

Olga Jänisniemi

Solubiabiliteetin mittausmenetelmän käyttöönotto

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

1.12.2019

Tekijä(t) Otsikko	Olga Jänisniemi Soluviabiliteetin mittaamenetelmän käyttöönotto
Sivumäärä Aika	23 sivua + 1 liite 1.12.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Veera Westenius Lehtori Jarmo Palm
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Virusinfektioyksikössä. Vakavia virusinfektioita tutkivassa tutkimusryhmässä oli jo pitkään ollut tarve aiempaa nopeammalle ja yksinkertaisemmalle, edulliselle antiviraaliaineiden toimivuuden testausmenetelmälle, jota hyödyntämällä voitaisiin lyhentää työskentelyaikaa vahvojen henkilösuojaimien käyttöä vaativassa BSL-3-laboratoriossa. Lisäksi haluttiin tulosten olevan riippumattomia työntekijän subjektiivisesta tulkinnasta, toisin kuin mikroskopointiin perustuvissa menetelmissä.</p> <p>Käyttöön otettavaksi valittiin Thermo Fisherin tuotevalikoimaan kuuluva PrestoBlue-reagenssi, joka mittaa soluviabiliteettia resatsuriinin pelkistysreaktion avulla. Elävät, metaboliisesti aktiiviset solut pelkistävät sinisen resatsuriinin aniliininpunaiseksi resorufiiniksi – värinmuutos on sitä voimakkaampi, mitä enemmän eläviä soluja näyte sisältää. Reagenssin käyttö ja tulosten tulkinta on yksinkertaista: käyttövalmista liuosta annostellaan soluille ja inkuboinnin jälkeen kuoppalevyille tehdään absorbanssimittaus kahdella aallonpituudella. Mittaustulosten pohjalta lasketaan korjattu absorbanssi, joka on sitä korkeampi, mitä parempi solujen viabiliteetti on.</p> <p>Reagenssia testattiin eri influenssaviruksilla infektoiduilla solulinjoilla ja makrofageilla. Osalla solulinjoista reagenssia ei saatu lainkaan toimimaan valmistajan kuvaamalla tavalla, vaan voimakkain värinmuutosreaktio ja korkeimmat absorbanssiarvot mitattiin toistuvasti voimakkaimmin infektoiduista kuoppalevyn kuopista. Yhdellä solulinjalla saatiin alustavasti oikeansuuntaisia tuloksia, mutta jatkotestaukseen ei tämän opinnäytetyön puitteissa jäänyt aikaa. Odottamattomien tulosten syytä yritettiin selvittää sulkemalla pois mahdollisia virhelähteitä, kuten solujen kasvatuksessa käytetyn ravintoliuoksen ainesosien vaikutusta resatsuriinin pelkistysreaktioon. Makrofageilla reagenssi toimi valmistajan ilmoittamalla tavalla, mutta niiden haittapuolena on ylläpidon työläisyys ja kalleus.</p> <p>Syytä reagenssin odotetusta poikkeavalle toiminnalle ei tämän opinnäytetyön puitteissa pystytty osoittamaan, mutta sen arveltiin mahdollisesti liittyvän jonkinlaiseen solun ja viruksen yhteisvaikutukseen. Lopputulemana joka tapauksessa oli, ettei uutta soluviabiliteetin mittaamenetelmää saatu käyttöön.</p>	
Avainsanat	Soluviabiliteetti, resatsuriini, PrestoBlue

Author(s) Title	Olga Jänisniemi Implementing a Cell Viability Assay
Number of Pages Date	23 pages + 1 appendix 1 December 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Veera Westenius, Senior Researcher Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>This study was carried out at the Finnish Institute for Health and Welfare (THL). In the research group studying serious viral infections, there was a need for a faster, simpler and more cost-effective way to test antiviral agent function that would allow for shorter working times in the Biosafety level 3 laboratory which requires extensive biocontainment precautions. Another requirement for the new method was that the results obtained through it should be independent of subjective interpretation by the laboratory worker, unlike with methods based on microscopy.</p> <p>For these testing purposes PrestoBlue Cell Viability Reagent, manufactured by Thermo Fisher Scientific, was selected. The active ingredient, resazurin, is a redox indicator that changes color in the reducing environment created by viable cells. Metabolically active cells reduce the blue resazurin into pink resorufin – the higher the number of viable cells in the sample, the stronger the color change. The use of the reagent is straightforward, and the results are easy to interpret: PrestoBlue solution is added to the cells and, after incubation, absorbance measurements are carried out at two wavelengths. Measurement data is then used to calculate corrected absorbance, which is the higher the more viable cells the sample contains.</p> <p>The reagent was tested on cell lines and macrophages infected with different influenza viruses. With some of the cell lines, the reagent did not function at all as described by the manufacturer, with the strongest change in color and highest absorbance measurements repeatedly observed in wells with most infected cells. Promising results were obtained with one cell line, but further testing could not be carried out within the frame of this study. The cause for the unexpected results was sought by ruling out possible sources of error, for example the influence of cell media ingredients on the redox reaction. With macrophages, the reagent worked as expected, but maintaining this type of cell is troublesome and expensive.</p> <p>The reason for the unexpected results when using the reagent could not be determined within the frame of this study, but it was believed to possibly be connected with some kind of a joint effect of cell and virus. In any case, the outcome was that a new cell viability assay was not brought into use.</p>	
Keywords	Cell viability assay, resazurin, PrestoBlue

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	1
2.1	Influenssavirukset	1
2.1.1	Sytopaattinen efekti (CPE)	2
2.2	Influenssatutkimuksessa käytettävät solumallit	3
2.3	Solujen viabiliteettimääritykset	4
2.3.1	Visuaaliseen tulkintaan perustuvat menetelmät	4
2.3.2	Solumentabolian muutoksiin perustuvat menetelmät	5
2.3.3	Solukalvon läpäisevyyteen perustuvat menetelmät	8
2.4	qPCR ja suhteellinen geeniekspressio	8
3	Työn suoritus	9
3.1	Solujen kasvatus	9
3.2	Infektio	10
3.3	PrestoBlue -viabiliteettimääritys	11
3.4	Pelkistysreaktioon vaikuttavien tekijöiden poissulkeminen	12
3.4.1	Kasvatusmedian supplementit ja TPCK-trypsiini	12
3.4.2	Viruskantaliuoksen mikrobikontaminaatio	12
3.4.3	Viruskannat	12
3.5	cDNA-synteesi ja qPCR	13
4	Tulokset	13
4.1	PrestoBluen toiminta eri soluissa	13
4.2	Korjattu absorbanssi	19
4.3	Suhteellinen geeniekspressio	19
5	Pohdinta	20
	Lähteet	22
	Liite 1. qPCR-ajon tulokset	

Lyhenteet

A-549	Ihmisen keuhkojen karsinoomasoluista johdettu solulinja.
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> . Adenosiinitrifosfaatti, runsasenerginen yhdiste, jolla on tärkeä rooli solun energiataloudessa.
BSL-3	<i>Bio Safety Level 3</i> . Bioturvataso 3, laboratorion turvaluokitus.
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementaarinen DNA.
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> , kultahamsterin munuaissolulinja.
CPE	<i>Cytopathic effect</i> , sytopaattinen efekti.
Ct-arvo	<i>Cycle threshold-value</i> . Kynnysarvo, se PCR-sykli, jonka aikana PCR-tuotteen fluoresenssi ylittää taustan.
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> . Dimetyylisulfoksidi, solujen pakastamisessa käytetty lisäaine.
DNA	<i>Deoxiribonucleic acid</i> . Deoksiribonukleiinihappo, sisältää eliöiden solujen geneettisen materiaalin.
E-MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> , soluviljelyssä käytettävä ravintoliuos.
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , vasikan sikiön seerumi.
HEPES	Soluviljelyssä käytettävä puskuriliuos.
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney epithelial cell</i> , Madin-Darby koiran munuaissolulinja.
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i> , koronaviruksen aiheuttama erittäin vakava hengitystieinfektio.

MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , viruspartikkelien ja kohdesolujen määrän suhde.
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , lähetti-RNA.
MTT, XTT	Kolorimetrisesti tulkittavissa solujen viabiliteettimääritysmenetelmissä käytettäviä tetratsolijyhdisteitä.
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> , perifeerisen veren mononukleaarisolut.
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio.
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> . Ribonukleiinihappo, sisältää RNA-virusten geneettisen materiaalin.
TCID50	<i>50 % cell culture infectious dose</i> . Virusannos, joka riittää infektoimaan 50 % inokuloituista soluviljelmistä.
THL	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos
VERO E6	Vihermarakatin (<i>Chlorocebus aethiops</i>) munuais kudoksesta johdettu solulinja.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Virusinfektiot-yksikössä (nykyään osa Asiantuntijamikrobiologiayksikköä), vakavia virusinfektioita (esimerkiksi lintuinfluenssa- ja zikavirusinfektiot) tutkivassa tutkimusryhmässä. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön aiempaa nopeampi, helppokäyttöinen ja kohtuuhintainen sytopaattiseen efektiin (CPE) perustuva antiviraaliaineiden toimivuuden testausmenetelmä, jonka tulokset eivät ole riippuvaisia työntekijän subjektiivisesta tulkinnasta (vrt. mikroskopointi). Mikäli menetelmä osoittautuisi toimivaksi, se toisi helpotuksia bioturvaston 3 (BSL-3) laboratoriossa työskentelyyn ja mahdollistaisi pandemiatapauksissa antiviraalisten aineiden nopean testauksen.

