 F (17): TAATATGAATGGCGGTGCAA

Cul.s3 R2

SEQUENCE:

5'- TAA TAT GAA TGG CGG TGC AA -3'

COMPLEMENT:

5'- TTG CAC CGC CAT TCA TAT TA -3'

LENGTH: 20

GC CONTENT: 40.0 %

MELT TEMP: 52.3 °C

FPYCFNMN

Amínósýrusvæði á *C. sonorensis* sem er mjög vel varðveitt í bitflugum.

Núkleótíðröðin fundin og Rev vísir búinn til, til að nota á mótí ferjuvísi og mögulegum sértækum Fw vísi sem fæst með því að blasta saman nokkrum as-röðum/genaröðum moskítóflugna og hanna vísi út frá mjög vel varðveittum svæðum.

Fw núkleótíðröð C. son: GATTTCCGTATTGTTTTAATATGAATGGC

C.son FPYCFNMN (R)

SEQUENCE:

5'- GAT TTC CGT ATT GTT TTA ATA TGA ATG GC -3'

COMPLEMENT:

5'- GCC ATT CAT ATT AAA ACA ATA CGG AAA TC -3'

LENGTH: 29

GC CONTENT: 31.0 %

MELT TEMP: 53.7 °C

Sértækir Fw vísar útbúnir frá *A. aegypti*

Notast er við vel varðveitt svæði á öllum þremur moskítótegundunum: *A. aegypti*, *A. gambiae* og *Culex pipiens*.

GGVPQEG:

A.aegypti GGVPQEG (Fw): GGTGGCGTACCGCAGGAGGGA

SEQUENCE:

5'- GGT GGC GTA CCG CAG GAG GGA -3'

COMPLEMENT:

5'- TCC CTC CTG CGG TAC GCC ACC -3'

LENGTH: 21

GC CONTENT: 71.4 %

MELT TEMP: 66.2 °C

WGYYAFP: (Svæðið er fyrir framan FPYCFNMN)

A.aegypti WGYYAFP (Fw): TGGGGCTATTATGCCTTTCCC

SEQUENCE:

5'- TGG GGC TAT TAT GCC TTT CCC -3'

COMPLEMENT:

5'- GGG AAA GGC ATA ATA GCC CCA -3'

LENGTH: 21

GC CONTENT: 52.4 %

MELT TEMP: 57.2 °C

Sértækir Fw vísar útbúnir frá *A. aegypti* – Umbreyttir fyrir *Culicoides*

Notast er við vel varðveittar as. raðir í moskítóflugunni til að útbúa Fw vísa sem reynt er að aðlaga fyrir *C. sonorensis* með því að notast við upplýsingar um as. tákna fyrir þessa tegund á heimasíðunni <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Culicoides+sonorensis+%5Bgbinv%5D&aa=1&style=GC>
[G](#)

Notast er við þessa vísa á móti sértækum Rev vísnum sem eru til.

G G V P Q E G
Gly gly val pro gln glu gly
GGA-GGA-GTT-CCA-CAA-GAA-GGA

C.son. GGVPQEG (Fw)

SEQUENCE:

5'- GGA GGA GTT CCA CAA GAA GGA -3'

COMPLEMENT:

5'- TCC TTC TTG TGG AAC TCC TCC -3'

LENGTH: 21

GC CONTENT: 52.4 %

MELT TEMP: 56.3 °C

W G Y Y A F P
Trp gly tyr tyr ala phe pro
TGG-GGA-TAT-TAT-GCA-TTT-CCA

C.son WGYA FP (Fw)

SEQUENCE:

5'- TGG GGA TAT TAT GCA TTT CCA -3'

COMPLEMENT:

5'- TGG AAA TGC ATA ATA TCC CCA -3'

LENGTH: 21

GC CONTENT: 38.1 %

MELT TEMP: 51.6 °C

Sértækir Fw og Rev vísar útbúnir frá *A. aegypti* – Umbreyttir fyrir *Culicoides*

Notast er við vel varðveittu as. raðirnar í moskítóflugunum til að útbúa Fw og Rev vísa sem reynt er að séraðalaga fyrir *C. sonorensis* með því að notast við upplýsingar um as. tákna fyrir þessa tegund á heimasíðunni <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Culicoides+sonorensis+%5Bgbinv%5D&aa=1&style=GC>

Með því að blasta saman þeim hluta HGS gensins í *C. nubeculosus* sem búið er að raðgreina þá er amínósýruröðin líkust *A. aegypti* (53% fullkomið samræmi).

