

Samanburður á ónæmissvari hesta bólusettra með próteini eða DNA



Flokkunartala

Meinataekni

Lokaverkefni

Önn

Haust 2001

Áfangi

M LOK 1010

Ágrip

Borið var saman ónæmissvar hesta sem bólusettir voru með próteini (Human serum albumin prótein, HSA) annars vegar og geni próteinsins hins vegar (HSA gen). Í próteinbólusettingum hestum var framkallað ofnæmi af gerð I. Borið var saman sérvirkt HSA mótefnasvar mælt í elisuprófi, IgG mótefnaflokkasvar mælt í elisuprófi og boðefnasvar þar sem reynt var að mæla boðefna mRNA með rauntíma PCR í Lightcycler eftir örvun eitelfruma *in vitro*.

Hestar sem voru bólusettir með HSA-próteini höfðu sterk HSA sérvirk mótefni sem auðvelt er að viðhalda með endurbólusetningu. Í HSA sérvirku mótefnasvari hjá prótein bólusettingum hestum er IgG(T) yfirgnæfandi en einnig var öflugt IgG_a og IgG_b mótefnasvar. Mótefnasvörun hjá DNA-bólusettingum hestum var svo lág að ekki er hægt að segja til af hvaða IgG flokkum þeir eru að svara með.

Boðefnamælingar voru settar upp í því skyni að mæla frumubundið ónæmissvar. Staðalkúrfur voru gerðar fyrir β -actin og IFN- γ ekki tókst að gera staðalkúrfu fyrir IL-4 og því var ekki hægt að gera boðefnasamanburðinn eins og áætlað var að gera.

Höfundur

Freyja S. Eiríksdóttir

Leiðbeinendur

Sigurbjörg Þorsteinsdóttir

ónæmisfræðingur.

Ólafur Andrésson

lífefnafræðingur.

Verkveitandi

Tilraunastöð Háskóla Íslands í
meinafræði að Keldum.

Tengiliður

Dagsetning

01.12.2001

Dreifing

opin lokuð til

Lykilorð ísl

DNA-bóluefni
Hestar
Sumarexem
Mannaserumalbúmin

Lykilorð ensk

DNA vaccination
Horse
Summer eczema
Human serum albumin. (HSA)

Efnisyfirlit

1	Inngangur	3
1.1	Sumarexem í hestum.....	3
1.2	Ónæmiskerfið / Ónæmissvörun -ofnæmissvörun	3
1.3	Ónæmisminni.....	4
1.4	Th1 og Th2 ónæmissvör	4
1.5	Ónæmisvaki - ofnæmisvaki	5
1.6	Ónæmissvörun í hestum.....	6
1.7	Bólusetning og bóluefni.....	6
1.8	Almennt um bólusetningar með DNA	6
1.9	Hægt er að beina ónæmissvari á Th1 braut með DNA bólusetningu	8
1.10	Samanburður á ónæmissvörun hesta bólusettum með próteini eða DNA ...	10
	1.10.1 Elísupróf.....	10
	1.10.2 LightCycler	11
2	Markmið verkefnis.....	15
3	Efni og aðferðir	16
3.1	Hestar	16
3.2	Bólusetningar og blóðtökur.....	16
3.3	Örvun eitilfruma og einangrun mRNA fyrir mælingu í LightCycler.	16
	3.3.1 Örvun eitilfruma.....	16
	3.3.2 Hirðing á frumum	17
	3.3.3 Einangrun á RNA.....	18
	3.3.4 Myndun á cDNA.....	19
	3.3.5 Mæling DNA í Ljósmaeli.	20
	3.3.6 Mæling DNA í Lightcycler.....	21
	3.3.7 Meðhöndlun sýna.....	22
	3.3.8 Keyrsla í LightCycler.....	22
	3.3.9 Mikil hætta á erfðaeftismengun.....	23
	3.3.10 Rafdráttur.....	23
	3.3.11 Rafdráttur sýna úr LightCycler.....	24
4	Niðurstöður.....	25
4.1	Elísupróf HSA-DNA bólusettir hestar.	25
4.2	Elísupróf HSA prótein bólusettir hestar.....	25
4.3	IgG mótefnaflokkar hjá HSA-DNA og prótein-bólusettum hestum.....	27
4.4	Boðefnamæling í LightCycler.....	29
	Viðauki I, þynningar fyrir vísa og þreifara	35
	Viðauki II, efni til mælingar í Ljósmaeli og þynningar á DNA	36
	Viðauki III, blóðtökur og bólusetningar	37
	Viðauki III, blóðtökur og bólusetningar (frh).....	38
	Viðauki IV, vísar og þreifara.....	39
	Viðauki V, efni fyrir elísupróf	40
	Þakkir.....	40
5	Heimildarskrá	42

1 Inngangur

1.1 Sumarexem í hestum

Sumarexem er ofnæmi í hrossum gegn próteini úr biti mýflugna af ættkvíslinni *Culicoides*. Ofnæmið er vandamál í íslenskum hestum á erlendri grund, en þessi tegund mýflugna lifir ekki á Íslandi (Halldorsdóttir and Larsen 1991; Holmes 1991). Auk þess sem sumarexem getur valdið hestunum mikilli þjáningu þá hefur það einnig neikvæð áhrif á ísliskan hrossaútflutning (Björnsdóttir 2001).

Sumarexem er króniskur, árstíðabundinn sjúkdómur sem gerir vart við sig á vorin en hverfur svo yfir vetrarmánuðina. Sumarexem er ofnæmi af gerð 1 en því fylgir framleiðsla á IgE mótefnum, losun á histamíni og fleiri bólgubáttum (Holmes 1991).

Útbrot í húð vegna sumarexems sjást oftast á makka, sterti og í sumum tilfellum á baki og höfði, þá sérstaklega eyrum. Útbrotin geta náð yfir á lend og síður, en eru sjaldnar á kvið eða innanvert á lærum. Sumarexem er verst þegar heitt og rakt er í veðri í langan tíma, en í þannig veðurfari þrífst flugan best. Hestar með sumarexem gróa yfirleitt sára sinna fullkomlega yfir veturinn en næsta sumar fá þeir útbrot á ný og þá oft verri en árið áður, sé ekkert gert til að verja þá fyrir flugunni (Nilsen 1984).

1.2 Ónæmiskerfið / Ónæmissvörun -ofnæmissvörun

Ónæmiskerfið er varnarkerfi líkamans og er svipað að uppbyggingu í öllum spendýrum. Líffæri ónæmiskerfisins eru beinmergur, hóstarkirtill (týmus), milta, eitlar og eitilflákar. Hvítfrumurnar eru verkfrumur ónæmiskerfisins. Þær skiptast gróft í mergfrumur sem sjá um ósérvirkt ónæmissvar s.s. át, hreinsistörf og sýningu á ónæmisvökum og í eitilfrumur sem sjá um sérvirkt ónæmissvar (Roitt 2001).

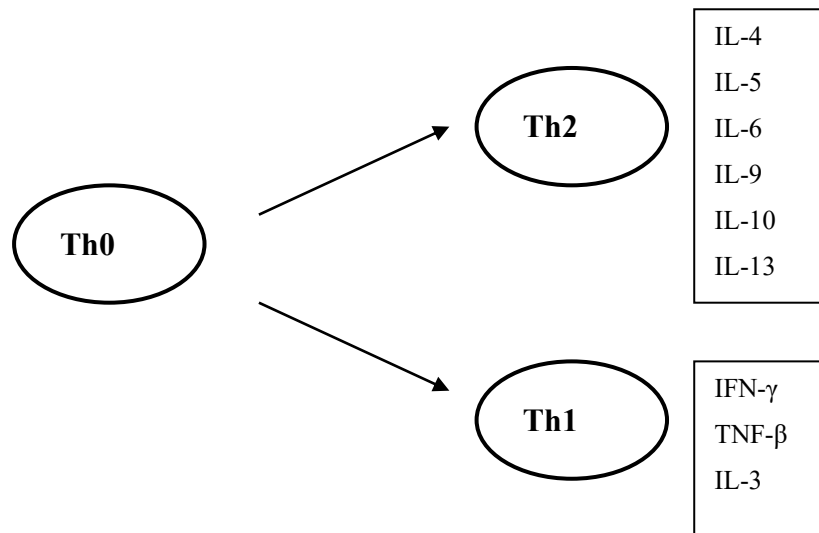
Eitilfrumurnar skiptast síðan í T-eitilfrumur og B-eitilfrumur. T-eitilfrumurnar skiptast aftur yfir í CD4⁺ hjálpareitilfrumur (Th) sem eru stjórnfrumur og CD8⁺drápsfrumur sem sjá um dráp á veirusýktum frumum. B-eitilfrumur framleiða hinsvegar mótefni. Hvítfrumurnar skipta með sér verkum og nota boðefni sem þær seyta og bregðast við til að vinna mjög náið saman. Þær eru á verði út um allan líkamann, viðbúnað innrásu sýkla eða annarra framandi sameinda (Roitt 2001).

1.3 Ónæmisminni

Ónæmiskerfið greinir ókunnugar sameindir frá eigin sameindum. Framandi sameindir eru ónæmisvakar sem ræsa kerfið til varnar. Ónæmiskerfið hefur minni, þannig að þegar kerfið hittir sama ónæmisvaka aftur verður ónæmissvarið bæði mun sterkara og fljótara. Ónæmisminnið er undirstaða bólusetninga (Roitt 2001). Þegar ónæmiskerfið hittir utanaðkomandi vaka í fyrsta skipti eru nokkrar eitilfrumur sem þekkja vakann, tengjast honum og það fara að myndast fleiri frumur sem þekkja sama vaka. Hluti eitilfrumanna þroskast og sérhæfist yfir í verkfrumur, meðan aðrar þroskast yfir í minnisfrumur. Þegar vakinn kemur næst þá eru minnisfrumur tilbúnar og svara vakanum fyrr og bindast honum betur og því er annarsstigs ónæmissvar mun sterkara og áhrifaríkara heldur en fyrsta stigs svar (Roitt 2001).

1.4 Th1 og Th2 ónæmissvör

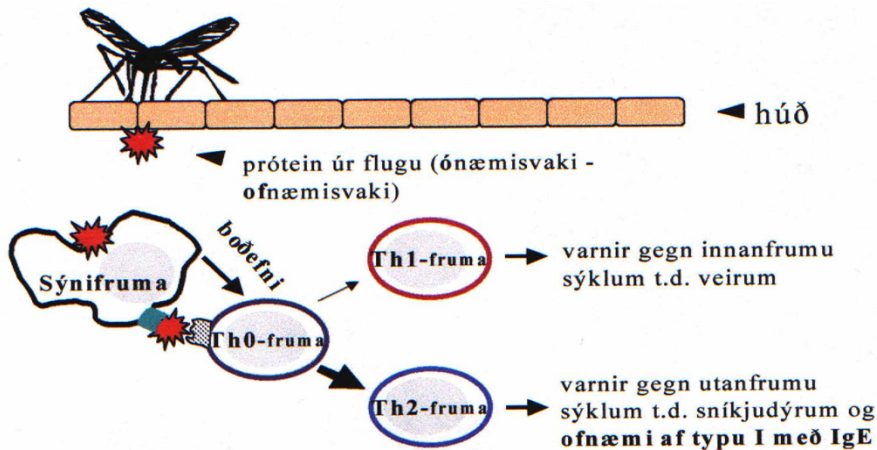
CD4 jákvæðar T-hjálparfrumur skiptast í undirflokkka eftir því hvaða boðefni þær framleiða. Þegar Th1 frumur eru örvaðar þá framleiða þær aðallega IL-2, IFN- γ , TNF- β og IL-3 en Th2 frumur framleiða IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 og IL-13 (Lee, Corr *et al.*, 1998).



Mynd 1. Th CD4 jákvæðar frumur skiptast í undirflokkka eftir því hvað boðefni þær framleiða

1.5 Ónæmisvaki - ofnæmisvaki

Mýflugan bitur hestinn og sýgur blóð en spýtir um leið inn ókunnum próteinsameindum eða ónæmisvökum sem verða að lokum ofnæmisvakar í þeim hestum sem fá sumarexem (Holmes 1991). Flugupróteinin eru tekin upp af hvítfrumum sem nefnast sýnifrumur. Sýnifrumurnar melta próteinið og sýna það T-hjálpareitilfrumum (Th). Eftir því hver innrásaraðilinn er og hvernig sýnifruman meðhöndlar hann þá beinir hún T-frumunni ýmist inn á braut Th1 eða Th2 með viðeigandi boðefnum (Lee, Corr *et al.*, 1998). Önnur hvor brautin verður þar með ráðandi í ónæmissvarinu. Th1 brautin sér mest um varnir gegn innanfrumu sýklum t.d. veirum og innanfrumubakteríum. Th2 brautin sér um vörn gegn utanfrumu sýklum t.d. utanfrumubakteríum og sníkjudýrum (Lee, Corr *et al.*, 1998; Pastoret 1998).