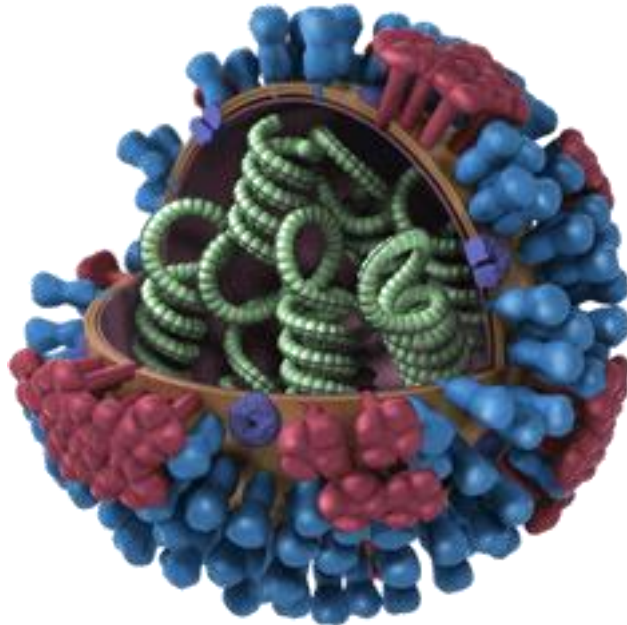
Viabiliteettimäärytyksiin kehitetty, resatsuriinipohjainen PrestoBlue-reagenssi (Thermo Fisher) valittiin, koska sen käyttö vaikutti helpolta, tuote oli edullinen ja menetelmän vaatimat laitteet olivat THL:n BSL-3-laboratoriossa valmiina. Reagenssin toiminta perustuu elävien, metabolisesti aktiivisten solujen kykyyn pelkistää sininen resatsuriini punaiseksi resorufiiniksi. Värireaktion voimakkuutta mitataan spektrofotometrisesti kahden absorptionsarvon A_{570} ja A_{600} muutoksena. Reagenssia testattiin eri influenssaviruksilla infektoiduissa solulinjoissa ja primäärisoluissa.

2 Teoria

2.1 Influenssavirukset

Influenssavirukset ovat vaipallisia, helikaalisia ortomyksovirusia (kuva 1). Pallomaiset tai soikeat, halkaisijaltaan 100–140 nm:n kokoiset virukset voidaan nähdä suoraan vain elektronimikroskoopilla. Influenssaviruksen genomi on virustyyppistä riippuen kooltaan noin 12 900–14 600 nukleotidia. Se muodostuu yksisäikeisestä, jaokkeisesta RNA:sta, jolla on mRNA:han nähden negatiivinen polariteetti (= negatiivisäikeinen). Influenssa A -virusten genomi on kahdeksanjaokkeinen. Genomi ei ole sellaisenaan infektiivistä, koska se ei voi suoraan toimia mRNA:na. Influenssavirusten neuraminidaasi-rakenneproteiineilla on osoitettu olevan entsymaattisia tehtäviä. [1, s. 450, 452, 458, 464.]

A- ja B-influenssavirukset saavat ihmisessä aikaan kuumeisen, usein rajun hengitysteiden infektioaudin [1, s. 470]. Ne aiheuttavat vuosittain epidemioita ja toisinaan myös pandemioita.

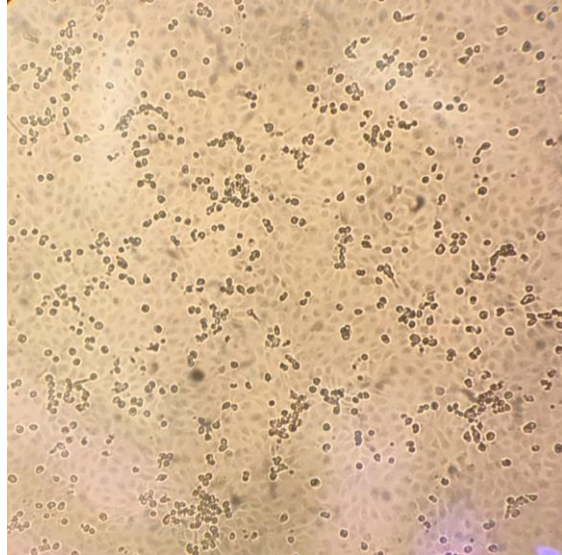


Kuva 1. Influenssaviruksen rakenne [2].

2.1.1 Sytopaattinen efekti (CPE)

Monilla viruksilla on kyky vahingoittaa infektoimiaan soluja. Virusinfektion aiheuttamia muutoksia solun morfologiassa kutsutaan sytopaattiseksi efektiksi, josta käytetään lyhennettä CPE [3]. Käsitettä ei pidä sekoittaa samalla lyhenteellä tunnettaviin karbapenemaasia tuottaviin enterobakteereihin [4]. Soluviljelmissä CPE:n on todettu liittyvän influenssavirusten permissiivisissä soluissa aiheuttamaan DNA:n fragmentoitumiseen ja ilmenevän 3–6 tunnin kuluessa infektiosta [5]. Muutokset voivat ilmetä mm. solun pyörityksenä, vierekkäisten solujen yhteenliittymisenä tai tumaan tai sytoplasmaan muodostuvina rakenteina, ns. inklusiobodeina, ja ne on helppo havaita valomikroskoopilla (kuva 2) [3]. Sytopaattisen efektin katsotaan usein johtuvan siitä, että virus kaappaa solun aineenvaihduntajärjestelmän omaan käyttöönsä. Nykyään on kuitenkin saatu näyttöä siitä, ettei CPE ole suoraan seurausta viruksen monistumisesta vaan saattaa pikemmin-

kin liittyä isäntäsolun puolustusmekanismeihin ja viruksen niihin kohdistamiin vastamekanismeihin, jotka johtavat nekroosiin, apoptoosiin ja mahdollisesti myös muunlaiseen solun itsemurhaan. Lopputulos riippuu niin isäntäsoluun, virukseen kuin ympäristöönkin liittyvistä tekijöistä. [6.]



Kuva 2. Sytopaattinen efekti valomikroskoopilla havainnoituna. Influenssaviruksella infektoidussa MDCK-soluviljelmässä kuolleet solut näkyvät tummina ja pyörityneinä.

2.2 Influenssatutkimuksessa käytettävät solumallit

Influenssatutkimuksessa on käytetty useita solumalleja, joista tässä työssä käytettiin MDCK-, VERO E6- ja A-549-solulinjoja sekä monosyyttijohdannaisia makrofageja.

- MDCK-solut (Madin-Darby Canine Kidney cells) ovat koiran terveestä munuaiskudoksesta eristettyjä adherenteja epiteelisoluja [7].
- VERO E6 -solut ovat apinan terveestä munuaiskudoksesta eristettyjä adherenteja epiteelisoluja [8].
- A-549 -solut ovat ihmisen keuhkosta eristettyjä karsinomasoluja [9].
- Monosyyttijohdannaiset makrofagit (moM ϕ) ovat PBMC:sta (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) erotelluista monosyyteistä erilaistettuja makrofageja. Kolmesta ensin luetellusta solulinjasta poiketen nämä ovat ihmisen primäärisoluja [13].

2.3 Solujen viabiliteettimääritykset

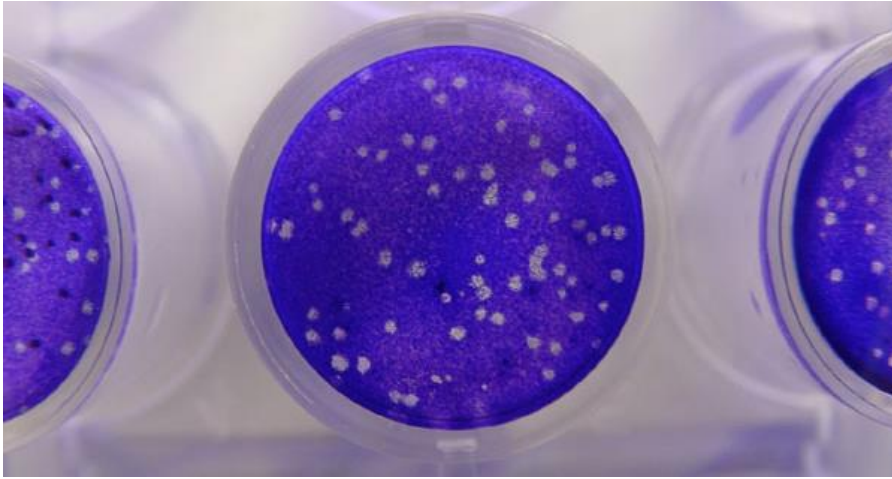
Diagnostisten testien, viruslääkkeiden ja rokotteiden kehittämiseksi on oltava käytössä tarkkoja, spesifisiä ja nopeita keinoja tunnistaa viruksia ja määrittää niiden pitoisuuksia. Koska viruksia ei erittäin pienen kokonsa vuoksi pystytä havaitsemaan valomikroskopiolla, tutkimuksissa niiden määrää ja toimintaa tarkastellaan solumallien avulla.

Viabiliteettimääritys voi perustua visuaaliseen havainnointiin, solumetabolian muutoksiin ja solujen värjäytymiseen. Usein käytetään virusten aiheuttaman sytopaattisen efektin visuaaliseen havainnointiin perustuvia menetelmiä – plakkititrausta ja TCID50-määrittystä – mutta niiden heikkoutena on työläys ja tulosten subjektiivisuus. Etenkin viime vuosina on tehty paljon tutkimustyötä kolorimetrisesti tai fluorometrisesti tulkittavien, solumallien käyttöön perustuvien viruslääkkeiden testausmenetelmien kehittämiseksi. [10; 11.]