Aedes_aegypti
Anopheles gambiae

-----MCN^QYQM^NFS^SIGP^FYEVYQ^NGN^DS^FFR^NAS^SILYDP^K
SFEVYWNIP^TFM^CN^QFG^FE^FSS^VNR^TYS^VVQ^NNR^NDT^FFR^GNAV^SILYDP^GK
*****:>::****:..**.* ** **:*****:*****

Aedes_aegypti
Anopheles gambiae

FPALLEKSSTRVLYKRN^{GGVPQEG}NL^{TEHLD}IF^{FRKHMDEL}VTD^{ADFSGV}G
FPALLEK^{PST}KTLYKRN^{GGVPQEG}NL^{TEHLE}IF^{ERHLD}ELI^{PDRNFSG}IG
*****.**:..*****:*****:***:>::****:..* :****:*

M C N Q Y Q M N F S
Met – Cys – Asn – Gln – Tyr – Gln – Met – Asn – Phe – Ser
ATG–TGT–AAT–CAA–TAT–CAA–ATG–AAT–TTT–TCA

C.son MCN- HGS (Fw)

SEQUENCE:

5'- ATG TGT AAT CAA TAT CAA ATG AAT TTT TCA -3'

COMPLEMENT:

5'- TGA AAA ATT CAT TTG ATA TTG ATT ACA CAT -3'

LENGTH: 30

GC CONTENT: 20.0 %

MELT TEMP: 51.5 °C

T Y E V Y Q N G
Thr – Tyr – Glu – Val – Tyr – Gln – Asn – Gly
ACA-TAT-GAA-GTT-TAT-CAA-AAT-GGA

C.son TYE-HGS (Fw)

SEQUENCE:

5'- ACA TAT GAA GTT TAT CAA AAT GGA -3'

COMPLEMENT:

5'- TCC ATT TTG ATA AAC TTC ATA TGT -3'

LENGTH: 24

GC CONTENT: 25.0 %

MELT TEMP: 48.7 °C

F R G N A I S
Phe – Arg – Gly – Asn – Ala – Ile – Ser
TTT-AGA-GGA-AAT-GCA-ATT-TCA

C.son FRG-HGS (Fw)

SEQUENCE:

5'- TTT AGA GGA AAT GCA ATT TCA -3'

COMPLEMENT:

5'- TGA AAT TGC ATT TCC TCT AAA -3'

LENGTH: 21

GC CONTENT: 28.6 %

MELT TEMP: 48.0 °C

S I L Y D P G
Ser – Ile – Leu – Tyr – Asp – Pro – Gly
TCA-ATT-TTG-TAT-GAT-CCA-GGA

C.son SIL-HGS (Fw)

SEQUENCE:

5'- TCA ATT TTG TAT GAT CCA GGA -3'

C.son SIL-HGS (Rev)

COMPLEMENT:

5'- TCC TGG ATC ATA CAA AAT TGA -3'

LENGTH: 21

GC CONTENT: 33.3 %

MELT TEMP: 49.2 °C

Viðauki VII

Blöndun stofn lausna og þynning vísa

TBE Dúi

Tafla 1. 0,5 M EDTA við pH 8,0 (500 mL)

Efni	Magn
EDTA	93,05 g
dH ₂ O	350 mL

Aðferðarlýsing:

1. Efnin eru vigtuð og mæld og blandað saman í keiluflösku. Hræra er sett með lausninni til að EDTA-ið leysist alveg upp í vatninu.
2. Sýrustig lausnarinnar er stillt með ca. 10 g af NaOH töflum í pH 8,0. Lausn er hvít í fyrstu en verður tær við pH 8,0.

Tafla 2. 5 x TBE (5 lítrar)

Efni	Magn
TRIS	270 g
Boric Acid	137,5 g
0,5 M EDTA pH 8,0	100 mL
dH ₂ O	4492,5 mL

Aðferðarlýsing:

1. Efnin eru vigtuð og mæld og blandað saman í keiluflösku. Einungis hluti af vatninu er settur í. Hræra er sett með lausninni til að föstu efnin leysist alveg upp í EDTA lausninni og vatninu.
2. Áður en fyllt er upp með vatni í 5 L er sýrustig lausnarinnar stillt í pH 8,0.

Tafla 3. 0,5 x TBE dúi (10 L)

Efni	Magn (L)
5x TBE dúi	1
dH ₂ O	9

10 x RSB dúi

Tafla 4. 10 x RSB dúi (5 mL)

Efni	Magn (mL)
Glycerol	2,5
0,5 M EDTA	0,15
1 x Brómóphenól blue	1,25
dH ₂ O	1,10

1 Kb BRL Ladder

Tafla 5. 1 Kb BRL Ladder (250 µL)

Efni	Magn (µL)
Brómóphenól blue (BRL) – óþynntur	25
TE-dúi pH 8,0	135
10 x RSB dúi	90

BRL: Frá Invitrogen Life Technologies

Tafla 6. TE-dúi við pH 8,0 (100 mL)

Efni	Magn (mL)
100 mM Tris-HCL	10
100 mM EDTA	1
dH ₂ O	89

Þynning vísa

Þynning vísa fyrir keðjuverkandi fjölliðun (PCR)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \text{ pmól/}\mu\text{L} \times V_1 = 20 \text{ pmól/}\mu\text{L} \times 20 \mu\text{L}$$

$$V_1 = \frac{20 \text{ pmól/}\mu\text{L} \times 20 \mu\text{L}}{100 \text{ pmól/}\mu\text{L}}$$

$$V_1 = 4 \mu\text{L af óþynntum vísi} + 16 \mu\text{L af dH}_2\text{O}$$

Þynning vísa fyrir raðgreiningar PCR

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \mu\text{mól/L} \times V_1 = 2 \mu\text{mól/L} \times 20 \mu\text{L}$$

$$V_1 = \frac{2 \mu\text{mól/L} \times 20 \mu\text{L}}{100 \mu\text{mól/L} \times V_1}$$