Mynd 2. Prótein úr flugu verður að ofnæmisvaka og ónæmissvarið beinist inn á Th2 braut með framleiðslu á IgE ofnæmismótefnum.

Af einhverjum ástæðum, sem ekki eru vel ljósar, þá leiðir ónæmissvar á Th2 braut stundum til ofnæmis hjá sumum einstaklingum með framleiðslu á þeim flokki mótefna sem kallast IgE (Holmes 1991). Í þessum einstaklingum verður ónæmisvakinn, flugupróteinið, að ofnæmisvaka. Eftir fyrstu kynni þessara einstaklinga af flugunni eru hvítfrumur sem nefnast mastfrumur húðaðar með IgE mótefnum sem eru sérvirk fyrir ofnæmisvakann úr flugunum. Í endurteknu, öflugum ónæmissvari tengist fluguofnæmisvakinn sérvirku IgE mótefnunum og þá ræsast mastfrumurnar og seyta histamíni og fleiri bólgumiðlum sem valda ofnæmiseinkennunum (Holmes 1991).

1.6 Ónæmissvörun í hestum

Ónæmissvörun í hestum er miðlað af sömu hvítfrumutegundum og ferlum og í öðrum spendýrum. Th1 og Th2 svör í hrossasjúkdómum hafa lítið verið rannsökuð en gen boðefnanna sem einkenna þessa ferla hafa verið klónuð úr hestafrumum (Vandergriff and Horohov 1993; Grunig, Himmler *et al.*, 1994; Vandergriff, Swiderski *et al.*, 1994).

Mótefnaflokkar hesta skiptast í IgG, IgA, IgM og IgE, þar af skiptist IgG mótefnaflokkurinn í a.m.k fjóra undirflokka sem nefnast IgGa, IgGb, IgGc og IgG(T) (Pastoret 1998). Eitt af aðalhlutverkum ónæmisglóbúlína er að ræsa magnakerfið (complementkerfi) (Pastoret 1998). Hlutverk IgG(T) virðist vera annað heldur en hinna ónæmisglóbúlínanna, hlutverk þess virðist aðallega vera að hlutleysa toxin og hindra ræingu á magnakerfi (Pastoret 1998). Hestainflúensuveira ræsir Th1 svar og einkennist af IgGa, IgGb og IgA mótefnasvari, á meðan bólusetning með veiklaðri veiru gegn inflúensu vekur IgGc og IgG(T) mótefnasvar og veitir þar af leiðandi litla vörn gegn inflúensu (Pastoret 1998). Hinsvegar hefur verið sýnt fram á með DNA bólusetningu gegn inflúensu í hestum að mótefnasvar er af gerð IgGa og IgGb (Lunn, Soboll *et al.*, 1999).

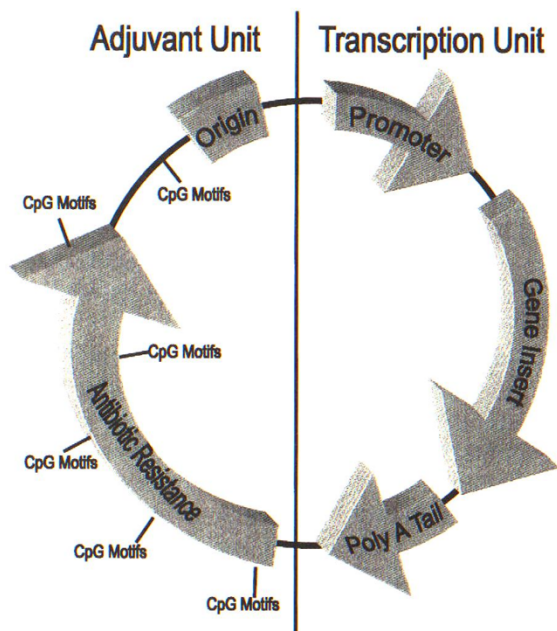
1.7 Bólusetning og bóluefni

Bóluefni eru af nokkrum gerðum; lifandi veikluð bóluefni, dauðar örverur, hlutar eða afurðir örvera, bóluefni framleidd með erfðatækni og það nýjasta í bóluefnisgerð er að nota DNA til þess að bólusetja.

Í bóluefnunum er nauðsynlegt að hafa ónæmisglæða sem eru efni sem örva ósérvirka ónæmiskerfið til dáða. En kröftugt ósérvirkt ónæmissvar er forsenda þess að nægjanlega öflugt sérvirkt svar fái. Í flestum bóluefnum sem eru leyfð í fólki er ónæmisglæðirinn alum en hann beinir ónæmissvarinu á Th2 braut.

1.8 Almenn um bólusetningar með DNA

Þessi nýja tækni til bólusetninga er frábrugðin hefðbundnum aðferðum á þann hátt að notað er hreint erfðaeefni (naked DNA). Geni próteinsins sem á að vekja svar gegn er komið fyrir í hringlaga DNA sameind, svonefndri tjáningarferju (expression vector). Tjáningarferjan er hönnuð með það í huga að tjá gen í spendýrafrumum (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).



Mynd 3. Tjáningarferja skiptist í tvö svæði ónæmisglæða-eining og umritunareining.

Umritunareiningin inniheldur stýril (promoter), poly A hala og þá röð sem á að flytja inn.

Ónæmisglæðaeiningin inniheldur gen gegn fúkalyfi (antibiotic resistance) með CpG röðum.

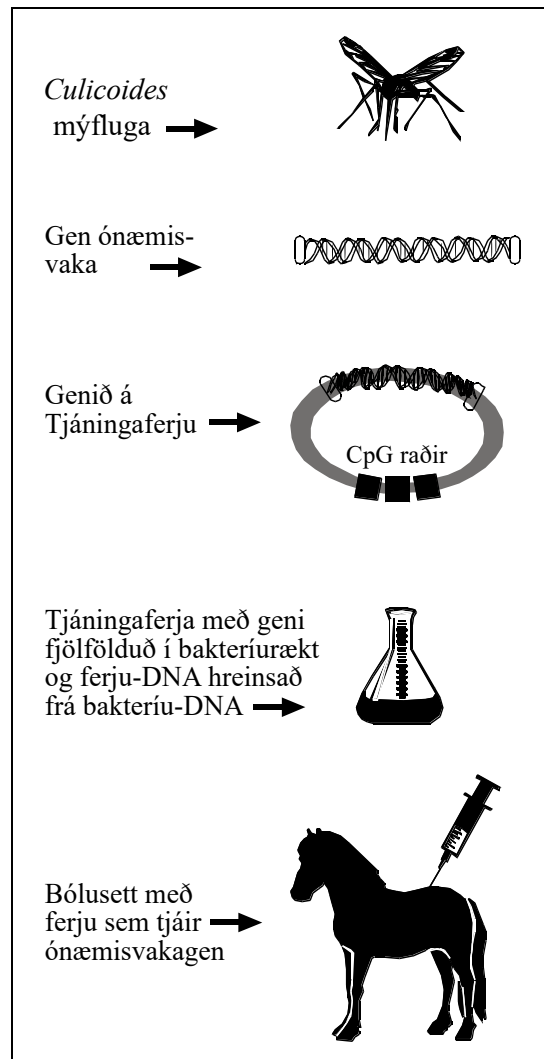
Til þess að frumurnar tjái próteinið þarf viðkomandi gen að vera í opnum lesramma (open reading frame, ORF svæði sem skráir fyrir prótein) og tengjast stýrisvæði (promoter) sem tryggir að genið sé umritað yfir í mRNA í hýsilfrumunni. mRNAið verður einnig að hafa polyA-hala til þess að það sé flutt út úr kjarnanum til umfrymisins þar sem próteinið er myndað (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

Á tjáningarferjunni er sterkt stýrisvæði sem eykur tjáningu gensins, umritunareining sem stýrir myndun á vökum, gen sem veitir ónæmi gegn einhverju fúkalyfi (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000). Einnig eru í DNA ferjunni svokallaðar ónæmisörvandi kirkisraðir (immunostimulatory sequences), sem eru ómethyleraðar cytidine-phosphate-guanosine (CpG) raðir úr bakteríu DNA. CpG raðirnar virka eins og ónæmisglæðir og beina þær ónæmissvarinu yfirleitt inn á Th1 braut (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

Tjáningarferjan með geninu er sett inn í *E. Coli* og bakteríurnar eru ræktaðar upp í stórum stíl í æti með viðkomandi fúkalyfi og ferjan endurmyndar sig um leið og DNA bakteríunnar (Tighe, Corr *et al.*, 1998).

Auðvelt er að aðskilja DNA ferjur frá DNA bakteríanna og með því fæst mikið magn af einræktuðu ferju DNA, sem má nota sem bóluefni. Ekki er alveg ljóst hvað gerist þegar DNA er sprautað í skepnuna en ferjan er líklega tekin upp af sýnifrumum (antigen presenting cells APC frumur), gen umritað og tjáð yfir í prótein (Tighe, Corr *et al.*, 1998).

Helstu kostir DNA bóluefnis eru að það er ódýrt í framleiðslu, hægt er að setja fleiri en eitt gen á tjáningarferjuna og framleiða með því marggilt bóluefni gegn fjölda sýkingarvalda. Einnig má hafa áhrif á ónæmissvarið sem fæst með DNA bóluefni t.d með því að koma fyrir genum ýmissa boðefna (cytokines) í tjáningarferjunni og þar með stýra því hvaða frumur ónæmiskerfisins svara (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).



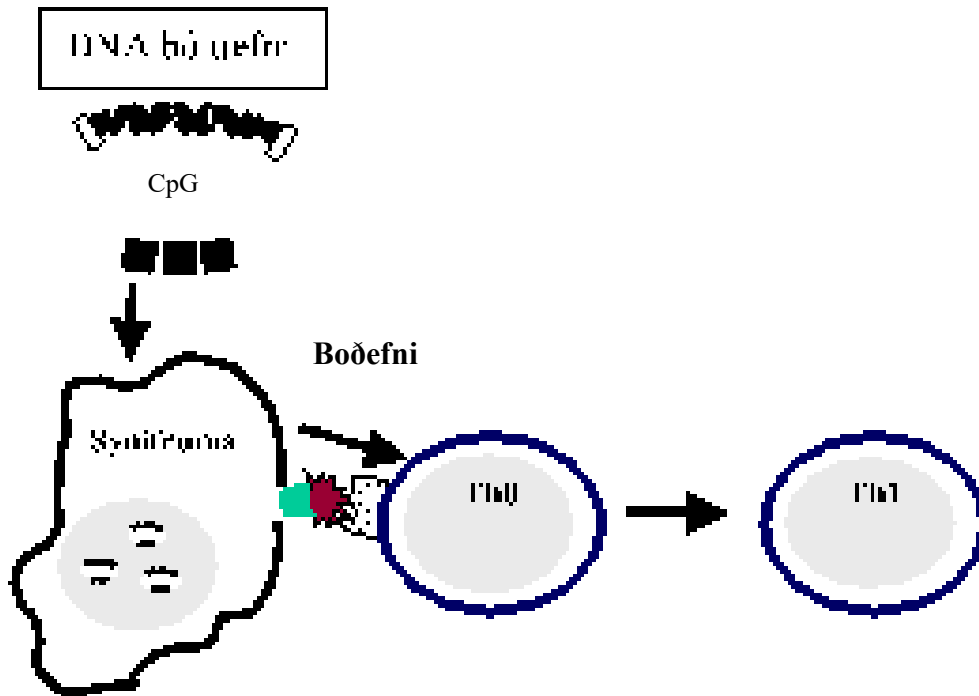
Mynd 4. Framleiðsla á DNA bóluefni

Bólusetning með DNA leiðir ekki bara til mótefnasvörunar heldur líka til örvunar á sérvirkum drápsfrumum sem er mjög mikilvægt í veirubóluefni, þar sem sérvirkar drápsfrumur eru yfirleitt aðalvörnin í veirusýkingum. Hefðbundin próteinbóluefni með alum ónæmisglæði leiða nær eingöngu til mótefnamyndunar (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

1.9 Hægt er að beina ónæmissvari á Th1 braut með DNA bólusetningu

CpG stefin gera það að verkum að DNA bólusetning beinir ónæmissvarinu fremur á Th1 braut en Th2 braut, þannig að mögulegt er að nota DNA bóluefni til að

beina ónæmissvari á Th1 braut. Þessi eiginleiki DNA bóluefna gerir menn vongóða um að nú sé hægt að þróa bóluefni gegn ofnæmi af gerð I, með því að beina ónæmissvarinu á Th1 braut þar sem Th1 eitilfrumur veita vernd, en frá Th2 hjálparfrumum sem stjórna m.a myndun á IgE og fleiri þátta sem stuðla að ofnæminu (Lee, Corr *et al.*, 1998; Babiuk, Babiuk *et al.*, 2000).