2.3.1 Visuaaliseen tulkintaan perustuvat menetelmät

Mikroskopointiin perustuvalla TCID50-menetelmällä (*50 % cell culture infectious dose*) määritetään virusannos, joka riittää infektoimaan 50 % altistetuista soluviljelmistä. Viruksesta valmistetaan laimennossarja, jolla soluviljelmät infektoidaan. Inkuboinnin jälkeen soluviljelmistä etsitään mikroskoopilla infektion aiheuttamia sytopaattisia muutoksia. Tuloksen pohjalta määritetään matemaattisesti TCID50-arvo eli virustitteri. [12, s. 23.]

Plakkititrausta voidaan käyttää kaikkien plakkeja – reikiä tai tietynlaisia muutoksia - soluviljelmään muodostavien virusten konsentraation määrittämiseen. Se voidaan suorittaa esimerkiksi siten, että soluviljelmät inokuloidaan erivahvaisilla viruslaimennoksilla ja solujen päälle lisätään reagenssi, joka estää virusten sattumanvaraisen leviämisen niiden vapautuessa infektoituneesta solusta. Tällöin infektoituneesta solusta vapautuva virus pääsee leviämään ainoastaan viereisiin soluihin, ja plakin voidaan katsoa syntyneen yhdestä ainoasta infektiivisestä partikkelista [13]. Inkuboinnin jälkeen lasketaan plakit. Jos on käytetty kiinteää peiteainetta (yleensä agar), plakit lasketaan sen läpi. Mikäli on käytetty poistettavaa peiteainetta, solut kiinnitetään ja pestään, jolloin infektoituneet ja alustastaan irronneet solut huuhtoutuvat pois. Solut värjätään kristallivioletilla ($C_{25}H_{30}N_3Cl$, heksametyylipararosaniliinikloridi) ja värjäytymättömät alueet, plakit, lasketaan (kuva 3). Näytteen viruskonsentraatio ilmoitetaan yksikössä pfu/ml (*plaque forming units*). [12, s. 23; 14; 15.]



Kuva 3. Tulkintavalmis plakkititrausnäyte [16].

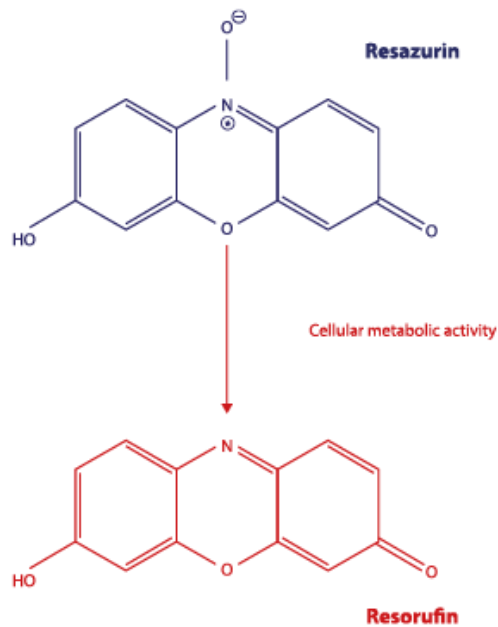
THL:n virusinfektioyksikön käyttämällä plakkititrausmenetelmällä tuloksia saadaan noin viikossa, eli menetelmä ei ole erityisen nopea. Virusten aiheuttaman sytopaattisen efektin visuaaliseen havainnointiin perustuvien menetelmien heikkoutena on myös työläys ja tulosten subjektiivisuus. [11; 15.]

2.3.2 Solumetabolian muutoksiin perustuvat menetelmät

Solumetabolian muutoksiin perustuvissa menetelmissä mitataan elävien solujen lukumäärään liittyvän markkerin aktiivisuutta. Osa menetelmistä perustuu elävien solujen kykyyn pelkistää yhdisteitä. Tällaisia ovat mm. tetratsolijyhdisteiden (esim. MTT ja XTT) ja resatsuriinin pelkistymiseen perustuvat menetelmät, joissa syntyy värillinen ja/tai fluoresoiva tuote, jonka pitoisuutta mitataan spektrofotometrisesti. Soluviljelmää inkuboidaan reagenssin kanssa, ja pelkistysreaktion tuotteen määrä on suoraan verrannollinen elävien solujen määrään – kuolleilla soluilla pelkistämiskykyä ei ole. [17.]

MTT- ja XTT-määrittelyksissä väritön tetratsoli ($\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_4$) pelkistyy purppuranpunaiseksi formatsaaniksi, jonka pitoisuus määritetään absorbanssimittauksella (A_{570}). MTT:n tapauksessa formatsaani saostuu solun sisään, josta se pitää saattaa liukoiseen muotoon ennen mittausta. Tämän lisäksi yhdiste on sytotoksinen, mikä asettaa rajoitteita inkubointiajan pituudelle. Uudemman XTT:n pelkistysreaktiossa muodostuva formatsaani on valmiiksi vesiliukoisessa muodossa. [17.]

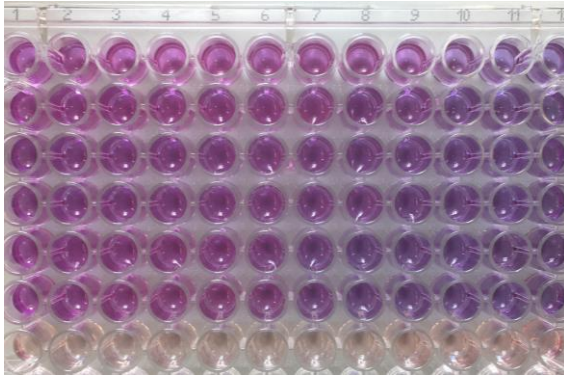
Edellä mainittuja jonkin verran herkempi on resatsuriinin ($C_{12}H_7NO_4$) pelkistymiseen perustuva menetelmä (kuva 4). Resatsuriini on myrkytön, solukalvon läpäisevä sininen väriaine, jonka elävät solut pelkistävät aniliinipunaiseksi, fluoresoivaksi resorufiiniksi. Mitä enemmän näytteessä on eläviä soluja, sitä voimakkaampi värireaktio on. Resorufiinin pitoisuus määritetään joko fluoresenssi- tai absorbanssimittauksella, joista ensin mainittua käytetään useammin sen paremman herkkyyden vuoksi. [17.] Resatsuriinireagensseja on saatavana useilta valmistajilta niin jauheena kuin valmiina liuoksenakin. Uusimpien resatsuriinireagenssien kohdalla inkubointiaikaa on tuotekehityksen keinoin saatu lyhennettyä.



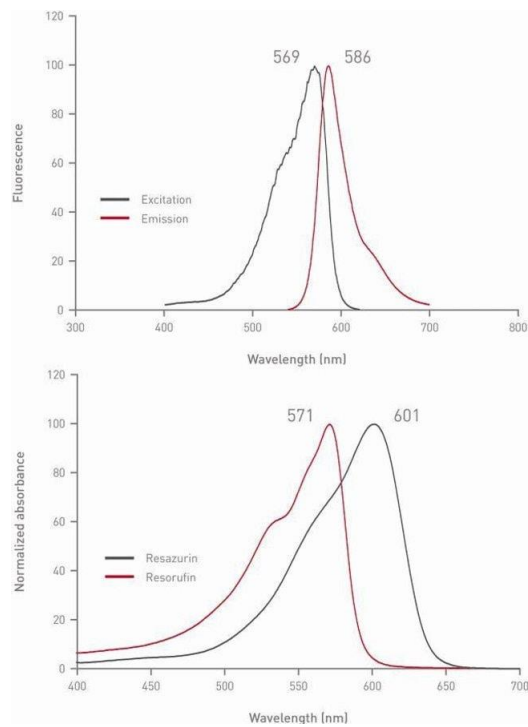
Kuva 4. Resatsuriinin pelkistysreaktio [18].

Tässä työssä käytettiin Thermo Fisherin tuotetta PrestoBlue Cell Viability Reagent. Reagenssia pipetoidaan suoraan soluille suhteessa 1:10, minkä jälkeen soluja inkuboidaan 37 °C:ssa 10 min–2 h. Inkubointiajan pidentäminen yleensä parantaa menetelmän herkkyyttä, mutta optimaalinen aika on aina määritettävä tapauskohtaisesti kulloinkin käytettävien solujen mukaan.

Metabolisesti aktiivisten solujen aikaansaama värinmuutos on silmin havaittava (kuva 5), mutta numeerinen arvo saadaan tekemällä fluoresenssi- tai absorbanssimittaus. Valmistaja suosittelee fluoresenssimittausta paremman herkkyyden vuoksi. Fluoresenssimittaus tehdään aallonpituuksilla 560 nm ja 590 nm, absorbanssimittaus aallonpituuksilla 570 nm ja 600 nm (kuva 6). Molemmilla mittaustavoilla saadaan sitä korkeampia arvoja, mitä enemmän näytteessä on metabolisesti aktiivisia soluja.



Kuva 5. PrestoBlue-reagenssin värinmuutosreaktio kuoppalevyllä.



Kuva 6. Resatsuriinin ja resorufiinin fluoresenssi- ja absorptiospektrit [19].

Solujen kasvatusta on mahdollista jatkaa vielä PrestoBlue-käsittelyn jälkeen; silloin reagenssi poistetaan kuopista ja vaihdetaan tuoreeseen solumediaan.