$$V_1 = 0,4 \mu\text{mól/L af óþynntum vísi} + 19,6 \mu\text{L af dH}_2\text{O}$$

$$\text{Ath. } 1 \mu\text{mól/L} = 1 \text{ pmól}/\mu\text{L}$$

Hægt er að notast við þynnta vísa sem notaðir eru í hefðbundnu PCR fyrir raðgreiningar PCR með því að þynna þá 1:10.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$20 \text{ pmól}/\mu\text{L} = 20 \mu\text{mól/L}$$

$$20 \mu\text{mól/L} \times V_1 = 2 \mu\text{mól/L} \times 20 \mu\text{L}$$

$$V_1 = \frac{2 \mu\text{mól/L} \times 20 \mu\text{L}}{20 \mu\text{mól/L}}$$

$$V_1 = 2 \mu\text{L af } 20 \text{ pmól}/\mu\text{L vísi} + 18 \mu\text{L af dH}_2\text{O}$$

Viðauki VIII

Raðgreind basaröð og amínósýruröð úr *C. nubeculosus* og birtum HGS röðum úr öðrum bitflugum blastað saman.

Basaröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *C. sonorensis*, sjá raðgreiningu-1:

* - single, fully conserved residue
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
HGS1nub_radgr19.1      -----TTAATATGAATGGCGGTGCAAATATGAAAGAGGAT
gi_51557674_<1-485_Culicoide  GATTTCGGTATTGTTTAAATATGAATGGCGGTGCAAACACGAAAGAGGAT
                        ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      TGTCATCTAATGT-AAAGAGGAAAATAATCGCATTAAATGGCTGTGGGA
gi_51557674_<1-485_Culicoide  TGTCGGTCAAATGTCAAAGAGGAAAATGACCGCATTAAATGGCTGTGGGA
                        ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      TATTGTCGATGTGGTTTTGCC TTCAGTTATTTGAACAACAAAATACAG
gi_51557674_<1-485_Culicoide  TATAGTCGATGTGGTTTTACCATCAGTATATTTAAACAACAAAATCACAG
                        *** ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      CATCACAAAGAGTCCAATTTGTTTCGTGGGCGAATGCGTGAAGGATATCGT
gi_51557674_<1-485_Culicoide  CATCACAGAGAGTCCAATTTGTGCGAGGTCGAATGCGTGAAGGATATCGT
                        ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      GTGTCACAATTATCAAAACAACCAGTGAAACCACCAGTATACAGTTATTT
gi_51557674_<1-485_Culicoide  GTATCACAAATTATCAAAACAACCAGTGAAACCACCAGTGTACAGTTATTT
                        ** *****

HGS1nub_radgr19.1      GCGTTATGTTTACACGGACAACCTAAAATACATTTCAAATGAGGATCTCA
gi_51557674_<1-485_Culicoide  GCGTTATGTTTACACAGACACACTAAAATACATTTCAAATGAGGATCTCA
                        ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      AACAAATCAATTAAAGTATCCAAAGAGCAAAGGGTAGTGGAATTAATATTT
gi_51557674_<1-485_Culicoide  AACAGTCAATAAAAGTATCCAAAGAGCAAAGGGTAGTGGAATGATATTT
                        **** ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      TGGGGCAGTTCATATGATGTCAAACGAAAGATCAGTGTGTTTGTATTTAG
gi_51557674_<1-485_Culicoide  TGGGGCAGTTCATATGATGTCAAACCAAAGATCAATGTTTGTATTTAG
                        ***** *****

HGS1nub_radgr19.1      AAATATGTTGATAATAATTTAGGACCAATTGTACTATCAGCAAATGACA
gi_51557674_<1-485_Culicoide  AAATATGTTGACAATAATTTAGGACCAATTCTGTTATCATCGAATGACA
                        *** ***** * *****

HGS1nub_radgr19.1      ATACACCAAATAATCTTACCCCAAATTTGTCATAATTGACCTGAAATATT
gi_51557674_<1-485_Culicoide  ATACACCAAATAATCTTACCCCAAATTTGTCATAA-----
                        ***** *****
```

Aminósýruröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *C. sonorensis*, sjá raðgreiningu-1:

* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
frame2_radgr19HGS      -----CKEENNRKWLWDIVDVVLPVYLNNKITASQRVQFVRGR
Cson_HGS_160_as      FPYCFNMNGGANTKEDCPSNVKEENDRIKWLWDIVDVVLPVYLNNKITASQRVQFVRGR
                        ***:*****

frame2_radgr19HGS      MREGYRVSQLSKQPVPVYSLRYVYTDNLKYISNEDLKQSIKVSKEQKGSGLIFWGS
Cson_HGS_160_as      MREGYRVSQLSKQPVPVYSLRYVYTDNLKYISNEDLKQSIKVSKEQKGSGLIFWGS
                        *****:*****

frame2_radgr19HGS      YDVKTKDQCFDRNYVDNNLGPVLSANDNTPKILTPNLS
Cson_HGS_160_as      YDVKTKDQCFDRKYVDNNLGPVLSANDNTPKILTPNLS
                        *****:*****:***:*****
```

Basaröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *A. aegypti*, sjá raðgreiningu-7:

* - single, fully conserved residue
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
Radgreining-7      -----
BWb18875      ATGTGCAACCAGTATCAGATGAACTTCTCCAGCATAGGGCCACCTACGAAGTGTACCAG

Radgreining-7      -----
BWb18875      AACGGGAACGATAGCTTCCGGGGGAATGCCATATCGATCCTGTACGATCCGGGCAAGTTC

Radgreining-7      -----CGTAAATATTTTGAACCT
BWb18875      CCTGCGCTGCTGGAGAAATCTCCACCCGGGTGCTGTACAAACGAAATGGTGGCGTACCG
                        ** * * *

Radgreining-7      TACC--GTTTCTTCTACAAATGAACGACAGCTGTTTCAAATTCACGAGCTGCCTCTTC
BWb18875      CAGGAGGAAATCTCACGAAACATTTGGACATTTTCGAAAGCACATGGATGAACTGGTT
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-7      TTCAATT--AACTTCTT--GCTCCATAATCTATGCTTTCT--TTGCACCAATTTATAT--
BWb18875      ACAGATGCAGATTTCTCCGGTGTGCGAGTCATCGATTTTCGAGTCGTGGCGACCAATATTT
                        ** * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-7      -GATAAATCCTTATATGGCTGTAACAC-ACCTGAA--TTTGACGATAAATCGGTCGCCA
BWb18875      CGGCAGAAATTCGGCTCGTGCAACCCTATAAGGACCTTTTCGATGAAAAATCGAAAAACAG
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-7      TGAC-TCAAATCAATCACTCCAATGCCTGAGAAAT-----TTTGAT--CTGTATCA
BWb18875      AGGCATCCAAATTTGCTCCCAAGTGGCTGGAAGCTGAGGCAACCCGACGGTTTGATCA
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-7      AGGTATTAACACTTT-CAGCAAATAAATCGATGTGTTCTTGTAATTTTC--CTTCTTGTG
BWb18875      ACAGGCCGGGAGTTCATGGCTCAGACGTTGCTGTTGGCCAAACAGTTGCGCCCTCGAGCC
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-7      GTACACCACCATTCGTC-----
```



```

BWB18875      GCCTGGGGCTATTATGCCTTTCCTACTGCTTCAACATGAACGGAGGATCCACGAGCAAT
*           *   ***   *   *

Radgreining-7 -----
BWB18875      GGCCAACGGGAGGACTGCTCGGCCGAGGTGCAGCGGGAAAATGACCGCATCCAGTGGCTG

Radgreining-7 -----
BWB18875      TTTGACGATTCGGATATCATCTTCCCGTCAGTTTATCTGAGGGAGAAGCTCGGCGCCGGA

Radgreining-7 -----
BWB18875      GACCGCATCAAGCTGATTCGGGGCCGCGTGAAGGAAGCTGTTCCGGATGGCACGGAGGGCC

Radgreining-7 -----
BWB18875      AATGTCCAGCCCAAGCCCCGGGTGTTGACGTACATTCGGTACGTCTACACGGACAGCGTC

Radgreining-7 -----
BWB18875      AAGTACCTGACCGAGGTAAGTTTTAGTAGCCAAGCGTAG
    
```

Aminósýruröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *A. aegypti*, sjá raðgreiningu-7:

* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Radgreining-7 -----RNGGVP
Aedes_aegypti MCNQYQMFSSIGPTYEVYQNGNDSFRGNAISILYDPGKFPALLEKSSTRVLYKRNGGVP
                *****

Radgreining-7 QEGNLQEHIDYFAESVNTLIPDQNFSGIGVIDFESWRPIYRQNSGVLQPYKDLSYKLVQR
Aedes_aegypti QEGNLTEHLDIRKHMDELVTDAFSGVGVDFESWRPIFRQNFVSLQPYKDLSMKIEKQ
                ***** **: * * : :: * . * : ***:*****:*** * ***** *: ::

Radgreining-7 KHLWSKKLIEEEAAREFETAGRSFVEETVKFK-----
Aedes_aegypti RHPNLPKWLAEATRFEFSTGREFMAQTLLAKQLRPRAAWGYA FPYCFNMNGGSTSN
                :* . * : * **.***:*:* * : * :

Radgreining-7 -----IFT-----
Aedes_aegypti GQREDCSAEVQRENDRIQWLFDDSDIIFPSVYLREKLGAGDRIKLIRGRVKEAVRMARRA
                **_

Radgreining-7 -----
Aedes_aegypti NVQPKPRVLTYYIRYVYTDSVKYLTEVSFSSQA
    
```

Basaröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *A. aegypti*, sjá raðgreiningu-9:

* - single, fully conserved residue
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Radgreining-9 -----
BWB18875      ATGTGCAACCAGTATCAGATGAACTTCTCCAGCATAGGGCCACCTACGAAGTG TACCAG