Mynd 5. Beina má ónæmissvari á Th1 braut með DNA-bóluefni.

Tilraunir í nagdýrum hafa sýnt að bæði er hægt að vernda gegn ofnæmi og lækna ofnæmi með DNA bólusetningu eða með því að snúa ráðandi Th2 svari yfir í ráðandi Th1 svar (Lee, Corr *et al.*, 1998). Þannig er möguleiki á nota megri DNA bólusetningu sem varnaraðgerð gegn því að hestar fái sumarexem og einnig sem lækningu á hestum sem þegar eru komnir með einkenni sumarexems (Lee, Corr *et al.*, 1998).

Hingað til hefur DNA bólusetning ekki gefið eins góða raun í stærri spendýrum og í nagdýrum. Það virðist vera misjafnt hvaða tjáningarferjur og hvernig CpG raðir hæfa hverri dýrategund (Babiuk, Babiuk *et al.*, 2000). Aðal vandamálið er að veikari ónæmissvörun fæst yfirleitt við DNA bólusetningu en með prótein-bólusetningu. En ef ónæmissvar er ekki nægilega kröftugt eftir DNA bólusetningu er

sá möguleiki fyrir hendi að beina því á Th1 braut með DNA bólusetningu og endurbólusetja síðan með samsvarandi próteini til að efla svarið. Annar möguleiki er að bólusetja með blöndu af próteini og CpG röðum sem ónæmisglæði til að beina ónæmissvari á Th1 braut (Tighe, Corr *et al.*, 1998).

1.10 Samanburður á ónæmissvörum hesta bólusettra með próteini eða DNA

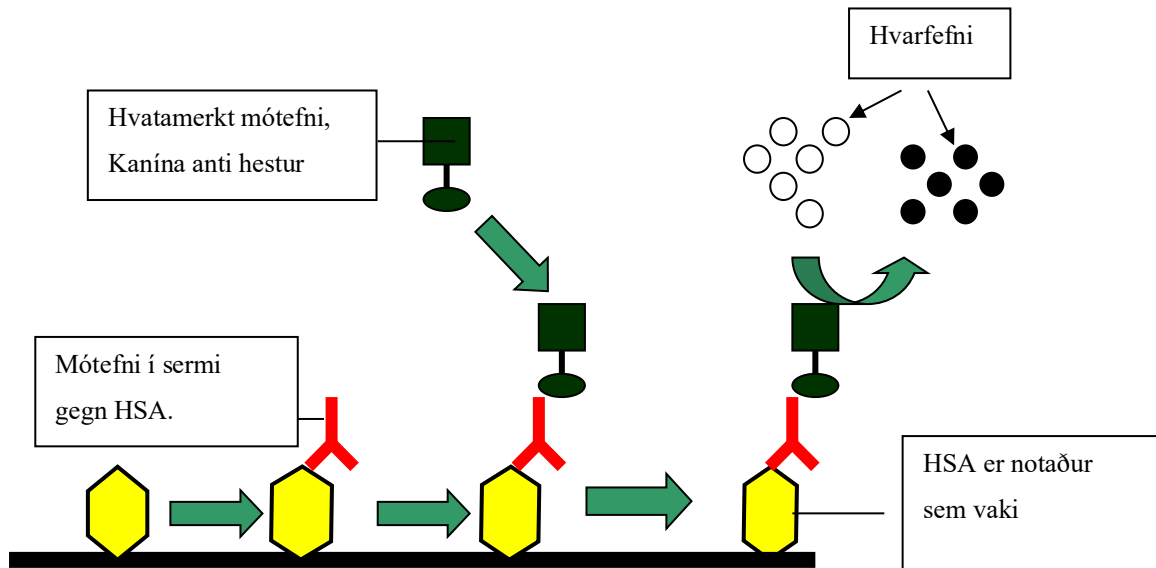
Sett var upp HSA líkan í hestunum, þar sem þeir voru annars vegar sprautaðir með tjáningarferju sem innihélt gen sem tjáir fyrir HSA og hinsvegar hestar sem voru sprautaðir með HSA próteini. Við þetta mynduðu þeir mótefni gegn HSA sem hægt er að mæla með elísuprófi. Með þessu módeli er ætlunin að geta borið saman ónæmissvar þessarar tveggja hópa.

Samanburður á mótefnasvörum hestanna var gerður með mótefnamælingu í elísuprófi einnig var athugað með hvaða mótefnaflokkum þeir svara.

Þegar Th1 frumur eru örvaðar framleiða þær aðallega IL-2 og IFN- γ en Th2 frumur framleiða IL-4, IL-5, IL-6 og IL-10. Með því að örva eítílfrumur *in vitro* og einangra mRNA boðefnanna, er hægt að mæla boðefnin í LightCycler. Með því að mæla mRNA boðefnanna í LightCycler getum við greint hvort hestarnir séu að svara með Th1 eða Th2 svari. Sett upp boðefnamælingar í LightCycler, mælt IL-4, IFN- γ og β -actin er mælt til viðmiðunar, en í frumum er stöðug framleiðsla á β -actini.

1.10.1 Elísupróf

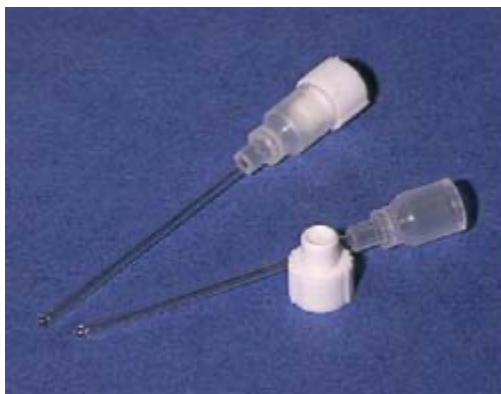
Elísupróf (Enzyme linked immunosorbent assay) byggir á mótefna-mótefnavaka bindingu (antibody-antigen complex). Notað er hvatamerkt mótefni gegn þeim mótefnum sem leitað var að. Platan var húðuð með mótefnavaka, þvegin til þess að losna við allan óbundinn vaka. Serum var sett á plötu. Ef mótefni gegn HSA eru til staðar í sermi tengist það við HSA-vakann í bollanum. Konjugatið er mótefni gegn hesta mótefni, sem er tengt við ensím t.d. peroxidasa. Ensímmærta mótefnið tengist við mótefna-mótefnavaka complex. Litlausu hvarfefni er bætt út í lausnina, ensím hluti bindilsins (ligand) gerir það að verkum að lausnin litast. Sjá mynd nr. 6.



Mynd 6. Skematísk mynd af elisuprófi.

1.10.2 *LightCycler*

Í *LightCycler* fara saman PCR tækni og flúrljómunargreining á rauntíma. Með því að nema flúrljómun við hvern hring er hægt að mæla magn DNA í upphafslausn út frá



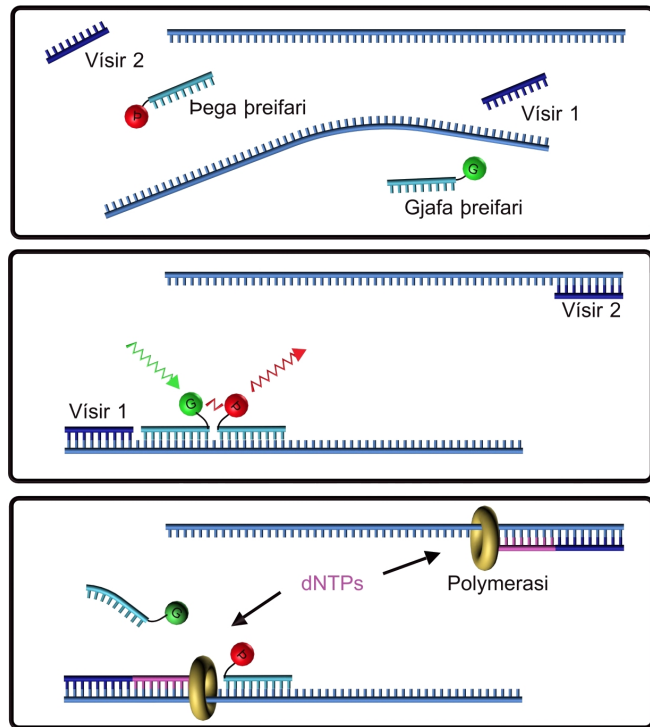
magni og hraða á myndun PCR afurðar. Mælingin er framkvæmd í mjög litlu rúmmáli 5-20 μ l. Sýnið er sett í tækið í sérstökum glerhárpípum (sjá mynd 7). Glösum er komið fyrir í einskona hringekju í hólki þar sem brennipunktur flúrljómunar er í hvarfhólfinu.

Mynd 7. Sérstakar glerhárpípur eru notaðar til mælingar í *LightCycler*.

Inn í tækinu er spaði sem fer 2000-10000 rpm og veldur stöðugri og fljótri hitastigsbreytingu. Þetta tryggir að hitastigið getur breyst mjög hratt, hitastiginu er

breytt með kælivindu og hitaspíral. Þar sem hárpíurnar sem sýnin eru í hafa mjög mikið yfirborðsflatarmál miðað við rúmmál þeirra, eru þær mjög heppilegar til snöggra hitabreytinga. Hægt er því að keyra 30 PCR hringi í Light Cycler á 6 mínútum (Wittwer, Ririe *et al.*, 1997, LightCycler™ Users Guide. 1998)

Hægt er að greina PCR mögnun á “LightCycler” með sérvirkum flúrljómandi þreifurum þar sem ákveðnar raðir eru magnaðar upp með viðeigandi vísu. Tveir flúrljómandi þreifarar gefa flúrljómun við það að bindast hlið við hlið á PCR afurðina. Tækið nemur flúrljómunina og ber hana saman við staðalkúrfu og reiknar út það magn á því DNAi sem mælt er. Þessir sérvirku flúrljómandi



Mynd 8. FRET

þreifarar hafa bæði kosti og galla, kostirnir eru að þeir eru mjög sérvirkir en ókostirnir eru að þeir geti verið erfiðir í notkun og eru dýrir.

Þreifararnir sem voru notaðir eru sérstaklega hannaðir fyrir LightCycler. Tvö flúrljómandi fákirni þekkja röð fyrir innan vísana sem eru notaðir við PCR. Annar þreifarinn (probe) er gjafaþreifari (donor probe). Hann er merktur með fluorescein við 3' enda, gjafaþreifarinn tekur við utanaðkomandi ljósi frá LED (light emitting diode) úr LightCycler tækinu. Hinn þreifarinn nefnist viðtakaþreifari (acceptor probe) er merktur með flúrljómandi Cy-5 og tekur hann við hluta af orku frá gjafaþreifara með svokölluðum dipole interaction (Landt O. 1999).

Flúrljómun frá viðtakaþreifara gerist eingöngu þegar bæði gjafaþreifari og viðtakaþreifari hafa tengst við rétt svæði sem þeir þekkja á afurðinni. Þetta ferli, þ.e

að flytja orku á þennan hátt frá einum fluorljómandi lit yfir á annan er kallað Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) (Caplin 1999).

FRET er háð fjarlægð á milli þreifara, þ.e því meiri fjarlægð sem er á milli þreifaranna því veikara merki fæst.

Best er að þreifarar séu staðsettir nálægt hvor öðrum, eða með 1-5 basapar á milli sín.

Þeir mega ekki innihalda

- endurteknar raðir né einsleitar raðir
- Hátt magn cytosíns og guaníns á endum.
- Hátt hlutfall puríne.

Þreifararnir mega ekki þáttaparast við PCR vísa né heldur lengjast á meðan PCR hvarfið er í gangi. Bræðslumark þreifaranna ætti að vera 5-10°C hærra heldur en bræðslumark primera (Landt O. 1999).