Solujen viabiliteettia voidaan tutkia myös ATP:ta mittaamalla. ATP:lla on merkittävä rooli solun energiataloudessa, minkä vuoksi sitä pidetään luotettavana indikaattorina metabolisesti aktiivisista soluista. Solukalvon rikkoutuessa ATP-synteesi pysähtyy ja solun omat ATPaasientsyymit hajottavat sytoplasmassa jäljellä olevan ATP:n. ATP:n mittaamiseen on perinteisesti käytetty kiiltomadosta eristettyä lusiferaasientsyymiä, josta on sittemmin kehitelty stabiilimpia muotoja. ATP:n mittaamiseen käytettävä reagenssi sisältää solukalvon rikkovaa detergenttiä, soluista vapautuvaa ATP:ta stabiloivaa ATPaasi-inhibiittoria, substraatti lusiferiiniä sekä luminesenssireaktion katalysoivaa lusiferaasia. Reaktion voimakkuutta mitataan luminometrillä. ATP-menetelmä on erittäin herkkä – sillä voidaan havaita alle kymmenenkin metabolisesti aktiivista solua – ja nopea, koska inkubointivaihetta ei tarvita. Solut rikkoutuvat välittömästi reagenssin lisäämisen jälkeen, ja luminesenssisignaali vakiintuu 10 minuutissa. [17.] Kääntöpuolena on menetelmän kalleus: 96-kuoppalevyn käsittely luminesenssireagenssilla tulee noin 25 kertaa kalliimmaksi verrattuna esimerkiksi resatsuriinireagenssin käyttöön.

2.3.3 Solukalvon läpäisevyyteen perustuvat menetelmät

Solukalvon läpäisevyyteen perustuvissa menetelmissä solujen joukkoon lisätään väriainetta, joka ei läpäise elävien solujen ehjää solukalvoa mutta värjää kuolleet solut. Yksi vanhimmista ja yleisimmin käytetyistä väriaineista on atsoväreihin kuuluva trypaanisini. Solususpensioon lisättäessä se kulkeutuu rikkoutuneiden solujen sisään ja sitoutuu solunsisäisiin proteiineihin, jolloin kuolleet solut näkyvät mikroskoopissa sinisinä. [20.]

Propidiumjodidi (PI) on punaisena fluoresoiva, solukalvoa läpäisemätön väriaine. Se sitoutuu rikkoutuneiden solujen DNA:han, jolloin fluoresenssi 20–30-kertaistuu. Propidiumjodidia käytetään fluoresenssimikroskopiassa, virtausytometriassa ja fluorometriassa. [21.]

2.4 qPCR ja suhteellinen geeniekspressio

qPCR-metelmällä voidaan määrittää tietyn nukleinihapon kopioiden määrä näytteessä. Polymeraasiketjureaktion aikana DNA-konsentraation kasvua seurataan fluoresoivien

merkkiaineiden avulla: mitä enemmän näytteessä on tutkittavaa DNA:ta, sitä varhaisemmassa syklistä fluoresenssi ylittää nk. kynnysarvon. Syklin perusteella voidaan tehdä arvio alkuperäisestä nukleiinihappokopioiden määrästä. [12, s. 22.] Tulosten perusteella voidaan määrittää joko absoluuttinen tai suhteellinen geeniekspressio: absoluuttisessa menetelmässä tulos sijoitetaan tunnettujen pitoisuuksien pohjalta piirretylle standardisuoralle, kun taas suhteellisessa menetelmässä verrataan tutkittavan näytteen geeniekspression muutosta suhteessa referenssinäytteeseen [22]. qPCR-menetelmää käytettiin työn loppuvaiheessa PrestoBluella saatujen tulosten vertailuun.

3 Työn suoritus

Työ suoritettiin THL:n Virusinfektioyksikössä maalisi–toukokuussa 2017. Työskentely tapahtui BSL-1- ja BSL-2-laboratorioissa.

3.1 Solujen kasvatus

MDCK- (ATCC CCL-34), VERO E6- (ATCC CRL-1586) ja A-549-solut (ATCC CCL-185) kasvatettiin E-MEM-mediassa, johon lisättiin glutamiinia, antibioottia (penisilliini-streptomysiini), HEPES:iä ja 10 % FCS:a. Soluja maljattiin 96-kuoppalevyille eri määriä sopivaa konsentraatiota etsittäessä ja käyttötarkoituksesta riippuen: MDCK-soluja 15 000–60 000/kuoppa, VERO E6 -soluja 60 000/kuoppa ja A-549-soluja 20 000–80 000/kuoppa.

Pakastetuista ihmisen mononukleaarisolusta eroteltiin monosyytit, jotka erilaistettiin makrofageiksi. Mononukleaarisolut oli eristetty ihmisen veren buffy coat -fraktiosta Veckmanin ym. [23] kuvaamalla tavalla. Neljältä luovuttajalta (A–D) maljattiin 96-kuoppalevyille 500 000 solua/kuoppa, joista erilaistamisen jälkeen oli laskennallisesti jäljellä 50 000 solua/kuoppa. Solut maljattiin glutamiinilla, antibiootilla ja HEPES:illä supplementoidussa RPMI-1640-mediassa (Sigma Aldrich R0883) ja kasvatettiin 7 vrk:n ajan Macrophage-SFM-mediassa (Gibco 12065-074), johon oli lisätty GM-CSF-kasvutekijää (Biosource) 10 ng/ml. Media vaihdettiin joka toinen päivä.

3.2 Infektio

Projektissa käytettiin seuraavia influenssaviruksia:

- A/Beijing/353/1989 H3N2 E3, kasvatettu 5.5.2014 ja 3.4.2017
- A/Fin/683/1999 H3N2 E3, kasvatettu 2.3.1999
- A/Fin/554/2009 H1N1 E3, kasvatettu 16.9.2011.

Ensimmäisessä kokeilussa infektoitiin MDCK- ja VERO E6 -soluja A/Beijing/353/1989 H3N2 (2014) -viruksella, joka annosteltiin soluille laimentamattomana kantaliuoksena ja kymmenenä solumediaan valmistettuna laimennoksena, laimennossuhteilla 1:2–1:1024. Kullakin laimennoksella infektoitiin kaksi rinnakkaisnäytettä. Kasvatusmedia poistettiin kuoppalevyiltä aspiraattorilla ja virus annosteltiin soluille 50 µl:n tilavuudessa. Infektoimattomille solukontrolleille annosteltiin sama tilavuus solumediaa (EMEM + 2 % FCS). Inkuboitiin 1 h ja lisättiin soluille TPCK-trypsiiniä, jotta virusinfektiossa syntyvät uudet viruspartikkelit olisivat infektiivisiä. Valmistettiin 0,5 µg/µl kantaliuoksesta laimennos, jota lisäämällä saadaan kuopan trypsiinikonsentraatioksi 2 µg/ml. Pipetoitiin infektoituille soluille 40 µl laimennosta ja inkuboitiin 37 °C:ssa, 5 % CO₂:ssa yön yli. Myöhemmissä kokeiluissa, yritettäessä sulkea pois mahdollisia virhelähteitä, käytettiin infektoimiseen lisäksi muita listassa lueteltuja viruksia vastaavalla tavalla kuin A/Beijing/353/1989 H3N2 (2014) -virusta.

Infektoidut solut mikroskoipoitiin seuravana päivänä. MDCK-soluissa havaittiin voimakas infektio ja CPE 1:128-laimennokseen asti. 1:256-laimennoksessa havaittiin vielä solumaton rippeitä. VERO E6 -soluissa ei havaittu infektion merkkejä missään viruslaimennoksessa ja päätettiin lopettaa testaus tämän solulinjan osalta.

A-549-solut infektoitiin A/Beijing/353/1989 H3N2 (2014) -viruksella, jota käytettiin laimentamattomana kantaliuoksena ja neljänä eri vahvuisena laimennoksena (1:100–1/1600). Koska PrestoBlue-reagenssia on tarkoitus jatkossa käyttää antiviraaliaineiden testaukseen, käsiteltiin puolet soluista ennen infektiota antiviraalisella beetainterferoni 1B:lla, viidellä pitoisuudella välillä 0,01–100 IU/ml. A/Beijing/353/1989 H3N2 (2014) -viruksen on osoitettu olevan herkkä alfa- ja beetainterferoneille [24; 25], joten interferonikäsittelyn voitiin odottaa estävän infektion.

Makrofagit infektoitiin A/Beijing/353/1989 H3N2 (2014) -viruksella, viidellä MOI-arvolla välillä 0,048–30. Samasta syystä kuin A-549-solut, osa soluista käsiteltiin ennen infektiota beetainterferoni 1B:lla, pitoisuuksilla 100, 10 ja 1 IU/ml. Seuraavana päivänä solut infektoitiin vahvalla virusannoksella (MOI 30). Pelkän interferonikäsittelyn vaikutusta tutkittiin infektoimattomilla soluilla.

3.3 PrestoBlue -viabiliteettimääritys

Ensimmäisessä kokeilussa H3N2-viruksella infektoituille MDCK-soluille pipetoitiin 10 µl PrestoBlue-reagenssia (Thermo Fisher, tuotenumero A13261) ja inkuboitiin ensin 15 min huoneenlämmössä, sitten 15 + 30 min 37 °C:ssa. Kuopilla havaittiin värinmuutosreaktio, joka voimistui inkuboinnin jatkuessa. Kuoppalevyille tehtiin absorbanssimittaus ja saatiin sävyeroja vastaavia lukuja.