Radgreining-9 -----
BWB18875      AACGGGAACGATAGCTTCCGGGGGAATGCCATATCGATCCTGTACGATCCGGGCAAGTTC

Radgreining-9 -----
BWB18875      CCTGCGCTGCTGGAGAAATCTTCCACCCGGGTGCTGTACAAACGAAATGGTGGCGTACCG

Radgreining-9      CAAGAAGGAAATTTACAAGAACAATCGATTATTTTCTGCTGAAAGTGTTAATACCTTGATA
BWB18875      CAGGAGGGAAATCTCACCGAACATTTGGACATTTTTCGAAAGCACATGGATGAAC TGGTT
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      CCAGATCAA AATTTCTCAGGCATTTGGAGTGATTGATTTGAGTCA TGGCGACCGATTTAT
BWB18875      ACAGATGCAGATTTCTCCGGTGTCCGGAGTCATCGATTTTCGAGTCTG GCGACCAATATTT
      ***** * ***** ** * ***** ** ***** ***** ***** ** * *

Radgreining-9      CGTCAA AATTCAGGTGTGTACAGCCATATAAGGATTTATCATATAA AATGGTGCAAAGA
BWB18875      CGGCAGAATTTCCGCTCGTGCACCCCTATAAGGACCTTTCGATGAA AATCGAAAACAG
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      AAGCATAGACTATGGAGCAAGAAGTTAATTGAAGAAAGAGGCAGCTCGTG A AATTTGAAACA
BWB18875      AGGCATCCA AATTTGCCTCCCAAGTGGCTGGAAGCTGAGGCAACCCGACGG TTTGAATCA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      GCTGGTTCGTTCAATTTGTAGAAAGAACGGTTAAAGTTGCAAAATATTTACG TCCAAATGCA
BWB18875      ACAGGCCGGGAGTTTCATGGCTCAGACGTTGCTGTGGCCAAACAGTTGCGGCC TCGAGCG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      AAATGGGGCTATTATGGATTCCCATATTGTTTCAAATATGAATGGTGGT-----GCAAA
BWB18875      GCCTGGGGCTATTATGCCCTTCCCTACTGCTTCAACATGAACGGAGGATCCACAGGCAAT
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      TATGAA--AGAGGATGTGCCATCTAATGTTAAAGAGGAAAATAATCGCATTA AATGGCTG
BWB18875      GGCCAAACGGGAGGACTGCTCGGCCGAGGTGCAGCGGAAAATGACCGCATCCAG TGGCTG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      TGGGATATTGTCGATGTGGTTTTGCTTCAGTTTATTTGAACAACAAAATAACAGCATCA
BWB18875      TTTGACGATTCGGATATCATCTTCCGTCAGTTTATCTGAGGGAGAAAGCTCGGC CCGGA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      CAAAGAGTCCAATTTGTTCTGGGCGAATGCGTGAAGGATATCGTGTGT CACAATTATCA
BWB18875      GACCGCATCAAGCTGATTCGGGGCCGCTGAAGGAAGCTGTTCGGATGGCACGGAGGGCC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      AAACAACCGTGA AACCACAGTATACAGTTATTTGCGTTATGTTTACACGGACAACCTA
BWB18875      AATGTCCAGCCCAGCCCGGGTGTGACGTACATTCGGTACGCTTACACGGACAGCGTC
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      AAATACATTTCAAATGAGGATCTCAAACAATCAATTAAAGTATCCAAAGAGCAA AAGGGT
BWB18875      AAGTACCTGACCGAGGTAAGTTTGTAG-TAGCCAAGCGTAG-----
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Radgreining-9      AGTGGATTAATATTTTGGGCGAGTTCATATGATGTCAAACGAAAGATCAGTGT TTTGAT
BWB18875      -----
    
```

Radgreining-9 TTTAGAAATTATGTTGATAATAATTTAGGACCAATGACTATCA
 BWB18875 -----

Amínósýruröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *A. aegypti*, sjá raðgreiningu-9:

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Radgreining-9           -----
Aedes_aegypti           MCNQYQMFSSIGPTYEVYQNGNDSFRGNAISILYDPGKFPALLEKSSTRVLYKRNNGVVP

Radgreining-9           QEGNLQEHIDYFAESVNTLIPDQNFSGIGVIDFESWRPIYRQNSGVLQPYKDLSYKLVQR
Aedes_aegypti           QEGNLTEHLDIRKHMDELVTDAADFSGVGVDFESWRPIFRQNFVSLQPYKDLSMKIEKQ
                          ***** **.* * : :: *.* :***:*****:*** * ***** *: ::

Radgreining-9           KHRLWSKKLIEEAAAREFETAGRSFVEETVKVAKYLRPNAKWGYGFPYCFNMGGAN--
Aedes_aegypti           RHPNLPKWLEAEATRRFESTGREFMAQTL LLLAKQLRPRAAWGYA FPYCFNMGGSTSN
                          :*   . * :* **.***:*:*.* :*: :** ***.* ****_*****:..

Radgreining-9           -MKEDCPNSVKEENNRKWLWDIVDVVLPVYLNNKITASQRVQFVGRMRREGYRVSQLS
Aedes_aegypti           GQREDCSAEVQRENDRIQWLFDDSDIIFPSVYLREKLGAGDRIKLI RGRVKEAVRMARRA
                          :***.:*:*.**.*:*:* * :*:*****.:*: *.*::::***:*. *::: :

Radgreining-9           KQPVKPPVSYLRYVYTDNLKYISNEDLKQSIKVSKEQKGSGLIFWGSSYDVKTKDQCFD
Aedes_aegypti           NVQPKPRVLT YIRYVYTDVSKYLT-----EVSFSSQA-----
                          :   ** * :*:*****.:*:*:               :* ..:

Radgreining-9           FRNYVDNNLGPMTI
Aedes_aegypti           -----
  