Þreifararnir skulu vera staðsettir nálægt 3' enda á markröð DNA, sem fjærst frá 5' enda. Þreifararnir mega samt ekki falla yfir afturvísir (reverse primer). Þessi staðsetning leyfir mælingu á flúrljómun áður en búið er að lengja vísana endanlega og áður en þreifarar eru fjarlægðir af Taq polymerasa (Landt O. 1999). Sú röð sem er hentug að magna upp, er innan stöðugrar DNA raðar, þar sem ekki eru endurtekningar né einsleitar raðir. Þess konar raðir geta myndað lykkjur og eru því mun minna aðgengilegar fyrir vikið (Landt O. 1999).

Ástæðan fyrir því að bræðslumark þreifara á að vera 5-10°C hærra en vísa er til þess að gefa þreifurum auka tíma, til þess að bindast við markröð áður en þeir eru fjarlægðir af Taq polymerasa. Til þess að þreifarar geti bundist með góðum árangri við markröð á DNA þræði, verða þáttaparandi þreifarar að keppa við vísa, sem sjá um mögnunina, um það að bindast við DNA. Þáttaparandi þreifarar eru í minna magni en vísarnir. Við 70°C tengjast þreifararnir við markröð DNA en ekki vísarnir, þegar hitastig er lækkað geta vísar sest á DNA og er lenging á DNA þræðinum hafin og staðurinn þar sem þreifararnir geta tengst við fljótlega hulinn með nýmynduðu DNAi (Landt O. 1999).

Þreifararnir eru notaðir tveir saman og eru þeir staðsettir í PCR afurð fyrir innan vísana. Aðeins þegar þreifararnir bindast nálægt hver öðrum verður orkuflutningur

(FRET) á milli þeirra. Gjafapreifarinn örvast og það verður orkuflutningur til þegapreifarans sem sendir frá sér geislun ef mótsvarandi myndefni er til staðar. Ef þreifarar eru fríir í lausn þá er of langt á milli þeirra til þess að orkuflutningur geti orðið á milli þeirra. Flúrljómunin er í réttu hlutfalli við magn DNA raðarinnar í sýninu. Mögnunin getur orðið 10^{10} föld (LightCycler™, Users Guide, 1998).

2 Markmið verkefnis

Markmið verkefnisins var að bera saman ónæmissvar hesta sem bólusettir eru með próteini (Human serum albumin prótein, HSA) annars vegar og geni próteinsins hins vegar (HSA gen). Í próteinbólusettum hestum er framkallað ofnæmi af gerð I á Th2 braut.

Borið er saman

- sérvirkt HSA mótefnasvar mælt í elísuprófi.
- IgG mótefnaflokkasvar mælt í elísuprófi
- boðefnasvar þar sem mælt er boðefna mRNA með rauntíma PCR í LightCycler eftir örvun eítílfruma *in vitro*.

3 Efni og aðferðir

sjá efni og uppskriftir í viðauka.

3.1 Hestar

Við tilraunina voru notaðir 4 hestar: Reykur 8 vetra, Tvistur 7 vetra, Jarpur 8 vetra og Litfari 7 vetra, frá Kristni Guðnasyni Skarði, Landssveit. Jarpur og Litfari voru bólusettir með HSA geni og Tvistur og Reykur voru bólusettir með HSA próteini.

3.2 Bólusetningar og blóðtökur

Bólusetning með HSA próteini. Reykur og Tvistur voru sprautaðir fjórum sinnum með þriggja vikna millibili með 89,5 µl af 2 mg/ml HSA próteini, 0,9% NaCl og 250 µl Alum (Alhydrogel® Superfos biosector cat. 3048). Lausninni er sprautað undir húð á hálssvæði hestanna. Bólusetningin var gerð á tímabilinu 30. október-13 desember 2000. (sjá viðauka nr.III)

Bólusetning með HSA geni. Litfari og Jarpur voru bólusettir með pcDNA3.1/GS(HSA). Sprautað var 0,5 mg í húð og í vöðva. (250 mg +250 mg). Bólusetning var gerð á tímabilinu 29. nóvember 2000 - 6.júní 2001. (Sjá viðauka nr. III).

Blóðtökur: Blóð var tekið í blóðtökuglös (Vacuette®Greiner cat.no. 455084/040002) með Lithium Heparin storkuvara ef nota á hvítfrumur. Sermisglös (Vacuette® greiner cat.no 455092/040005) ef hirða á sermi.

3.3 Örvun eitelfruma og einangrun mRNA fyrir mælingu í LightCycler.

3.3.1 Örvun eitelfruma

Hestafrumur eru aðskildar úr blóði og örvaðar *in vitro* með ósérvirkum hvítfrumuörvum þ.e. mítogenum 50 µg/ml PHA (phytohemagglutinin). Einnig voru frumur örvaðar með HSA 100 µg/ml og HSA 10 µg/ml. Óörvaðar hvítfrumur eru notaðar til samanburðar. Eftir 24 klst. örvun eru eitelfrumur hirtar og þvegnar og mRNA einangrað.

1. 15 ml af stigli (HISTOPAQUE-1077-1 Sigma) sett í 50 ml skilvinduglas og 25 ml af blóði er látið varlega ofaná.
2. Skilið við 2000 rpm í 30 mínútur við herbergishita, bremsa ekki á.

3. Eftir aðskilnað sjást þrjú lög, efsta lagið er plasma, þar fyrir neðan kemur lag af hvítum blóðkornum ofan á stigli. Neðst eru rauð blóðkorn.
4. Hvítfrumulag tekið úr 2 glösum og sett í eitt. Fyllt upp með Phosphate buffer saline lausn (PBS).
5. Skilið við 2000 rpm í 20 mín.
6. Floti hellt af botnfalli og botnfall leyst upp, með því að skrapa glasið við grind.
7. PBS lausn er bætt við upp að 40 ml og skilið við 1000 rpm í 15 mín. Þvegið ca.4-5 sinnum á litlum hraða til þess að losna við blóðflögur.
8. Botnfall leyst upp í 3 ml af 10% Fetal calf serum æti (kálfafósturserum).
9. Talning fruma: 180 µl æti sett í Eppendorf glas +20 µl af frumulausn. 20 µl sett á Neubauer talningargler og talið í smásjá. Talið í 4 x 4 reitum og heildarfjöldinn í ml fæst með því að margfalda með 10^4 og þynningu til þess að fá frumufjölda í ml.
10. 10.000 frumur settar í hverja holu í sex holu bakka (Nunc cat. nr. 150229).

3.3.2 *Hirðing á frumum*

1. Eftir 24 klst voru frumur hirtar, frumur voru losaðar af bakka með því að pumpa með pípettu. Frumur færðar yfir í stórt skilvinduglas (10 ml).
2. Frumulausnin skilin við 1000 rpm í 5 mínútur.
3. Mest af vökva hellt af botnfalli, botnfall hrist upp og frumulausn flutt yfir í Eppendorf skilvinduglas.
4. Skiljun við 3000 rpm í 5 mín. Floti hellt af botnfallinu. 10.000 frumur í hverja holu og 600 µl af sprengidúa (Lysis buffer) og 4.2 µl af β-mercaptoethanoli var bætt út í lausnina. Sprengidúinn inniheldur guanidine thiocyanate, sem hefur það hlutverk að eðlissvipta próteinin, sprengja frumurnar og það hindrar RNA brotni niður. Lausnin er gerð einsleit með því að vortexa. Ef lausnin er seig þá má auka magn sprengidúans eða sprauta lausninni út með mjórri nál. Hérna má stoppa ferlið og frysta botnfall í sprengidúa við -80°C .

3.3.3 *Einangrun á RNA*

Mjög mikilvægt er að vera með vel hreinsað RNA. Notað var Absolutely RNA™ RT-PCR Miniprep Kit, no. 400800. Sýnin mega ekki innihalda neitt DNA því það getur magnast upp í LightCycler hvarfinu og myndað afurð sem líkist afurðinni sem búist er við að sjá frá RNAinu.

Aðferðalýsing samkvæmt “Absolutely RNA-PCR Miniprep Kit frá Stratagene RT”.

1. Flytja ~600 µl (allt að 700 µl) af lausn yfir í Prefilter spunabolla (Spin Cup) sem hefur verið komið fyrir í safnglasi (receptacle tube) → loka lokinu yfir spunabolla. Með þessu er verið að hreinsa sýnið og minnka magn DNA.
2. Skilið við 14000 rpm (hámarkshraði) í 5 mín. í Eppendorfskilvindu.
3. Fjarlægja spunabolla frá safnglasi og henda, vökvinn er geymdur.
4. Setja 600 µl af 70% ethanolí saman við lausnina og vortexa í 5 sek.
5. Flytja ~600 µl (allt að 700 µl) af þessari lausn yfir á Fiber Matrix spunabolla (RNA binding spin cup), sem hefur verið komið fyrir í 2 ml safnglasi. RNA bindi spunabolla (RNA binding spin cup) hefur kísilsíu (silicabased fiber matrix). RNA bindst við þræðina í síunni og helst því í spunabolla.
6. Skilið við 14000 rpm í 30-60 sek.
7. Fjarlægja spunabolla og vökva er hellt, hérna er skref nr. 5-7 endurtekið ef við höfum 10×10^6 frumur, þ.e. heildarrúmmálið er $2 \times 600 \mu\text{l}$. Afgangur af lausninni úr skrefi nr. 4 tekin sett á sömu síu og skilið við 14000 rpm í 30-60 sek.
8. DNasa treatment/meðferð → ákjósanlegt fyrir RT-PCR.
 - a) 600 µl af 1x lágsalts þvottadúa (Low Salt Wash buffer), skilið við 14000 rpm í 30-60 sek. Meðhöndlun sýnis með lágsalt þvottadúa og melting með DNasa fjarlægir restina af DNA.
 - b) Spunabolla tekinn úr og vökva hent. Spunabolla settur í nýtt safnglas. Spunnið við 14000 rpm í 2 mínútur.
 - c) DNasi undirbúinn, 50 µl af DNasa meltingardúa (Digestion buffer) blandað við 5 µl af RNasa Free DNasa I, gæta þess að blanda varlega því DNasi 1 er mjög viðkvæmur fyrir eðlissviptingu.
 - d) Bæta 55 µl af DNasa lausn beint á þræði síunnar (fiber matrix) í spunabolla.

- e) Incubera sýni við 37°C í 15 mínútur.
9. Bæta 600 µl af 1x hásalt þvottadúa (High Salt Wash buffer) út í spunabolla, spunnið við 14000 rpm í 30-60 sek.
 10. Spunabolli tekinn og vökva hellt úr.
 11. 600 µl af lágsalts þvottadúa, spunnið við 14000 rpm í 30-60 sek.
 12. Spunabolli tekinn úr og vökva hellt.
 13. 300 µl lágsalts þvottadúa bætt við, spunnið við 14000 rpm í 2 mín., til þess að þurrka Fiber Matrix.
 14. Vökva hellt og spunabolli fluttur yfir í 1.5 ml skilvinduglas og safnglasi er hent.
 15. 100 µl af losunardúa (Elution buffer) er bætt beint á miðju á Fiber Matrix, incuberað í 2 mín. við herbergishita. Skilið við 14000 rpm í 1 mín. Þetta skref er endurtekið og þá er notaður 40 µl af losunardúa og incuberað í 2 mín., og skilið við 14000 rpm í 1 mín. Lokaskrefið felur í sér að losa RNA úr fiber Matrix.
- RNA geymist í 1 mánuð í -20°C og við -80°C í lengri tíma.

3.3.4 Myndun á cDNA

Myndun cDNA úr RNA með víxlríta (reverse transcriptasa). cDNA er búið til svo hægt sé að mæla boðefnin í LightCycler.

Gerð samkvæmt ProSTAR™ First-Strand RT-PCR kit

1. Notaðir voru 14 µl af sýni, total RNA og 24 µl DEPC-vatni
2. 3 µl oligo(dT)primer (100 ng/µl) saman við hvarflausn, blanda lausn vel.
3. Incubera t.d á hitaplötu við 65°C í 5 mínútur. Kæla hvarflausn hægt niður við RT í ca. 10 mínútur, til þess að leyfa vísunum að tengjast (annealast) við RNA afurð.
4. Til þess að mynda first strand cDNA, skal nota þessi efni í eftirfarandi röð:
 - 5 µl af 10 x first strand buffer
 - 1 µl af RNasa Block Ribonucleasa Inhibitor (40 U/µl)
 - 2 µl af 100 mM dNTPs
 - 1 µl StrataScript™ reverse transcriptasa (50 U/µl)

Lausninni er blandað varlega saman og hituð í 1 klst við 42°C, í PCR tæki og 90°C í 5 mínútur. Hægt er að mæla cDNA lausn beint í LightCycler tæki.