Koska värinmuutosreaktio ei kuitenkaan ollut voimakkain infektoimattomissa, terveitä soluja sisältävissä kontrollinäytekuopissa, päätettiin testata reagenssin toimintaa myös suurina pitoisuuksina soluille toksisella dimetyylisulfoksidilla (DMSO) heikennetyillä VERO E6 -soluilla, jotta nähtäisiin, onko PrestoBluen värinmuutosreaktio samanlainen kuin virusinfektion heikentämällä soluilla. DMSO:sta valmistettiin 30 %, 6 %, 1,2 %, 0,24 % ja 0,048 % liuokset värilliseen ja värittömään EMEM:iin, jotta voitiin sulkea pois ravintoliuoksen värin vaikutus absorbanssimittauksen tulokseen. Poistettiin ravintoliuos soluilta ja pipetoitiin kuoppiin 90 µl DMSO-liuosta, kutakin pitoisuutta kahteen kuoppaan. Inkuboitiin 1 h 50 min 37 °C:ssa, minkä jälkeen mikroskoipoitiin kuopat ja havaittiin 30-prosenttisella DMSO-liuoksella käsiteltyjen solujen vaurioituneen. Muissa DMSO-pitoisuuksissa ei havaittu yhtä selvää vaikutusta. Lisättiin kuoppiin 10 µl PrestoBlue-reagenssia ja inkuboitiin 20 min 37 °C:ssa. Reagenssin toimintaa testattiin myös ultravioletisäteilyllä (4 x 0,9999 J) ja pakastamalla (-70 °C, yön yli) tuhotuilla MDCK-soluilla.

A-549-solujen osalta testaus aloitettiin varmistamalla niiden pelkistämiskyky infektoimattomalla solulaimennossarjalla, jolle tehtiin PrestoBlue-käsittely.

PrestoBluella käsitellyille kuoppalevyille tehtiin reagenssivalmistajan ensisijaisesti suositteleman fluoresenssimittauksen sijasta absorbanssimittaukset, koska haluttiin sovittaa menetelmä BSL-3-laboratoriossa valmiiksi olevalle laitteelle. Tehtiin näytteille ja media-

kontrolleille absorbanssimittaukset aallonpituudella 570 nm (resorufiinin absorptiomaksimi) ja aallonpituudella 595 nm (resatsuriinin absorptiomaksimi). Reagenssivalmistajan ohjeen mukaan jälkimmäisessä mittauksessa tulisi käyttää aallonpituutta 600 nm, mutta tällaista filttieriä ei ollut saatavilla, joten käytettiin 595 nm:n filttieriä. Otaksuttiin, ettei tästä olisi haittaa, koska mitattavien aineiden absorptiomaksimialueet ovat suhteellisen leveät.

3.4 Pelkistysreaktion vaikuttavien tekijöiden poissulkeminen

Kun reagenssia ei saatu toimimaan valmistajan kuvaamalla tavalla, päätettiin lähteä poissulkemaan pelkistysreaktion mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä.

3.4.1 Kasvatusmedian supplementit ja TPCK-trypsiini

Kasvatusmedian supplementtien – seerumin, HEPES:in ja glutamiinin – vaikutusta pelkistysreaktion tutkittiin kasvattamalla infektoitavia soluja ilman kutakin lisäainetta. Seerumin koostumus voi vaihdella, eikä sitä näin ollen tunneta tarkkaan, joten haluttiin sulkea pois sen komponenttien vaikutus värinmuutosreaktion. Infektoitumisen tehostamiseen käytetyn TPCK-trypsiinin vaikutus pelkistysreaktion suljettiin pois tekemällä PrestoBlue-käsittely TPCK-laimennoksella käsitellyille infektoimattomille soluille.

3.4.2 Viruskantaliuoksen mikrobikontaminaatio

Koska kaikki elävät solut pystyvät pelkistämään resatsuriinia, haluttiin sulkea pois viruskantaliuoksen mahdollinen mikrobikontaminaatio. Viruskantaliuosta maljattiin antibiootittomille Luria-maljoille. Lisäksi tehtiin PrestoBlue-käsittely pelkälle viruskantaliuokselle.

3.4.3 Viruskannat

Resatsuriinireagenssin toimintaa haluttiin tarkastella myös eri viruskannoilla infektoiduissa soluviljelmissä, ks. kannat kohdassa 3.2. Suljettiin pois myös kananmunan allantoisnesteeseen pelkistävä vaikutus käyttämällä infektointiin MDCK-soluissa tuotettua A/Fin/180/2003 H3N2 -virusta, tekemällä PrestoBlue-käsittely pelkälle allantoisnesteelle sekä allantoisnestelaimennoksilla käsitellyille soluille.

3.5 cDNA-synteesi ja qPCR

PrestoBlue:lla saatuja tuloksia haluttiin verrata vielä qPCR-tuloksiin, minkä vuoksi otettiin infektoiduilta makrofagikuoppalevyiltä RNA-näytteet kahdessa aikapisteessä. Virus-RNA eristettiin Qiagenin RNeasy Mini Kitillä valmistajan ohjeen mukaan DNAasi-digestiolla. cDNA-synteesi suoritettiin THL:n ohjeen CDNA-synteesi qRT-PCR:ää varten (INVI-MO-039) mukaan. qPCR-ajo suoritettiin niin ikään THL:n ohjeen mukaan.

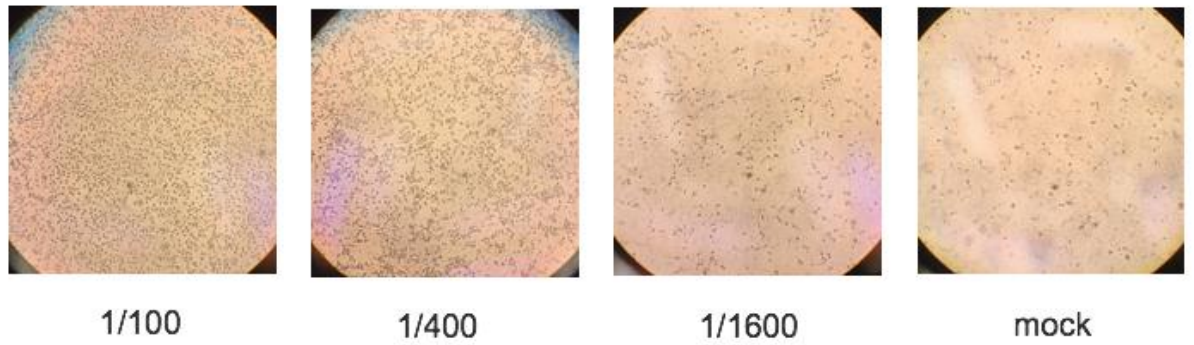
4 Tulokset

4.1 PrestoBluen toiminta eri soluissa

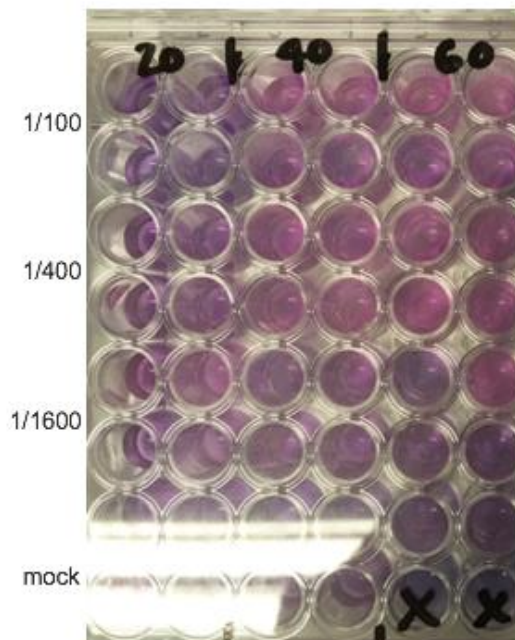
MDCK-kuoppalevyillä havaittiin PrestoBluen lisäämisen jälkeen värinmuutosreaktio, joka voimistui inkuboinnin jatkuessa. Tehtiin absorbanssimittaus, josta saatiin sävyeroja vastaavia lukuja: korkeimmat arvot punaisimmista kuopista. Vastoin odotuksia värinmuutosreaktio ei ollut voimakkain infektoimattomissa kontrollinäytekuopissa. Voimakkain värinmuutos havaittiin viruslaimennoksilla 1:256 ja 1:512 infektoiduissa kuopissa – laimennoksella 1:1024 infektoiduissa kuopissa reaktio oli heikompi. Mikroskopoimalla havaittiin parhaiten voivat solut voimakkaimman värinmuutoksen kuopissa. Pienimmällä viruslaimennoksella infektoiduissa kuopissa ja kontrollikuopissa havaittiin solujen saavuttaneen täyden konfluenssin ja pohdittiin, onko solujen metabolia sen myötä heikentynyt, mikä selittäisi heikomman värinmuutoksen. Vastaava ilmiö on havaittu MTT-menetelmää käytettäessä: adherenttien solujen saavuttaessa konfluenssin niiden metabolia mahdollisesti hidastuu, jolloin myös tetratsolin pelkistyminen hidastuu. Myös kasvatusolosuhteissa tapahtuvat epäsuotuisat muutokset, esim. pH-muutokset tai ravinteiden loppuminen, voivat heikentää solujen pelkistämiskykyä [17].

Useista kokeiluista huolimatta PrestoBlue-reagenssia ei saatu MDCK-soluilla toimimaan valmistajan kuvaamalla tavalla. Voimakkain värinmuutos ja korkeimmat absorbanssiarvot mitattiin toistuvasti mikroskoopissa voimakkaimmin infektoituneiksi havaituista solu-kuopista, (kuvat 7, 8 ja 9). Syyksi epäiltiin jotakin solujen ja viruksen yhteisvaikutusta, jota ei kuitenkaan tämän projektin puitteissa pystytty tarkemmin määrittämään. Havainnon tiimoilta oltiin yhteydessä reagenssin valmistajan Thermo Fisherin asiakaspalveluun, jossa ilmiölle ei osattu antaa selitystä.