```

Basaröðum blastað saman, efri röðin er úr *C. nubeculosus* og neðri röðin er úr *A. aegypti*, sjá Niðurstöður - Samantekt:

* - single, fully conserved residue
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

C.nub._Consensus_[824_bp]      CAATTATGACAAATTTGGGGTAAGAATTTTGGTGTATTGTCATTGCTG
BWB18875                       -ATGTGCAACCGTATCAGATGAAGTCTCCAGCATAGGGCCACC----
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      ATAGTACAATTGGTCTAAATTATTATCAACATAAATTCTAAAATCAAAA
BWB18875                       ----TACGAAGTGTACCAAGACGGGAACGATAGCTCCGGGGGAATGCCA
                               *** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      CACTGATCTTCGTTTTGACATCATATGAAGTGCCTCCAAAATATTAATCC
BWB18875                       TATCGATCCTGTACGATCCGGGCAAGTCCCTGCGCTGCTGGAGAAATCT
                               *  **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      ACTACCCTTTTGCTCTTTGGATACTTTAATTGATGTTTTGAGATCCTCAT
BWB18875                       TCCACCCGGGTGCTGTACAAACGAAATGGTGGCGTACCAGGAGGAAA
                               *  ****  **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      TTGAAATGTATTTAGG---TTGTCCGTGTAACATAACGCAAAATAACTG
BWB18875                       TCTCACGAAACATTTGGACATTTTCGAAAGCACATGGATGACTGGTTA
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      TATACTGGTGGTTTACTGGTTGTTTTGATAATTG-TGACACACGATATC
BWB18875                       CAGA-TGCAGATTTCTCCGGT-GTCGGAGTCATCGATTTTCGAGTCGTGGC
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      CTTACGCAATTCGCCACGAACAAATGGACTCTTTGTGATGCTGTTATT
BWB18875                       GACCAATATTTCCG-----GCAGAAATTCGGCTCGCTGCACCCATAAGG
                               **  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      TTGTTGTTCAAATAAACTGAAGGCAAAACCATCGCAATATCCCACAG
BWB18875                       ACCTTTCGATGAAAATCGAAAACAGAGGCATCCAAATTTGCTCCCAAG
                               **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      CCATTTAATGCGATTATTTCTCTTTAACATTAGATGGACAATCCTCT-
BWB18875                       TGGCTGGAAGC--TGAGGCAACCCGACGGT-TGAATCAACAGCCCGCGGA
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      -TTCATATTTGCACCACCATTCATATTAACAATATGGGAATCCATAA-
BWB18875                       GTTCATGGCTCAGACGTTGCTGTGGCCAAACAGTTGCGGCCCTCGAGCGG
                               ***** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      --TAGCCCATTTGCAATTTGGACGTAAATATTTGCAACTTTAACGGTT
BWB18875                       CCTGGGGCTATTATGCCTTT---CCCTACTGCTT--CAACATGAACGGAG
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      --TCTTCTACAAATGAACGACCAG----CTGTTT--CAAATTCACGAGCT
BWB18875                       GATCCACGAGCAATGGCCACGGGAGGACTGCTCGGCCGAGGTGCAGCGG
                               **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

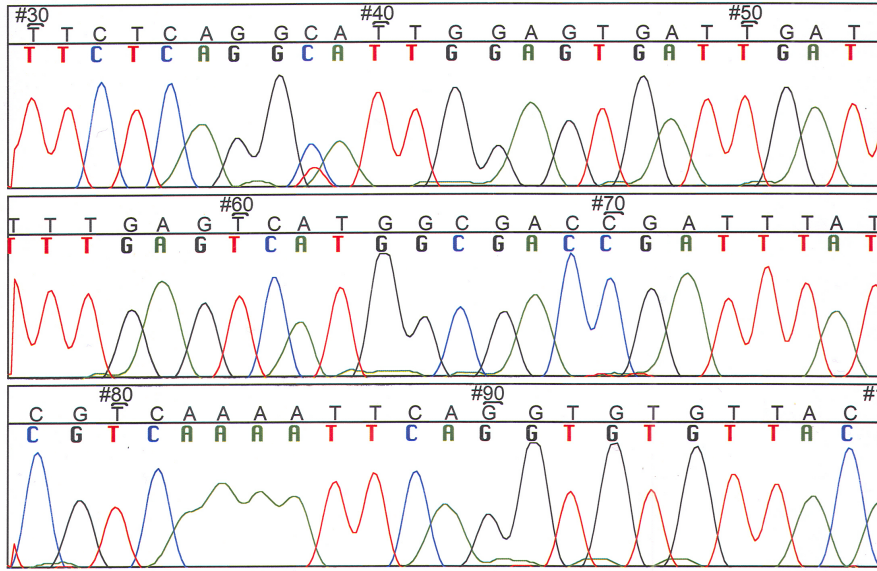
C.nub._Consensus_[824_bp]      GCCTCTTCTTCAATTAACTTCTTGCTCCATAGTCT--ATGCTTCTTTGTC
BWB18875                       GAAAATGACCCGATCCAGTGGCTGTTGACGATTCGGATATCATCTTCCC
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      ACCAATTTATATGATAAATCCTTATATGGCTGTAACACACCTGAATTTG
BWB18875                       GTCAGTTTATCTGAGGGAGAAGCTCGGCGCGGAGACCCATCAAGCT-G
                               ** ***** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