3.3.5 Mæling DNA í ljósgleipnimæli (Hoefer).

DNA mælt í Hoefer mæli til þess að sé hægt að reikna út styrk DNA í upphafsþynningu fyrir þynningarröð.

1. Kveikja á lampa 15. mín. fyrir notkun.
2. Blankur: 3 µl 1 x TNE buffer + 3 µl CAS B litur.
Staðall: 3 µl 100 ng / µl staðal (Thymus Calf serum) DNA + 3 µl CAS B litur.
Sýni: 3 µl sýni + 3µl CAS B.
3. Núllstillt með blank. Kalibrerað með staðal og setja inn gildi hans.

IFN-γ mældist 36 ng / µl.

Lengd plasmíðs er : 3115 bp

Meðal mólþungi basapars er: 649 g/mól.

Mólþungi: 3115 bp x 649g/mól = 2,0 x 10⁶ g/ mól.

Magn: $\frac{2,0 \times 10^6 \text{ g/ mól} \times 6,023 \times 10^7 \text{ mólíkúl}}{6,023 \times 10^{23} \text{ mólíkúl/mól}} = 0,2 \text{ ng/}\mu\text{l}$

36 ng/µl x X=0,2 ng/µl x 200 µl

X=1,1 µl af pUC18 IFN-γ DNA

Blandað 1,1 µl af pUC18-IFN-γ saman við 200 µl TLE buffer.

IL-4 mældist 110 ng / µl

Lengd plasmíðs er 3032 bp að lengd og með sama hætti við útreikninga:

Blandað 0,36 µl af pUC18 IL-4 DNA við 200 µl TLE buffer.

(eða 1 µl pUC18 IL-4 DNA +560,2 µl TLE buffer)

β-actin mældist 94 ng / µl

Lengd plasmíðs er 3136 bp að lengd og með sama hætti við útreikninga:

Blandað 0,43 µl af pUC18 β-actin DNA við 200 µl TLE buffer

(eða 1 µl pUC18 β-actin DNA við 464,1 µl TLE buffer)

3.3.6 Mæling DNA í LightCycler

Í hvarfið þarf að nota Eppendorfglös með kísilhúð til þess að koma í veg fyrir viðloðun DNA við glasið. Þetta getur skipt máli þegar farið er að mæla mjög fáar sameindir. Mikilvægt er að nota filterodda og hanska til að minnka hættu á smiti. Best er að gera mastermix, þar sem öllum eignum nema DNA er blandað saman.

Efni:	Styrkur:	Magn	Mastermix
Fjölliðari*	0.8 U/μl	1 μl	Y μl
Þreifarabland			
a	2 μM hvor þreifari	1 μl	Y μl
Vísablanda	5 μM hvor vísir	1 μl	Y μl
dNTP	2 mM / af hverju þeirra	1 μl	Y μl
10 x buffer	40 mM MgCl ₂	1 μl	Y μl
DNA	1 μl	1 μl	Y μl
H₂O	Tafla 1. Lausnir sem þarf í FRET hvarfið, styrkur og magn þeirra. Y fer eftir fjölda sýna hverju sinni. *Polymerasi.		x Y μl

Til að fá staðalkúrfu þarf að gera þynningar í Tris Low buffer (TLE). Gerðar 10 x þynningar, frá 60x10⁶ eintök niður í 60 eintök. Prufuð voru mismunandi hitastig fyrir þáttatengingu fyrir PCR hvarfið, komst að því að eftirfarandi hitastig og tengingartími (annealing time) í töflu 2 gaf mögulegar niðurstöður.

	Hitastig fyrir þáttatengingu	Anneal tími
B-actin	56°C	15 sek.
IFN-gamma	54°C	15 sek.

Tafla 2. Hitastig og annealing tími í LightCycler.

Fyrir FRET hvarf þarf að nota fjölliðara án 5' exonúkleasa virkni svo sem Klen Taq.

3.3.7 Meðhöndlun sýna

9 µl af mastermixi og 1 µl af DNA úr viðeigandi sýni sett út í Eppendorfglös. Þessum 10 µl er því næst komið fyrir í sérstökum hárpípuhlösum (reaction cuvettes) frá framleiðenda “LightCycler” Idaho Technology. Hárpípuhlösum var komið fyrir í svokölluðum adaptorum, sem eru einskonar hólkar sem vernda glösin á meðan verið er að meðhöndla þau. Plastlok voru sett lauslega á og sýni skilin upp að 1500 rpm í skilvindu. Lokin voru síðan fest varlega á því glösin geta auðveldlega brotnað (Wittwer, Ririe *et al.* 1997).

3.3.8 Keyrsla í “Lightcycler”

Hárpípuhlösum er komið fyrir í “LightCycler”. “LightCycler” forritið er opnað og farið inn í “LightCycler Run Modes”. Í main menu er valið “LightCycler”, síðan er valið “LOAD” og “START” til að gefa upp fjölda sýna og hvar eigi að vista keyrsluna. Þegar það er búið er valið “DONE” og gefnir upp eftirfarandi tímar og hitastig á hvarfinu:

Skref:	Hitastig	Tími	Hraði hitastigsbreytinga
Eðlissvipting* ¹	94°C	0 sek.	20°C / sek
Þáttatenging* ²	0.5°Cx (%GC%)	0 sek.	20°C / sek
Nýsmið* ³	68-74°C	0.03x (lengd afurðar) sek.	1-2°C / sek

Tafla 3. Skref í Lightcycler

*¹denaturation, *²annealing.

Eðlissvipting og þáttatenging hvarfsins í “LightCycler” tekur 0 sekúndur. Smíðin sjálf er miðuð við 25 núkleotíð á sekúndu. Hraði hitastigsbreytinga, er sá tími sem það tekur hitastig að fara milli hitastigsskrefa, minnsti hraðinn er 0.1°C/sek og mesti hraðinn er 20°C/sek. Fjöldi hringja er 45. Týpan sem notuð var er “Quantification” sem er magnmæling. Það þarf að velja á milli flúrljómunar bylgjulengda með því að velja Display Mode: C2/1 eða C2/C1, er val á bylgjulengd flúrljómunar sem er skráð meðan á keyrslu stendur. Hægt er að velja þrjár bylgjulengdir eða hlutfallið á milli þeirra Ch2 greinir geislun frá Cy5.

Að lokinni keyrslu er Quantification valið í “main menu” til að skoða niðurstöðurnar. Stillt á Fluorescence 2 / Fluorescence 1. Fluorescence 1 er valið til þess að greina flúrljómun eða SYBR Green 1. Fluorescence 2 er valið til þess að greina Cy5.

Hlutfall milli Cy5 og flúrljómunar er mælt og sést það á myndum 13 og 16 hvar það eykst, þar sem kúrfan rísa (Wittwer, Ririe *et al.*, 1997).

Merkt er við “Background subtraction” til þess að lægsta flúrljómunargildi hvers sýnis er dregið frá öllum flúrljómandi gildum sýnisins. Síðan er smelt á “Set Noise band” sem er notað til þess að losna við bakgrunn. Sýni eru valin til þess að skoða kúrfu.

3.3.9 Mikil hættu á erfðaeftirmengun

Vegna þess hve aðferðin í LightCycler er næm þá er mjög auðvelt að fá smit í sýnin. Smit getur auðveldlega komist í neikvæða kontrólið og því eru gerðar sérstakar varúðarráðstafanir s.s að blanda neikvæða kontrólið á einum stað og þangað kemur erfðaeftir aldrei. Einnig verður að gæta þess að skipta oft um hanska.

3.3.10 Rafdráttur

Sýnin voru rafdreigin á agarósugeli og skoðuð í útfjólubláu ljósi. Notað var 1.7% agarósagel þar sem agarósi Seakem® LE frá BioWhittaker Molecular Applications var leystur upp í 0,5 x TBE, blandan er hituð þar til hún er tær. Út í gelið var bætt ethidium bromide þannig að lokastyrkur þess yrði um 0,5 µg/ml. Ethidium bromide er flúrljómandi litur sem fer inn á milli basaparanna og litar með því DNAið. Lausnin var sett í ílát, látið storkna eftir að sérstökum greiðum var komið fyrir í gelinu. Hlutverk greiðunnar er að mynda brunna sem sýnum er síðan sprautað í. Þegar gelið hafði storknað voru greiðurnar teknar úr og gelinu komið fyrir í rafdráttartæki. Fyrir hleðslu á gel var DNA sýnum blandað við RSB dúa (restriction stop buffer) en hann inniheldur 50% glycerol, 0,015 mM EDTA og Bromphenol blue. RSB liturinn hefur það hlutverk að hægt er að meta lengd rafdráttarins. 1 Kb DNA ladder (Gibco BRL) frá LifeTechnologies var rafdreiginn með sýnunum og notaður sem stærðarviðmið. Rafdregið var við 70-80 V í 15-25 mínútur.

3.3.11 Rafdráttur sýna úr LightCycler

Sýnin voru tekin úr hárpíuglösunum með því að brjóta endana af og þrýsta sýninu út með sérstakri pípettu. Sýnin voru sett í Eppendorfglös. 4 µl voru notaðir af sýni, 2 µl af RSB stigli (ladder) er blandað við sýnið og 4 µl af vatni. Þegar rafstraumur fer um gelið flyst DNA sem er neikvætt hlaðið (við pH 8.0) að jákvæða rafskautinu. Stórar sameindir dragast mun hægar í gegnum gelið vegna þess að þær mæti meiri mótstöðu. Stærð bútanna sem verið var að magna upp í LightCycler er þekkt þannig að hægt er að rafdraga marker eða stærðarstaðal með þekkta bútastærð til þess að tryggja það að réttur bútur hafi verið magnaður upp.

4 Niðurstöður

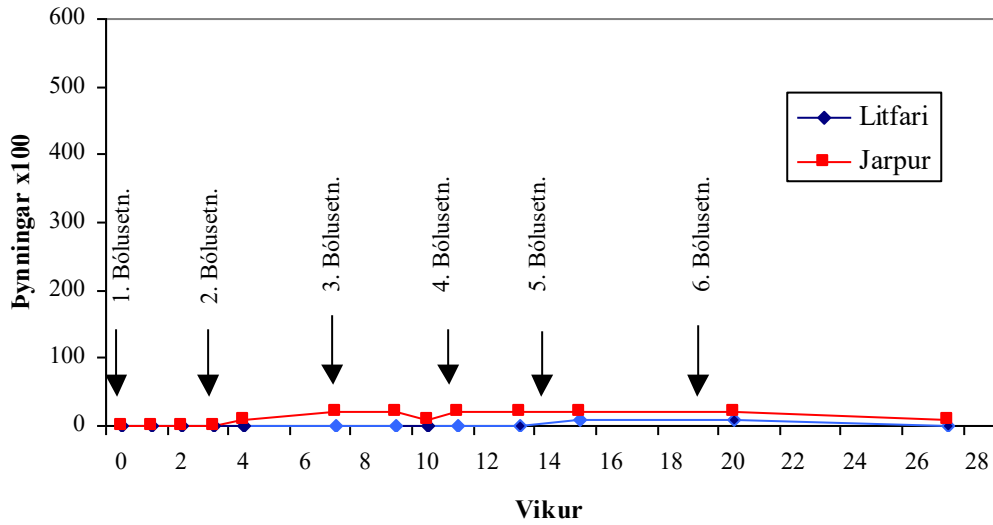
4.1 Elísupróf; HSA-DNA bólusettir hestar.

Hestar voru bólusettir með pcDNA3.1/GS(HSA) bóluefni í viku nr. 0, 3, 7, 11, 14 og 19. HSA sérvirk mótefni mælast í Jarpi í 4. viku, en ekki fyrr en í 13. viku hjá Litfara. Hjá Jarpi mælast mótefni í þynningunni 1/100 í 4. viku og í 7. viku mælast mótefni í þynningunni 1/200 og haldast þannig fram í 27. viku þar sem þau fara að lækka og engin mótefni eru mælanleg í 41. viku. Hjá Litfara mælast mótefni í 13. viku og eru þá í þynningunni 1/100, héldust þannig fram að 21 viku en þá fóru þau að lækka og í 41. viku voru engin mælanleg mótefni hjá Litfara. Sjá mynd nr. 9.