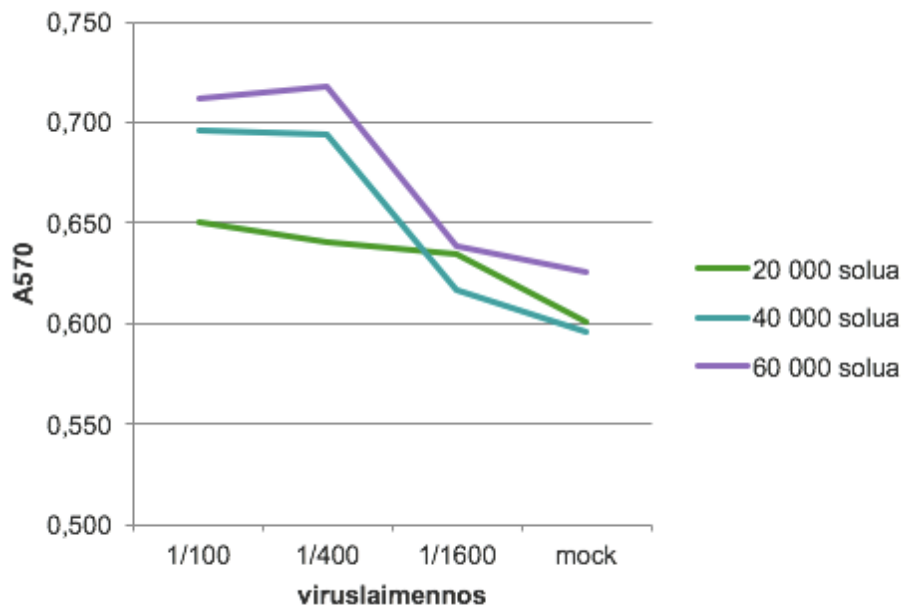
60 000 solua



Kuva 7. Influenssaviruksella infektoidut MDCK-solut mikroskoopissa. CPE on voimakkain 1:100-viruslaimennoksella infektoidussa kuopassa ja lievenee virusannoksen pienentyessä.



Kuva 8. Influenssaviruksella infektoitu MDCK-kuoppalevy PrestoBlue-käsittelyn jälkeen. Värimuutosreaktio on voimakkain suurimmalla virusannoksella infektoiduissa 60 000 solun kuopissa.



Kuva 9. PrestoBluella käsitellyn H3N2-viruksella infektoidun MDCK-kuoppalevyn absorbanssi-mittauksen tulokset. Korkeimmat lukemat saatiin voimakkaimman CPE:n kuopista.

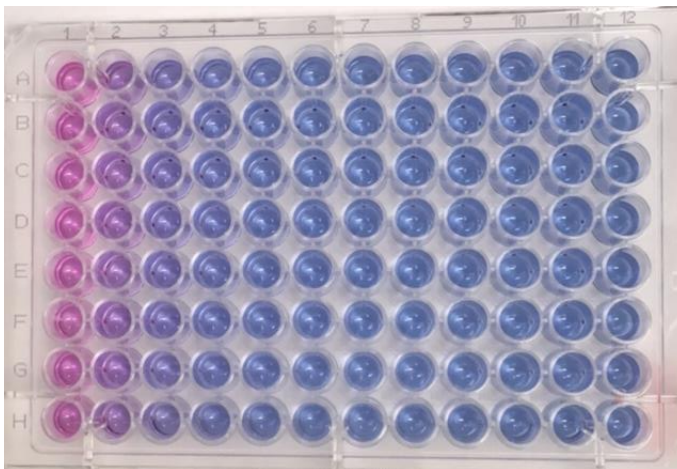
DMSO:lla, UV-säteilyllä ja pakastamalla tuhottujen, mikroskoopissa kuolleeksi todettujen solujen ei havaittu pelkistävän resatsuriinia ja aikaansaavan värinmuutosreaktiota.

Ilman seerumia kasvatetuissa soluissa havaittiin voimakkaampi infektiio, mutta värinmuutos säilyi odotuksiin nähden päinvastaisena. Kirjallisuudesta ei löydetty tietoa HEPES:in tai glutamiinin yhteensopimattomuudesta resatsuriinireagenssien kanssa, eikä omissa kokeissa näiden lisien poisjättämisellä havaittu vaikutusta värireaktioon. Myöskään infektoitumisen tehostamiseen käytetyn TPCK-trypsiinin tai allantoisnesteeseen ei havaittu vaikuttavan pelkistysreaktion.

Kasvatusmaljoilla, joille viruskantaliuosta oli maljattu mikrobikontaminaation tutkimiseksi, ei havaittu kasvua 24 eikä 48 tunnin inkuboinnin jälkeen. Kaikille mikrobeille ihanteellisia kasvatusolosuhteita ei kokeilussa voitu luoda, mutta mikrobikontaminaatiota ei pidetty todennäköisenä, koska projektissa käytettiin antibiootin sisältävää solumediaa. Lisäksi tehtiin PrestoBlue-käsittely pelkälle viruskantaliuokselle ja todettiin, ettei pelkistymisreaktiota tapahdu – kantaliuos ei siis sisällä eläviä soluja.

Eri viruskannat aiheuttivat MDCK-soluissa voimakkuudeltaan vaihtelevan infektion, mutta värinmuutosreaktio säilyi kaikissa odotuksiin nähden päinvastaisena. Koska ei löydetty mitään tekijää, joka olisi voinut yksinään selittää PrestoBluen nurinkurisen värireaktion MDCK-soluissa, alettiin epäillä ongelmia kyseisten solujen pelkistämiskyvyssä tai jonkinlaista MDCK-solujen ja influenssaviruksen yhteisreaktiota. Päätettiin jatkaa kokeiluja muilla soluilla ja valittiin A-549-solut ja neljältä eri luovuttajalta erilaistetut makrofagit.

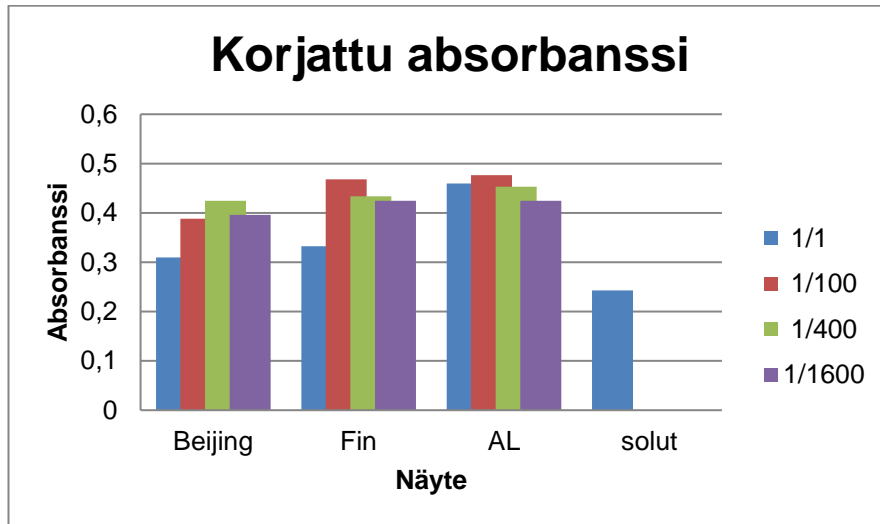
A-549-solujen osalta testaus aloitettiin varmistamalla pelkistämiskyky infektoimattomalla solulaimennossarjalla, jolle tehtiin PrestoBlue-käsittely. Kuvassa 10 olevan kuoppalevyn vasemmassa reunassa on 40 000 solua/kuoppa, ja pitoisuus laimenee puoleen oikealle siirryttäessä. Tunnin inkubaation jälkeen havaittiin eriaisteiset värinmuutokset niissä kuopissa, joissa oli 5000 solua tai enemmän. Värireaktio oli sitä voimakkaampi, mitä enemmän kuopalla oli soluja. Myöhemmissä kokeiluissa todettiin, että konfluenssin saavuttaneet A-549-solut pelkistävät resatsuriinin erittäin nopeasti, ja voimakas värireaktio syntyy huoneenlämmössäkin jo 15 minuutissa. A-549-soluilla infektoimaton laimennossarja saatiin siis toimimaan valmistajan kuvaamalla tavalla.



Kuva 10. PrestoBluella käsitelty infektoimaton A-549-kuoppalevy. Ensimmäisellä pystyriivillä soluja on 40 000/kuoppa ja määrä pienenee puoleen oikealla siirryttäessä.