C.nub._Consensus_[824_bp]      ACGATAAATCGGTCGCCATGACTCAAAATCAATCACTCCAATGCTGAGA
BWB18875                       ATTCGGGGCCGCGTGA-AGGAAGCTGTTTCGGATGGCACGGAGGCC---A
                               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
    
```

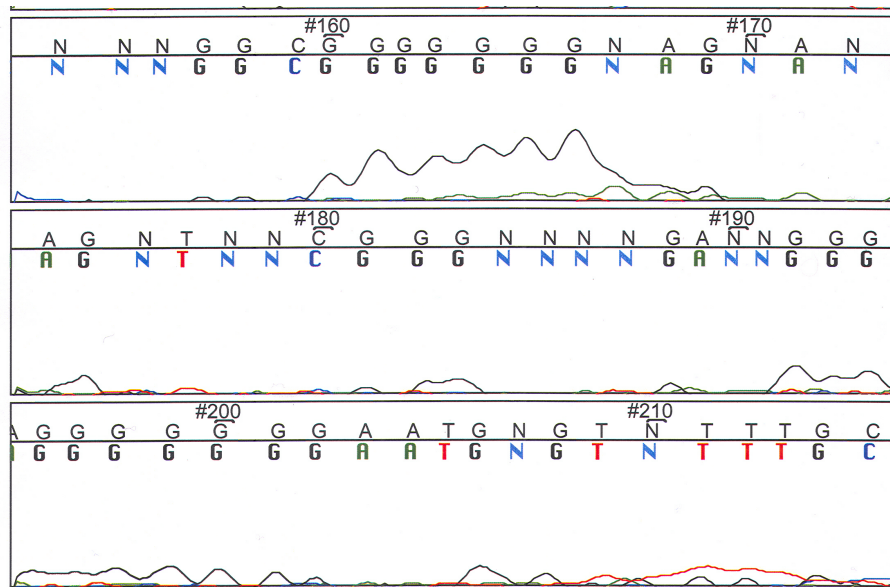

Viðauki IX

Myndir sem sýna hvernig góðar og slæmar raðgreiningar líta út.



Mynd 1.

Myndin sýnir góða raðgreiningu. Toppar eru greinilegir og vel aðskildir þannig að tækið getur lesið og skráð hvern topp/basa. Myndin er úr Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu.



Mynd 2.

Myndin sýnir slæma raðgreiningu. Flatir og óljósir toppar myndast sem tækið getur ekki greint á milli. N táknar hvaða basa sem er. Myndin er úr Sequencer™ 4,6 tölvuforritinu.

Þakkir

Ég vil þakka eftirtöldum:

Sigurbjörgu Þorsteinsdóttur leiðbeinanda fyrir skemmtilegt og spennandi verkefni, hvatningu, góða leiðsögn og yfirlestur.

Vilhjálmí Svanssyni leiðbeinanda fyrir yfirlestur.

Þórunni Sóleyju Björnsdóttur fyrir góða leiðsögn, hvatningu, samvinnu og yfirlestur auk mikillar þolinmæði.

Ágústi H. Bjarnasyni grasafræðingi fyrir yfirlestur.

Nemum og starfsfólki á Keldum fyrir góðan starfsanda, leiðsögn og hvatningu.

Mörthu Ásdísi Hjálmarsdóttur verkefnastjóra í lífeindafræði við Háskólann í Reykjavík fyrir hvatningu í námi.

Að lokum þakka ég fjölskyldu minni og vinum fyrir hvatningu og stuðning í námi.

Háskólinn í Reykjavík

27. apríl 2007

6. Heimildaskrá

- Anderson, G. S., Belton, P. & Kleider, N. (1988). The hypersensitivity of horses to *Culicoides* bites in British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*, 29, 718-723.
- Björnsdóttir, S., Sigvaldadóttir, J., Broström, H., Langvad, B. & Sigurðsson, Á. (2006). Summer eczema in exported Icelandic horses: Influence of environmental and genetic factors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48(1), rec.No:3.
- Blackwell, A. (2001). Recent advances on the ecology and behaviour of *Culicoides* spp. in Scotland and the prospects for control. *Veterinary Bulletin*, 71(11)
- Broström, H., Larsson, Å. & Troedsson, M. (1987). Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: An epidemiological study. *Equine Veterinary Journal*, 19(3), 229-236.
- Campbell, C. L., Vandyke, K. A., Letchworth, G. J., Drolet, B. S., Hanekamp, T. & Wilson, W. C. (2005). Midgut and salivary gland transcriptomes of the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (diptera: Ceratopogonidae). *Insect Molecular Biology*, 14(2), 121-136.
- Fadok, V. A. & Greiner, E. C. (1990). Equine insect hypersensitivity: Skin test and biopsy results correlated with clinical data. *Equine Veterinary Journal*, 22, 236-240.
- Featherstone, A. W. (2006). *Species profile: Highland biting midge - Culicoides impunctatus*. Sótt 20. febrúar 2007, af <http://www.treesforlife.org.uk/tfl.midge.html>
- Fitzgerald, K. T. & Flood, A. A. (2006). Hymenoptera stings. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21, 194-204.
- Halldórsdóttir, S. & Larsen, H. J. (1989). Intradermal challenge of Icelandic horses with extracts of four species of the genus *Culicoides*. *Research in Veterinary Science*, 47, 283-287.
- Halldórsdóttir, S. & Larsen, H. J. (1991). An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway. *Equine Veterinary Journal*, 23(4), 296-299.
- Halldórsdóttir, S., Lazary, S., Gunnarsson, E. & Larsen, H. J. (1991). Distribution of leucocyte antigens in Icelandic horses affected with summer eczema compared to non-affected horses. *Equine Veterinary Journal*, 23(4), 300-302.

- Hellberg, W., Wilson, A. D., Mellor, P., Doherr, M. G., Torsteinsdóttir, S., Zurbriggen, A., et al. (2006). Equine insect bite hypersensitivity: Immunoblot analysis of IgE and IgG subclass responses to *Culicoides nubeculosus* salivary gland extract. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113, 99-112.