4.2 Elísupróf; HSA prótein bólusettir hestar

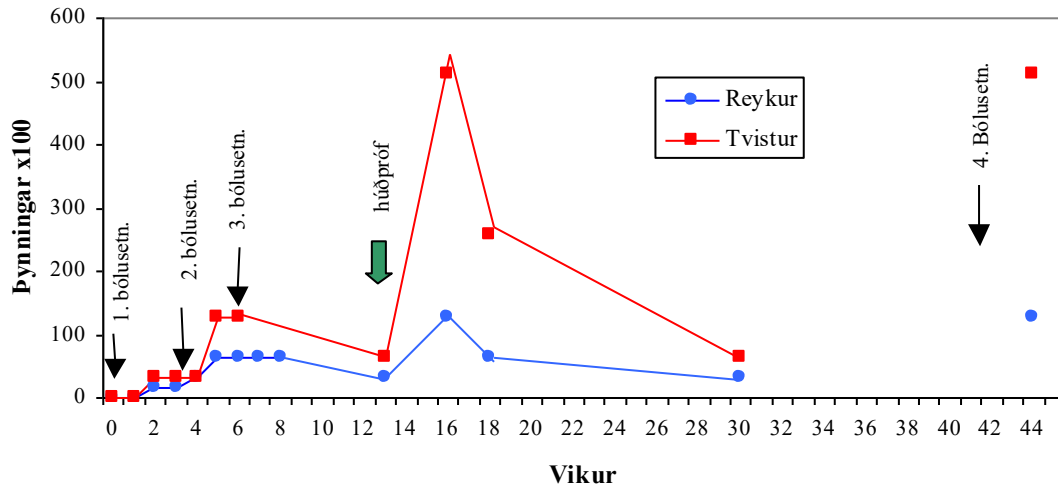
Reykur og Tvistur voru bólusettir með HSA-próteini með alum ónæmisglæði. Bólusetningarnar voru gerðar í viku nr. 0, 3, 6, 42. Einnig var gert húðpróf á þeim í viku nr 13. Strax tveimur vikum eftir fyrstu bólusetningu voru mælanleg HSA sérvirk mótefni í þeim báðum. Mótefni mældust í þynningunni 1/1600 hjá Reyk en 1/3200 hjá Tvisti. Eftir aðra bólusetningu, í viku 5 mældust mótefni hjá Tvisti í þynningunni 1/6400 og í Reyk í þynningunni 1/12800. Í þrettánda viku höfðu báðir hestarnir lækkað og mældust mótefni hjá Reyk í þynningunni 1/3200 og hjá Tvisti 1/6400, í sömu viku var gert húðpróf. Í húðprófi er mótefnavaka sprautað í húð og ónæmiskerfið svarar á það eins og það sé bólusetning. Húðprófið sem gert var í 13. viku virkar því eins og bólusetning og hækkar mótefnasvarið verulega við það, Mótefni mældust í 17. viku hjá Reyk í þynningunni 1/12800 og hjá Tvisti 1/51200. Í 42. viku voru þeir bólusettir í fjórða skipti og tveim vikum seinna mældust mótefni jafn há eins og þau urðu eftir húðpróf, eða í þynningunni 1/12800 hjá Reyk og 1/51200 hjá Tvisti. Sjá mynd nr.10.

HSA-DNA bólusettir hestar

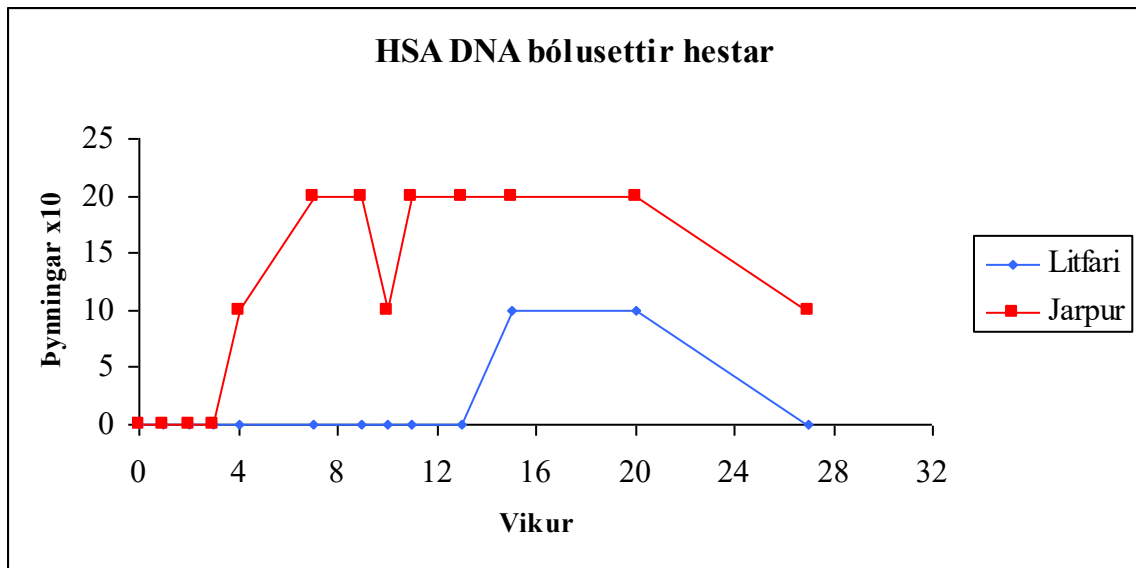


Mynd 9. HSA sérvirk mótefni hjá HSA-DNA bólusettum hestum Litfara og Jarpi.

HSA prótein bólusettir hestar



Mynd 10. HSA sérvirk mótefni hjá HSA-prótein bólusettum hestum Reyk og Tvisti.



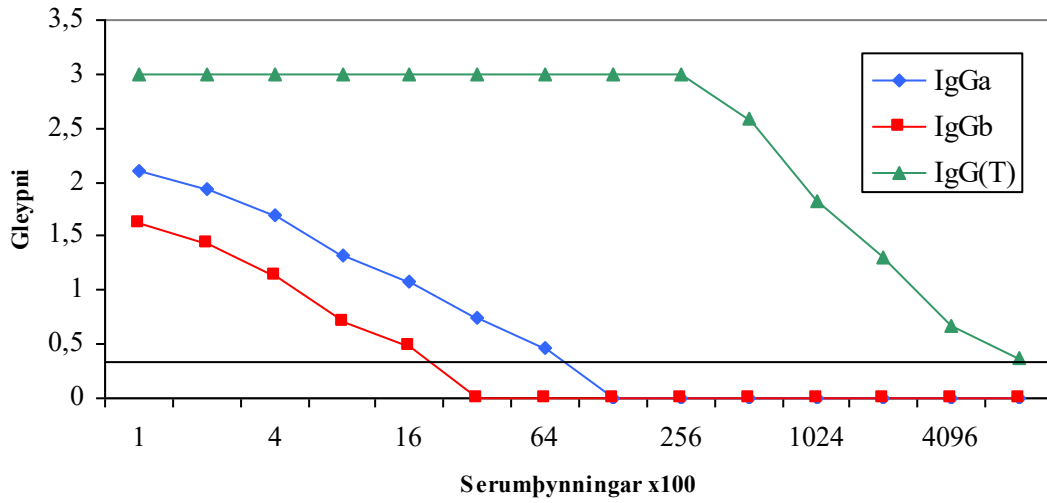
Mynd 11. HSA DNA bólusettir hestar, sama mynd og mynd nr. 9, nema hér er búið að breyta Y ásnum til þess að leggja áherslu á að DNA bólusettu hestarnir eru að svara.

4.3 IgG mótefnaflokkar hjá HSA DNA og prótein bólusettum hestum.

IgG undirflokkar í HSA sérvirku mótefnasvari voru mældir með elísuprófi. DNA bólusettir hestar, Jarpur og Litfari höfðu mjög lág HSA sérvirk mótefni og ekki var hægt að greina mótefnaflokka í svari Litfara og einungis IgG(T) í þynningunni 1/100 hjá Jarpi.

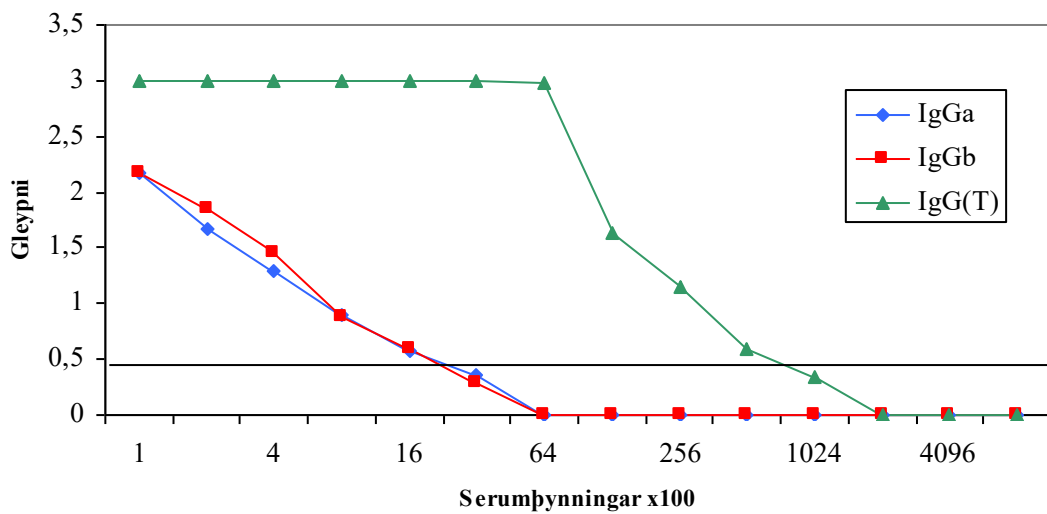
Hjá Tvisti mældust IgG(T) mótefni í þynningunni 1/819200, IgGa í 1/6400 og IgGb í 1/1600. Hjá Reyk mældust IgG(T) mótefni í þynningunni 1/102400, IgGa og IgGb í þynningunni 1/3200. IgGc svar mældist í hvorugum hestanna. Ekki er hægt að segja til um hvort þeir svari ekki með IgGc eða hvort mótefnið sem notað var bindist ekki, þar sem ekki var jákvæður samanburður. Sjá mynd 12 og 13.

Anti HSA IgG mótefnaflokkar Tvistur (v44)



Mynd 12. IgG mótefnaflokkasvar hjá Tvisti í 44. viku.

Anti HSA IgG mótefnaflokkar Reykur (v44)



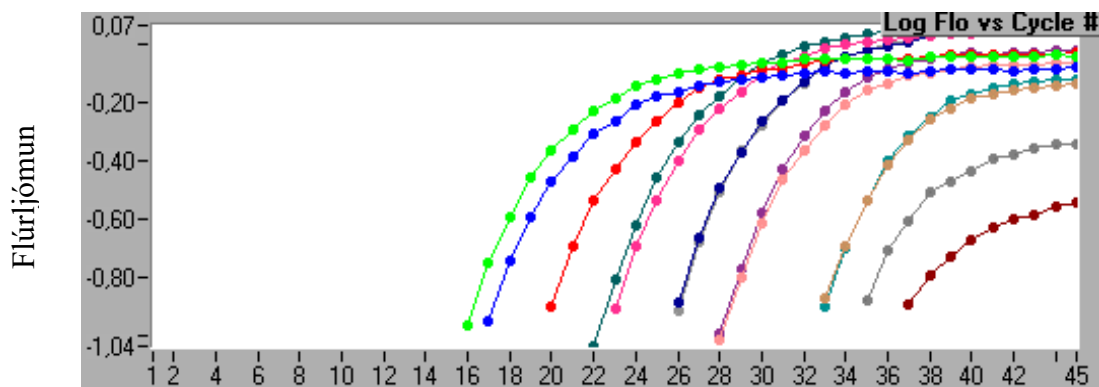
Mynd 13. IgG mótefnaflokkasvar hjá Reyk í 44. viku

4.4 Boðefnamæling í LightCycler

Til þess að geta magnmælt mRNA boðefnanna þurfti að setja upp staðalkúrfur fyrir boðefnin IFN- γ , IL-4 og einnig var gerð staðalkúrfa fyrir β -actin til viðmiðunar. Hlutar úr β -actin geni, IL-4 geni og IFN- γ geni voru klónaðir inn í pUC18 ferju og notað til þess að búa til staðalkúrfur. Settar voru upp staðalkúrfur fyrir boðefnin tvö og β -actin, með stöðlum frá 60 milljón-60 eintök. Mælingar gerðar á tveimur eins sýnum.