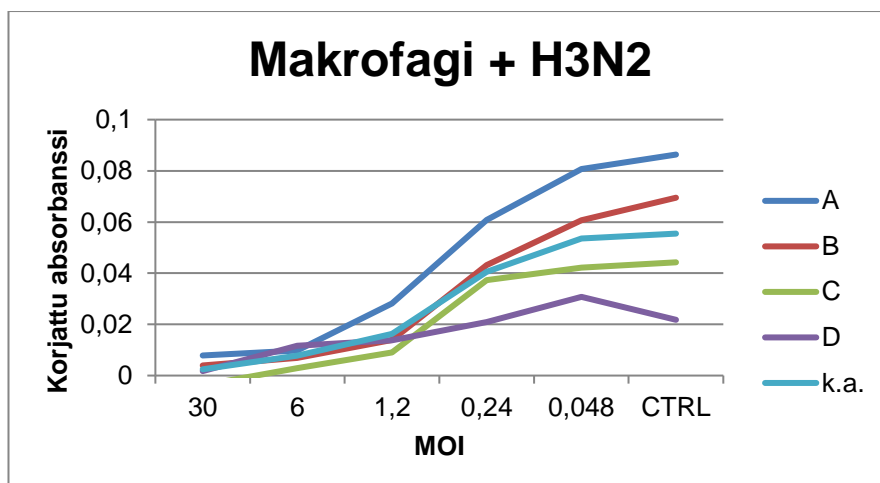
Infektoitujen A-549-solujen PrestoBlue-käsittelyn tulokset olivat aluksi odotetunlaisia, (kuva 11): absorbanssi kasvaa ja väri muuttuu punaisemmaksi virusannoksen pienentyessä laimentamattomasta kantaliuoksesta 1:100-laimennokseen, ja A/Beijing/353/1989 H3N2 (2014) -viruksen kohdalla muutos jatkuu samansuuntaisena vielä seuraavaankin laimennokseen. Tämän jälkeen absorbanssi laskee virusannoksen pienentyessä, mikä

ei vastaa reagenssin toimintaperiaatetta. Kaiken lisäksi infektoimattomasta solukontrollista mitattiin matalimmat absorbanssiarvot, vaikka mikroskoopissa siinä havaittiin terveimmät solut.



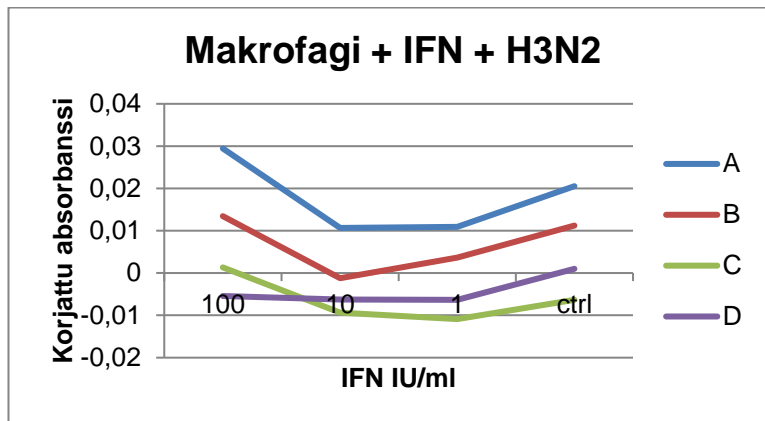
Kuva 11. Infektoitujen A-549-solujen PrestoBlue-käsittelyn tulokset.

Makrofageilla saatiin lopulta reagenssivalmistajan kuvauksen mukaisia tuloksia (kuva 12). Absorbanssiarvo kasvaa infektointiin käytetyn virusannoksen pienentyessä: mitä heikompi infektio, sitä enemmän eläviä soluja ja sitä tehokkaammin resatsuriini pelkistyy. Luovuttajien välillä havaittiin suuria eroja: tunnin ja 15 minuutin kuluttua PrestoBluen liisämisestä, absorbanssimittausten aikaan, luovuttajien välillä on selkeitä sävyeroja.



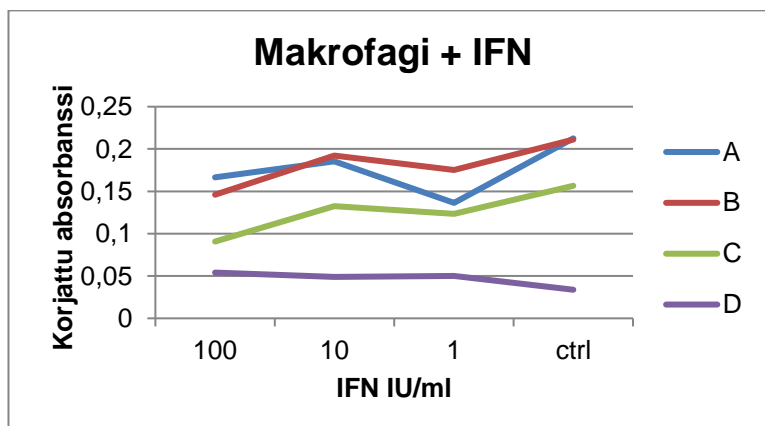
Kuva 12. PrestoBluella käsiteltyjen influenssaviruksella infektoitujen makrofagikuoppalevyjen absorbanssimittauksen tulokset. Korjattu absorbanssi on sitä korkeampi, mitä lievempi infektio on.

Soluille ennen influenssaviruksella infektoimista tehty interferonikäsittely näkyy absorbanssimittausten tuloksissa osittain odotetulla tavalla: suurimmalla pitoisuudella (100 IU/ml) havaitaan selvä antiviraalinen vaikutus, joka heikkenee annoksen laskiessa (10 IU/ml). Interferonilla käsittelemättömistä kontrollikuopista sen sijaan mitattiin korkeampia absorbanssilukeamia kuin pienemmillä interferonimäärillä (10 ja 1 IU/ml) käsitellyistä kuopista (kuva 13).



Kuva 13. Interferonilla ennen influenssaviruksella infektoimista käsitellyjen makrofagikuoppalevyjen absorbanssimittausten tulokset PrestoBlue-käsittelyn jälkeen.

Tutkittaessa pelkän interferonikäsittelyn vaikutusta infektoimattomien solujen absorbanssimittausten tuloksiin havaittiin luovuttajilla A–C, että se voi itsessään heikentää solujen pelkistämiskykyä. Absorbanssi kasvaa interferoniannoksen laskiessa 100 IU/ml:sta 10 IU/ml:aan, minkä jälkeen se taas laskee annoksen 1 IU/ml kohdalla, mutta on kuitenkin korkeimmillaan interferonilla käsittelemättömissä kuopissa (kuva 14).



Kuva 14. Infektoimattomille soluille tehdyn interferonikäsittelyn vaikutus absorbanssimittausten tuloksiin.

4.2 Korjattu absorbanssi

Absorbanssimittauksissa saatu data käsiteltiin reagenssivalmistajan ohjeen mukaan laskemalla korjattu absorbanssi seuraavalla kaavalla:

$$A_k = (A_{570} - A_{595}) - A_{ctrl}$$

jossa

A_k = näytteen korjattu absorbanssi

A_{570} = absorbanssi aallonpituudella 570 nm

A_{595} = absorbanssi aallonpituudella 595 nm

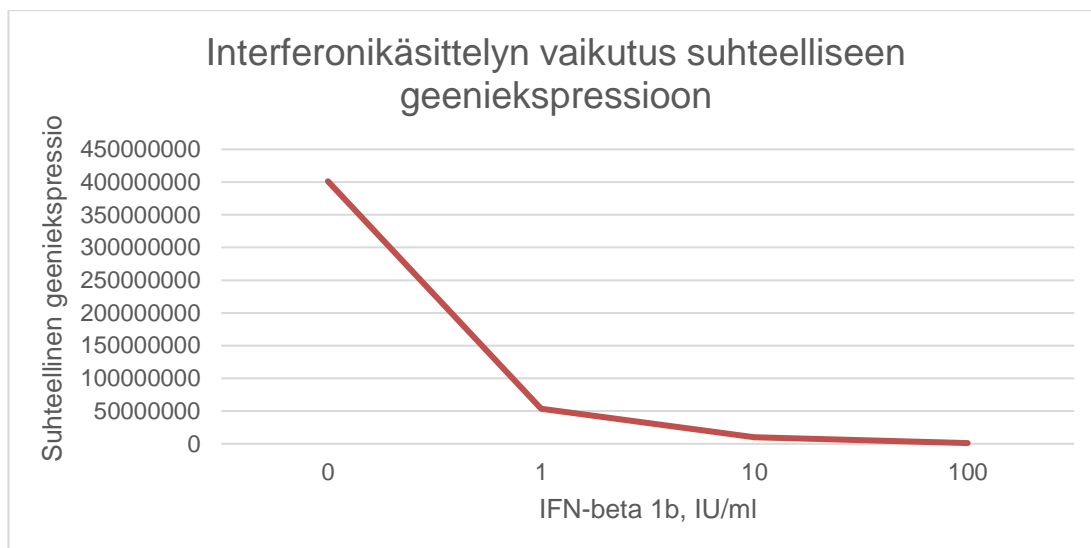
A_{ctrl} = mediakontrollien $A_{570} - A_{595}$.

Näytteen absorbanssista aallonpituudella 570 nm, joka on punaisen resorufiinin absorptiomaksimi, vähennetään absorbanssi aallonpituudella 595 nm, joka on sinisen resatsuriinin absorptiomaksimi. Tämä tehdään, koska resatsuriinin ja resorufiinin absorptiospektrit ovat osittain päällekkäiset (kuva 6). Tausta poistetaan vähentämällä saadusta luvusta mediakontrollien korjattu absorbanssi.

4.3 Suhteellinen geeniekspressio

Osalle näytteistä ei saatu Ct-arvoa, joten niille annettiin oletettu arvo muiden näytteiden perusteella. Näytteet ajettiin kahdesti, mutta molemmissa ajoissa oli ongelmia samojen näytteiden kanssa. Pohdittiin, voisiko tämä johtua voimakkaasta infektiosta.

qPCR-tulokset (Liite 1) ovat yhdensuuntaiset PrestoBluella saatujen tulosten (kuva 13) kanssa. Interferonilla käsitellyissä kuopissa geeniekspressio on sitä vähäisempää, mitä voimakkaampaa interferoniannosta käytettiin (kuva 15). Infektoimattomassa solukontrollissa ei havaittu ekspressiota.