- Hoffman, D. R. (2006). Hymenoptera venom allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 30, 109-128.
- Janeway, C. A. jr., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2005a). 1. basic concepts in immunology. In E. Lawrence, G. Bushell, M. Morales & B. Goatly (Eds.), *Immuno biology - the immune system in health and disease* (6. útg., bls. 1-35; 683). New York & London: Garland Science Publishing.
- Janeway, C. A. jr., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2005b). 12. allergy and hypersensitivity. In E. Lawrence, G. Bushell, M. Morales & B. Goatly (Eds.), *Immuno biology - the immune system in health and disease* (6. útg., bls. 517-555). New York & London: Garland Science Publishing.
- Janeway, C. A. jr., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2005c). 2. innate immunity. In E. Lawrence, G. Bushell, M. Morales & B. Goatly (Eds.), *Immuno biology - the immune system in health and disease* (6. útg., bls. 37-100). New York & London: Garland Science Publishing.
- King, T. P., & Spangfort, M. D. (2000). Structure and biology of stinging insect venom allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 123, 99-106.
- Ledin, A. (2004). *More or less IgE - therapeutic vaccines, adjuvants and genes and their effect on IgE levels*. Sótt 6. mars, 2007, af http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_uu_diva-4254-1__fulltext.pdf
- Marti, E., Urwyler, A., Neuenschwander, M., Eicher, R., Meier, D., Weck, A. L., et al. (1999). Sulfidoleukotriene generation from peripheral blood leukocytes of horses affected with insect bite dermal hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71(3-4), 307-320.
- Nielsen, S. A., & Nielsen, B. O. (2002). The biting midge *Culicoides impunctatus* goetghebuer, 1920 (diptera: Ceratopogonidae) recorded from the faroes. *Fróðskaparrit* (50. bók., pp. 143-146)
- Peng, Z., Estelle, F. & Simons, R. (2004). Mosquito allergy: Immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 133, 198-209.
- Reiher, L. J. (2004). *Tíðni sumarexems í íslenskum hrossum fæddum í Þýskalandi* B.Sc.90 Lokaverkefni. Landbúnaðarháskólinn á Hvanneyri

- Ribeiro, J. M. C., Charlab, R., Pham, V. M., Garfield, M. & Valenzuela, J. G. (2004). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(6), 543-563.
- Ribeiro, J. M. C., Charlab, R., Rowton, E. D. & Cupp, E. W. (2000). *Simulium vittatum* (diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *Journal of medical entomology*, 37(5), 743-747.
- Romagnani, S. (2006). Regulation of the T cell response. *Clinical & Experimental Allergy*, 36, 1357-1366.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989a). 14. in vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In N. Ford, C. Nolan & M. Ferguson (Eds.), *Molecular cloning - A laboratory manual (2)* (2. útg., bls. 14.2-14.19). New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989b). 6. gel electrophoresis of DNA. In N. Ford, C. Nolan & M. Ferguson (Eds.), *Molecular cloning - A laboratory manual (1)* (2. útg.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Soldatova, L. N., Crameri, R., Gmachl, M., Kemeny, D. M., Schmidt, M., Weber, M., et al. (1998). Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(5), 691-698.
- Stern, R. & Jedrzejewski, M. J. (2006). Hyaluronidases: Their genomics, structures and mechanisms of action. *Chemical Reviews*, 106(3), 818-839.
- Strachan, T. & Read, A. P. (2004a). 5. amplifying DNA: PCR and cell-based DNA cloning. *Human molecular genetics* (3. útg., bls. 122-126). London & New York: Garland Science.
- Strachan, T. & Read, A. P. (2004b). 7. analyzing DNA and gene structure, variation and expression. *Human molecular genetics* (3. útg., bls. 182-185). London & New York: Garland Science.
- Wilson, A. D., Harwood, L. J., Björnsdóttir, S., Marti, E. & Day, M. J. (2001). Detection of IgG and IgE serum antibodies to *Culicoides* salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*, 33(7), 707-713.