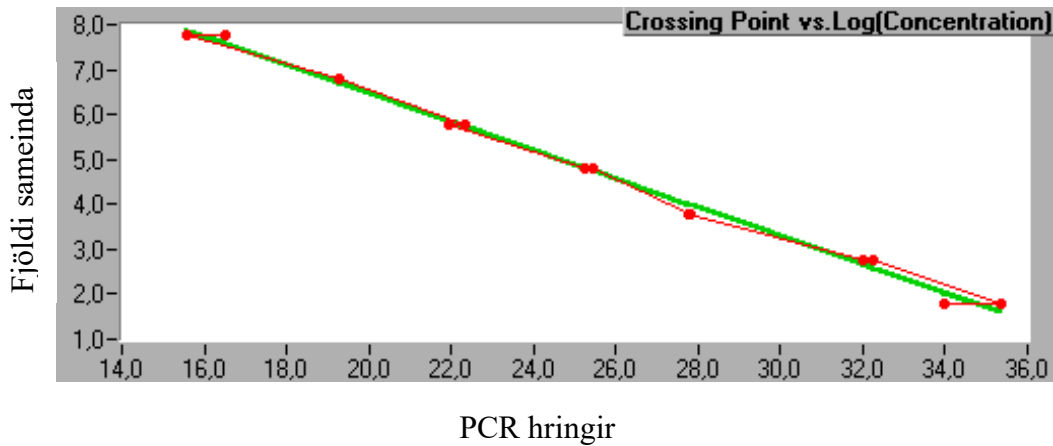
IFN- γ

Gerð var raðþynning á pUC18 með IFN- γ röð, frá 60×10^7 eintökum niður í 60 eintök til þess að fá staðalkúrfu. Staðalkúrfan sýnir að 60×10^7 kemur upp í hring 15. Á mynd 16 sést að staðalferill er línulegur á bilinu 60 eintök upp í 60 milljón eintök ferilinn rís eðlilega í hring 16 hjá IFN- γ og endar í hring 37, með 60 eintök.



Fjöldi hringja í PCR hvarfi

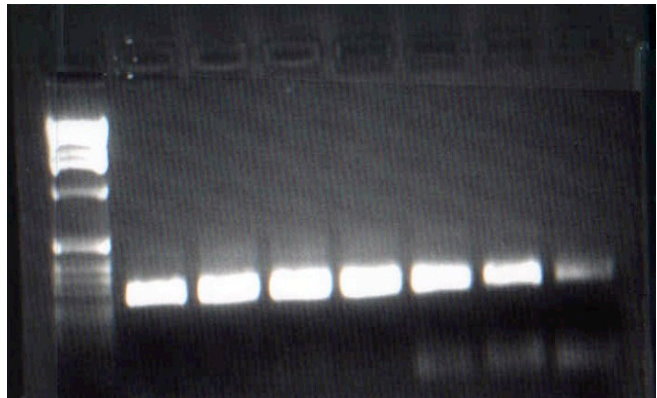
Mynd 14. Magnmæling til þess að setja upp staðalkúrfu fyrir IFN- γ . Notað var PCR með flúrljómunargreiningu á rauntíma með FRET þreifurum. Línuritið sýnir samband styrks flúrljómunar og fjölda hringja.



Mynd 15. Staðalkúrfa til magnákvörðunar á pUC18 sem inniheldur IFN- γ genið. Notað PCR með flúrljómunargreiningu á rauntíma með FRET þreifurum. Samband fjölda sameinda á móti fjölda hringja.

Sýni rafdremin á 1.7% agarósageli til þess að greina hvort böndin séu af réttri stærð, sem þau eru um 269 bp. Sjá mynd 15.

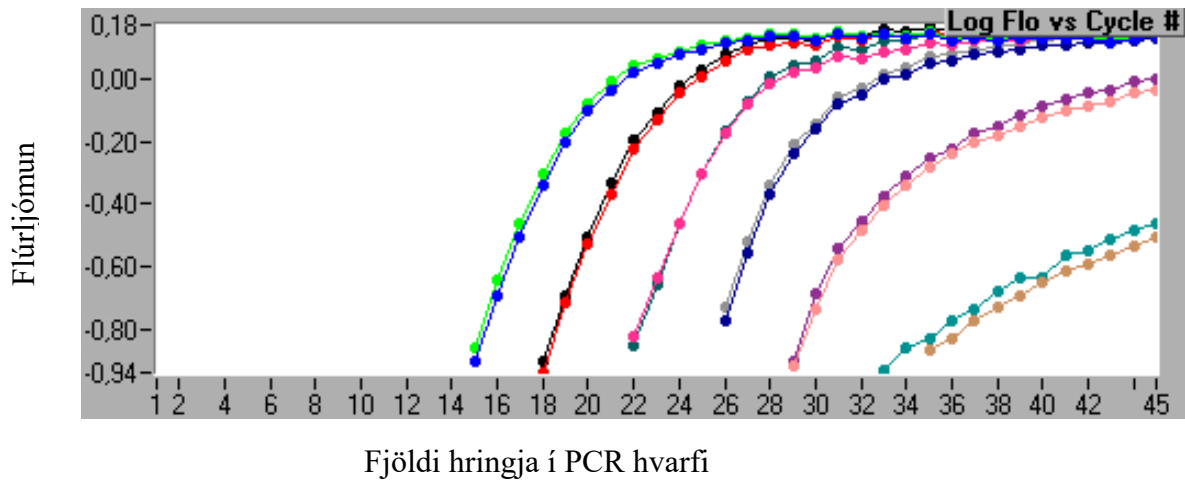
Mynd 16. IFN- γ þynningarröð frá 60×10^7 eintökum niður í 60 eintök, úr LightCycler. Rás 1. stærðarviðmið, rás 2. 10^7 , rás 3. 10^6 , rás 4. 10^5 , rás 5. 10^4 , rás 6. 10^3 , rás 7. 10^2 , rás 8. 10^1 .



β -actin

Gerð var raðþynning á pUC 18 á β -actini, frá 60×10^7 eintökum niður í 60 eintök. Staðalkúrfan sýnir að 60×10^7 kemur upp í hring 16.

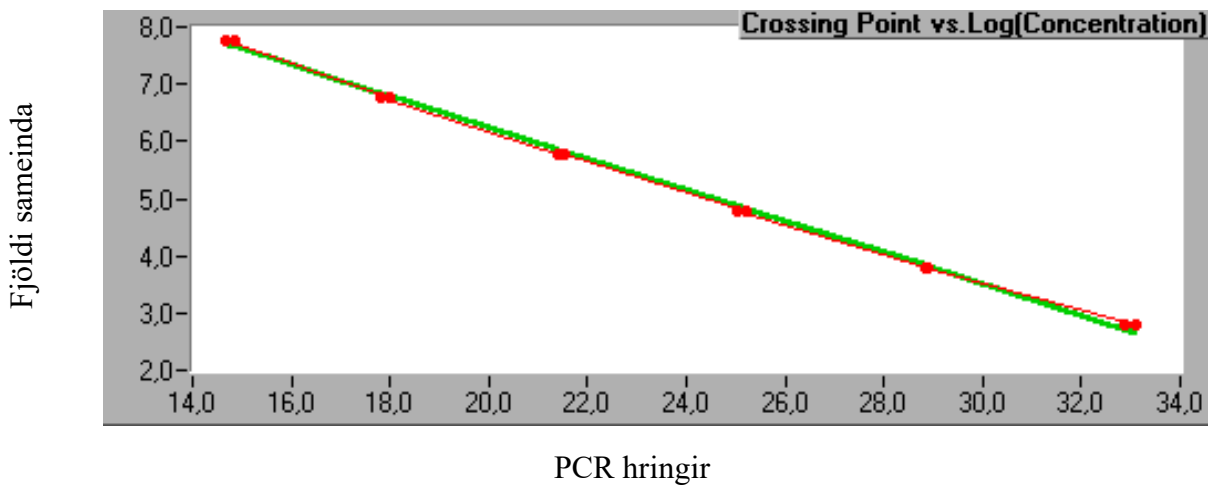
Á mynd 18 sést að staðalferill er línulegur á bilinu 60 eintökum upp í 60 milljón eintök. Ferilinn rís eðlilega í hring 15 hjá β -actini og endar í hring 33, með 60 eintök.



Mynd 17. Magnmæling til þess að setja upp staðalkúrfu fyrir β -actin. Notað var PCR með flúrljómunargreiningu á rauntíma með FRET þreifurum. Línuritið sýnir samband styrks flúrljómunar og fjölda hringja.

Staðalkúrfa fyrir β -actin.

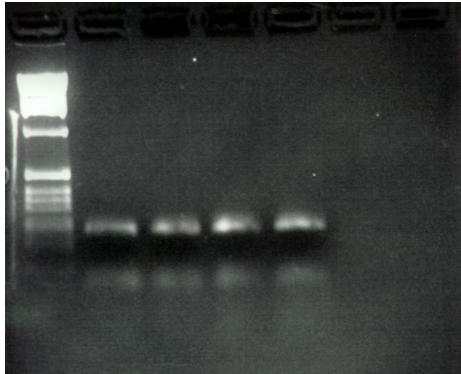
Staðalkúrfan reyndist vera línuleg yfir bilið.



Mynd 18. Staðalkúrfa til magnákvörðunar á pUC18 sem inniheldur β -actin genið. Notað PCR með flúrljómunargreiningu á rauntíma með FRET þreifurum. Samband fjölda sameinda á móti fjölda hringja.

IL-4

Prófuð voru nokkur sett af vísam fyrir IL-4 og voru þau keyrð í hefðbundnu PCR og síðan dregin á geli. Vísarnir sem prófaðir voru virtust ekki hæfa röðinni þar sem alltaf fengust lélegar niðurstöður úr PCR og LightCycler. Af þessum sökum reyndist ekki vera hægt að gera staðalkúrfu fyrir IL-4. Mikið af primer dimers komu við keyrslu í PCR, sjá mynd 19 og mælingar í LightCycler voru mjög lélegar.



5. Umræður

Hjá DNA bólusettum hestum var mjög dauf HSA sérvirk mótefnasvörun, mældist hæst í þynningunni 1/200 í elísuprófi, mótefnasvarið fór lækkandi og var ekki mælanlegt 22 vikum eftir síðustu endurbólusetningu. Þessi lækkun í mótefnasvari er í samræmi við það sem oft hefur verið sýnt fram í öðrum spendýrum en músum (Babiuk, Babiuk et al. 2000). Hestarnir verða því endurbólusettir þegar boðefnamælingaraðferðir eru tilbúnar til þess að greina hvort þeir séu að svara á Th1 eða Th2 braut. Einnig er áætlað að bólusetja með hreinu HSA-próteini til þess að efla ónæmissvörunina og athuga hvort ónæmissvarið haldist á sömu braut eftir endurbólusetningu.

Hestar sem voru bólusettir með HSA-próteini hafa sterk HSA sérvirk mótefni sem auðvelt er að viðhalda með endurbólusetningu. Munur var á mótefnasvörum hjá Tvisti og Reyk og er skýringin trúlega einstaklingsmunur. Í HSA sérvirku mótefnasvari hjá HSA prótein bólusettum hestum var IgG(T) yfirgnæfandi en einnig var öflugt IgGa og IgGb mótefnasvar. Rannsóknir á influensu í hestum sýnir að influensuveiran ræsir Th1 svar sem einkennist af IgGa, IgGb og IgA mótefnasvari, á meðan bólusetning gegn influensu með óvirkri veiru, vekur aðeins IgGc og IgG(T) mótefnasvar og veitir þar af leiðandi ekki góða vörn gegn influensu (Pastoret 1998). Hins vegar hefur verið sýnt fram á með DNA bólusetningu gegn influensu í hestum að sérvirkt mótefnasvar er af gerð IgGa og IgGb sem veitir mun betri vörn. (Lunn, Soboll et al. 1999). Mæling á mótefnaflokkum í elísuprófi sýndi að í prótein bólusettum hestum var IgG(T) ráðandi. Mótefnasvörun hjá DNA-bólusettum hestum var svo lág að ekki er hægt að segja til með hvaða IgG flokkum þeir svöruðu. Lág svörun DNA hestanna í HSA sérvirku elísuprófi gæti verið vegna þess að ferjan sem notuð var inniheldur lítið af CpG röðum. Nú er verið er að flytja genið yfir á nýja ferju sem inniheldur meira af CpG röðum sem hefur reynst vel í músum, mönnum og kúm og verða tveir nýir hestar sprautaðir með henni.

Erfitt reyndist að gera staðalkúrfu fyrir IL-4 í LightCycler. Skýringarnar á því gætu verið að vísar eða þreifarar henti ekki röðinni sem verið var að magna upp. Einnig gæti verið að mikill breytileiki sé til staðar í IL-4 röðinni, að íslenski hesturinn sé ekki með sams konar röð og erlendir hestar sem búið er að raðgreina. Stefnt er að því að raðgreina IL-4 úr íslenskum hestum og finna út frá því hvaða vísar henta best. Þeir vísar sem voru notaðir gáfu mjög mikla primer dimers.

Staðalkúrfur fyrir β -actin og IFN- γ heppnuðust ágætlega, skekkjur sem koma fram eru pípettuskekkjur eða skekkjur vegna blöndunar efna. Áætlað er að mæla boðefni í LightCycler þegar búið er að koma IL-4 í gagnið. Gert er ráð fyrir því að þá sé hægt að meta hvort IL-4 eða IFN- γ sé ríkjandi og með þá vitneskju er hægt að meta hvort hestarnir séu að svara á Th1 eða Th2 braut.

Ekki var hægt að mæla boðefni hjá hestunum þar sem ekki náðist að búa til staðalkúrfur fyrir IL-4, en samanburðurinn felst í því að greina mun milli boðefnanna IFN- γ sem er boðefni á Th1 braut og IL-4 sem er boðefni á Th 2 braut. Gerðar voru nokkrar örvanir og mRNA frumanna mælt í LightCycler en ekki var hægt að nota þær mælingar þar sem staðalkúrfur voru ekki nægilega góðar og því þurfti að gera nýjar staðalkúrfur fyrir IFN- γ og IL-4.

Ekki reyndist unnt að gera þann samanburð sem gera átti á DNA bólusettum hestum annars vegar og próteinbólusettum hestum hins vegar. Mótefnasvar hjá DNA bólusettum hestum var svo lágt að ekki var hægt að mæla IgG flokka hjá þeim. Ekki reyndist nægur tími til þess að staðla boðefnamælingarnar til þess að hægt væri að gera samanburð á boðefnasvari hestanna.

Viðauki I, þynningar fyrir vísa og þreifara

IFN- γ vísar

F3 $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$82,7 \mu\text{M} \times V_1 = 5 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 2,42 \mu\text{l}$$

R3 $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$191,1 \mu\text{M} \times V = 5 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 1,05 \mu\text{l}$$

$$40 \mu\text{l} - 3,47 \mu\text{l} = 36,53 \mu\text{l dH}_2\text{O}$$

β -actin vísar

F2 $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$62,2 \mu\text{M} \times V_1 = 5 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 3,2 \mu\text{l}$$

R1 $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$75,3 \mu\text{M} \times V_1 = 5 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 2,66 \mu\text{l}$$

$$40 \mu\text{l} - 5,86 \mu\text{l} = 34,1 \mu\text{l dH}_2\text{O}$$

IFN- γ þreifarar

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

$$44,2 \mu\text{M} \times V_1 = 2 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 1,81 \mu\text{l}$$

d2: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$108,2 \mu\text{M} \times V_1 = 2 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 0,74 \mu\text{l}$$

$$40 \mu\text{l} - 2,55 \mu\text{l} = 37,45 \mu\text{l dH}_2\text{O}$$

β -actin þreifarar

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

$$28,7 \mu\text{M} \times V_1 = 2 \mu\text{l} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 2,79 \mu\text{l}$$

d2: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$202,5 \mu\text{M} \times V_1 = 2 \mu\text{l} \times 40 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 0,39 \mu\text{l}$$

$$40 \mu\text{l} - 3,19 \mu\text{l} = 37,45 \mu\text{l dH}_2\text{O}$$

Þynningar fyrir KlenTaq fjölíðara

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

$$25 \text{ U} / \mu\text{l} \times V_1 = 0,8 \text{ U} / \mu\text{l} \times 25 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 0,8 \mu\text{l}$$

$$25 \mu\text{l} - 0,8 \mu\text{l} = 24,2 \mu\text{l. Ensím diluted}$$

Viðauki II, efni til gleypnimælinga á DNA og þynningar á DNA

TNE buffer (Tris natrium clórið EDTA)

10 mM Tris-HCl pH 7,4

100mM NaCl

1mM EDTA

CAS B

5 µl H33258 stock

25 µl 10 x TNE buffer

220 µl H₂O

TLE buffer (Tris Low buffer)

0,1mM EDTA

1mM Tris

DEPC vatn

0,2% diethylpyrocarbonate

autoclaverað

Æti fyrir ræktun

Dulbecco's MEM, (DMEM) cat. nr. 10938-025 GIBCO BRL.

Út í 500 ml æti er bætt 3 ml 100 IU / ml penicillin og 100 IU / ml streptomycin, 5 ml af 5 mM glutamin.

10% Fetal Calf serum (FCS) blandað með því að nota 90 ml DMEM +10 ml FCS.

Viðauki III, blóðtökur og bólusetningar

HSA prótein bólusettir hestar, Tvistur og Reykur

30.okt.	2000	vika 0	kontról blóð og 1. bólusetning
8. nóv.		vika 1	blóðtaka
15. nóv.		vika 2	blóðtaka
22. nóv.		vika 3	blóðtaka og 2. bólusetning
29. nóv.		vika 4	blóðtaka
6. des.		vika 5	blóðtaka
13. des.		vika 6	blóðtaka og 3. bólusetning
20. des.		vika 7	blóðtaka
27. des.		vika 8	blóðtaka
6. feb.	2001	vika 13	húðpróf (eftir 4 klst)
7. feb.			húðpróf (eftir 24 klst.)
14.feb.		vika 14	blóðtaka
28. feb.		vika 16	blóðtaka
15. mars		vika 18	blóðtaka
6. júní		vika 30	blóðtaka
27.ágú.		vika 42	4. bólusetning
11. sept.		vika 44	blóð og ormalyfsgjöf

Viðauki III, blóðtökur og bólusetningar (frh)

HSA DNA bólusettir hestar, Jarpur og Litfari.

29. nóv.	2000	vika 0	kontról blóð og 1. bólusetning
6. des.		vika 1	blóðtaka
14. des.		vika 2	blóðtaka
20. des.		vika 3	blóðtaka og 2. bólusetning
27. des.		vika 4	blóðtaka
17. jan	2001	vika 7	blóðtaka og 3. bólusetning
31. jan.		vika 9	blóðtaka
7. feb.		vika 10	blóðtaka
14. feb.		vika 11	blóðtaka og 4. bólusetning
28. feb.		vika 13	blóðtaka
9. mars		vika 14	blóðtaka og 5. bólusetning
15. mars		vika 15	blóðtaka
10. apríl		vika 19	6. bólusetning
18. apríl		vika 20	blóðtaka
6. júní		vika 27	blóðtaka
11. sept.		vika 41	blóðtaka og ormalyf

Viðauki IV, vísar og þreifarar

IFN-gamma vísar og þreifarar

IFN- γ	Röð	Lengd	Tm	% GC
F3 framvísir	GCCAAATCGTCTCCTTCTAC	20	57,3	50,0
R456 bakvísir	AAACGGATTCTGACTCCTCTTC	22	58,9	45,5
Gjafapreifari	TCATCAAAGTGATGAATGATCTGTCGG	27	61,9	40,7
Þegapreifari	CCA AAG CTA ACC TGA GGA AGC G	22	62,1	54,5

β - actin vísar og þreifarar

β -Actin	Röð	Lengd	Tm	% GC
Afturvísir	CATTGTCCACCTTCCAGCAG	20	61,7	55,0
Framvísir	GAGAGGGAAATCGTGCGTG	19	61,8	57,9
Þegapreifari	GGATCGGCGGCTCCATTC	18	66,3	66,7
Gjafapreifari	CCCTGAGCGCAAGTACTCCGTA	23	64,2	56,5

Viðauki V, efni fyrir elísupróf

PBS-T

Notuð til sermis og konjugat-þynninga. Geymt í kæli.

5x PBS töflur

1L eimað vatn

500µl Tween (0.05%)

Þvottadúi

PBS 5x, pH 7.2-7.4 með 0.05% Tween 20. Geymt í kæli.

5x stokklausn

250g NaCl

6.25g KH₂PO₄

89.5g Na₂NPO₄

6.25g KCl

1x vinnulausn

400ml 5x þvottadúi

1600ml H₂O

1.0ml Tween 20

Þekjudúi

1L dH₂O

1.59g Na₂CO₃

2.93g NaHCO₃

Lausnin geymd í frysti til langs tíma en í kæli í styttri tíma.

Hvarfefnalausn

12 ml. eimað vatn + 4 litlausar OPD (1,2 phenylendi-amin dihydroklorid, 2 mg stk, Dakopatts cat no. S2045). Lausnin er hrist í myrkri (OPD er ljósnæmt) í nokkrar mín.

5 µl af H₂O₂ (0,04 %) bætt út í rétt áður en lausnin er notuð.

Lausn geymd í frysti í lengri tíma en í kæli í stuttan tíma.

Þakkir

Ég vil þakka eftirtöldum:

Sigurbjörgu Þorsteinsdóttur leiðbeinanda fyrir spennandi verkefni, góða leiðsögn og ótrúlega þolinmæði.

Ólafi Andrésyni leiðbeinanda fyrir ýmsa hjálp við verkefnið, aðallega við sameindahluta þess og erfiðleika við LightCycler.

Bjarka Guðmundssyni sameindalíffræðingi fyrir kennsluna á LightCycler og allan stuðninginn þegar tilraunirnar gengu ekki eins vel og vonast var eftir.

Guðmundi Péturssyni fyrir yfirlestur.

Þór Steinarssyni deildastjóra fyrir gott nám við Meinataeknadeild í Tækniskóla Íslands.

Einnig vil ég þakka:

Benný, Helgu Bryndísi, Birki, Bryndísi, Írisi, Björgu, Agnesi, Alfonsi, Viktori, Snorra, Vilhjálm, Stefáni og Gumma fyrir ýmsa aðstoð og ekki síst hvatningu.

5 Heimildarskrá

Babiuk, L. A., S. L. Babiuk, et al. (2000). **Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality.** Vet Immunol Immunopathol 76(1-2): 1-23.

Björnsdóttir, S. (2001). **Ormasýkingar í hrossum.** Eiðfaxi 3: 34-35.

Caplin, B. E., Rasmussen, R.P, Bernard, P.S, Wittwer, C.T. (1999). **The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection.** Biochemica 1: 5-8.

Grunig, G., A. Himmler, et al. (1994). **Cloning and sequencing of horse interferon-gamma cDNA.** Immunogenetics 39(6): 448-9.

Gurunathan, S., D. M. Klinman, et al. (2000). **DNA vaccines: immunology, application, and optimization.** Annu Rev Immunol 18: 927-74.

Halldorsdottir, S. and H. J. Larsen (1991). **An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway.** Equine Vet J 23(4): 296-9.

Holmes, M. A. (1991). **The epidemiology and possible MHC linkage of culicoides hypersensitivity.** Equine Vet J 23(4): 239-40.

Landt O., N. A. (1999). **Selection of Hybridization Probe Sequences for Use with the LightCycler.** Roche Molecular Biochemicals 6: 1-8.

Lee, D. J., M. Corr, et al. (1998). **Control of immune responses by gene immunization.** Ann Med 30(5): 460-8.

Lunn, D. P., G. Soboll, et al. (1999). **Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene.** Vaccine 17(18): 2245-58.

Nilsen, K. (1984). **Kompendium i intern medicin.** A/S Carl Fr. Mortensen. København: 7-58.

Pastoret, P. P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (1998). **Immunology of Horses and Donkeys.** Handbook of Vertebrate Immunology. A. P. Limited. Great Britain: 343-371.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., Ed. (2001). **Introduction to the immune system. Immunology.** London, Mosby.

Tighe, H., M. Corr, et al. (1998). **Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint.** Immunol Today 19(2): 89-97.

Vandergriff, E. V. and D. W. Horohov (1993). **Molecular cloning and expression of equine interleukin 2.** Vet Immunol Immunopathol 39(4): 395-406.

Vandergriff, E. V., C. E. Swiderski, et al. (1994). **Molecular cloning and sequencing of equine interleukin 4.** Vet Immunol Immunopathol 40(4): 379-84.

Wittwer, C. T., K. M. Ririe, et al. (1997). **The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control.** Biotechniques 22(1): 176-181.