Kuva 15. Interferonikäsittelyn vaikutus suhteelliseen geeniekspressioon.

5 Pohdinta

Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön soluviabiliteettia mittaava menetelmä, jota voitaisiin käyttää antiviraaliaineiden toimivuuden testauksessa esim. pandemiatapauksissa. Re-satsuriinin pelkistysreaktioon perustuva menetelmä valittiin sen nopeuden, helppouden ja edullisuuden vuoksi ja sen toivottiin korvaavan TCID50-määrityksen ja lyhentävän työskentelyaikaa BSL-3-laboratoriossa.

PrestoBlue-reagenssin todettiin sopivan soluviabiliteettimäärityksiin makrofageilla. Reagenssia ei saatu toimimaan MDCK-soluilla, minkä epäiltiin johtuvan jostakin solun – ja kenties solumedian – ja viruksen yhteisvaikutuksesta. A-549-soluilla saatiin vaihtelevia tuloksia, mutta tämä solulinja todettiin mahdollisesti käyttökelpoiseksi suuremmalla määrällä rinnakkaisnäytteitä suoritetun jatkotestauksen jälkeen. Tämän työn puitteissa jatkotestaukselle ei valitettavasti riittänyt aikaa. Reagenssia testataan jatkossa mahdollisesti myös muilla solu-virusyhdistelmillä, esim. VERO E6 + MERS. Muualla PrestoBlue-reagenssia on käytetty onnistuneesti ainakin zikaviruksella infektoiduilla A-549- ja VERO-soluilla [26]. Samassa tutkimuksessa saatiin tässäkin työssä kuvattuja nurinkurisia absorbanssimittaustuloksia solulinjalla (CHO), jossa ei muodostunut infektiivisiä viruspartikkeleita. Toimivan solutyypin löytyessä määritetään optimaalinen solumäärä ja inku-

bointiaika. Koska interferonikäsittelyn havaittiin itsessään heikentävän solujen pelkistämiskykyä, muitakin antiviraaliaineita testattaessa tulee määrittää kyseisten aineiden vaikutus pelkistämiskykyyn virheellisten johtopäätösten välttämiseksi.

PrestoBluen kanssa toimivan solulinjan löytäminen olisi sikäli toivottavaa, että solulinjan kasvattaminen kuoppalevyillä on nopeampaa ja yksinkertaisempaa kuin makrofagiin, joiden erilaistaminen on useiden päivien mittainen prosessi. Mikäli menetelmä haluttaisiin pitää jatkuvasti käyttövalmiina pandemian syntymisen varalta, vaatisi tämä jatkuvaa erilaistuvien makrofagiin ylläpitoa, mikä lisäisi laboratorion työmäärää ja kustannuksia.

Solulinjojen resaturiinien pelkistysnopeudessa havaittiin selviä eroja, ja mikäli aikaa olisi ollut enemmän, olisi ollut mielenkiintoista tutkia solulinjoja tästä näkökulmasta laajemminkin.

Opinnäytetyöprosessin aikana opittiin konkreettisesti, että laboratoriotyössä hyvin suunnitellutkaan projektit eivät aina etene suoraviivaisesti ja odotetulla tavalla. Projektin eteenpäin vieminen saattaa vaatia monenlaista virhelähteiden poissuljentaa. Yllättävää oli, ettei kaupallista reagenssia saatu toimimaan valmistajan kuvaamalla tavalla ja että valmistajakaan ei lopulta osannut auttaa ongelman ratkaisemisessa vaan tarjosi tilalle korvaavaa tuotetta.

Lähteet

- 1 Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti; Järvinen, Asko; Meri, Seppo & Vaara, Martti. 2010. Mikrobiologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, osa 1. 1. painos. Jyväskylä: Duodecim.
- 2 Verkkodokumentti. <https://www.cdc.gov/flu/images/h1n1/3D_Influenza_transparent_no_key_pieslice_sml.gif>. Luettu 21.10.2019.
- 3 Baron, Samuel (toim.). 1996. Medical Microbiology, 4. painos. E-kirja. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- 4 CPE. Verkkoaineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/audit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/cpe>>. Luettu 23.5.2017.
- 5 Hinshaw ym. 1994. Apoptosis: a Mechanism of Cell Killing by Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology*. Vol 68(6), s. 3667-3673.
- 6 Agol, V. I. 2012. Cytopathic effects: virus-modulated manifestations of innate immunity? *Trends in Microbiology*. Vol 20(12), s. 570-576.
- 7 MDCK. Verkkoaineisto. ATCC. <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-34.aspx?geo_country=fi#generalinformation>. Luettu 7.9.2017.
- 8 VERO C1008. Verkkoaineisto. ATCC. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1586.aspx?geo_country=fi#generalinformation>. Luettu 7.9.2017.
- 9 A549. Verkkoaineisto. ATCC. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185?geo_country=fi#generalinformation>. Luettu 5.9.2017.
- 10 Yunsheng ym. 2009. Influenza virus assays based on virus-inducible reporter cell lines. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. Vol 3(5), s. 241-251.
- 11 Chengjun ym. 2008. Development of a high-throughput Alamar blue assay for the determination of influenza virus infectious dose, serum antiviral neutralization titer and virus *ca/ts* phenotype. *Journal of Virological Methods*. Vol 150, nro 1—2, s. 63-69.
- 12 Carter ym. 2007. *Virology: Principles and Applications*. E-kirja. John Wiley & Sons.
- 13 Westenius, Veera. 2019. Erikoistutkija, Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, Helsinki. Keskustelu 10.10.2019.

- 14 Baer ym. 2014. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *Journal of Visualized Experiments*. Vol 93.
- 15 Avicel-plakkittitraus (INVI-MO-143). 2015. Laitoksen sisäinen dokumentti. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- 16 Verkkodokumentti. <https://en.wikipedia.org/wiki/Virus_quantification#/media/File:Plaque_assay_macro.jpg>. Luettu 1.10.2019.
- 17 Riss ym. 2013. *Cell Viability Assays*. E-kirja. Eli Lilly & Company.
- 18 Verkkodokumentti. <<https://lifescience.canvaxbiotech.com/wp-content/uploads/sites/2/2015/08/Resazurin-cell-viability-assay.png>>.
- 19 Verkkodokumentti. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/figures/Fig1a-Fig1b.jpg-650.jpg>>.
- 20 Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*. 2001, 21(1), s. 1–2.
- 21 Propidium Iodide. Verkkokatalogi. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP>>. Luettu 4.3.2019.
- 22 Absolute vs. Relative Quantification for qPCR. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html>>. Luettu 12.9.2019.
- 23 Veckman ym. 2004. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 75, s. 764–771.
- 24 Arilahti ym. 2014. Novel avian influenza A (H7N9) virus induces impaired interferon responses in human dendritic cells. *Plos One*. Vol 9(5).
- 25 Westenius ym. 2014. Efficient replication and strong induction of innate immune responses by H9N2 avian influenza virus in human dendritic cells. *Virology*. Vol 471-473, s. 38–48.
- 26 Himmelsbach ym. 2018. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World Journal of Virology*. Vol 7(1), s. 10-20.

qPCR-ajon tulokset

Well	Dye	Well Type	Threshold (dRn)	Ct (dRn)	Sample
A1	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	1
B1	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	
C1	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	
D1	FAM	Unknown	0,0709	39,9	2
E1	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	
F1	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	
G1	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	3
H1	FAM	Unknown	0,0709	40,18	
A2	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	
B2	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	4
C2	FAM	Unknown	0,0709	41,26	
D2	FAM	Unknown	0,0709	No Ct	
E2	FAM	Unknown	0,0709	17,35	5
F2	FAM	Unknown	0,0709	17,32	
G2	FAM	Unknown	0,0709	17,64	
H2	FAM	Unknown	0,0709	18,13	6
A3	FAM	Unknown	0,0709	18,47	
B3	FAM	Unknown	0,0709	18,34	
C3	FAM	Unknown	0,0709	19,32	7
D3	FAM	Unknown	0,0709	19,43	
E3	FAM	Unknown	0,0709	19,44	
F3	FAM	Unknown	0,0709	20,49	8
G3	FAM	Unknown	0,0709	20,31	
H3	FAM	Unknown	0,0709	20,3	
A4	FAM	NTC	0,0709	No Ct	NC
B4	FAM	NTC	0,0709	No Ct	
C4	FAM	NTC	0,0709	No Ct	

A1	HEX	Unknown	0,0191	23,2	1
B1	HEX	Unknown	0,0191	23,05	
C1	HEX	Unknown	0,0191	22,72	
D1	HEX	Unknown	0,0191	20,79	2
E1	HEX	Unknown	0,0191	20,15	
F1	HEX	Unknown	0,0191	20,02	
G1	HEX	Unknown	0,0191	20,88	3
H1	HEX	Unknown	0,0191	20,84	
A2	HEX	Unknown	0,0191	21,34	
B2	HEX	Unknown	0,0191	21,19	4
C2	HEX	Unknown	0,0191	21,6	
D2	HEX	Unknown	0,0191	21,8	
E2	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	5
F2	HEX	Unknown	0,0191	27,13	
G2	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	
H2	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	6
A3	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	
B3	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	
C3	HEX	Unknown	0,0191	23,75	7
D3	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	
E3	HEX	Unknown	0,0191	No Ct	
F3	HEX	Unknown	0,0191	21,83	8
G3	HEX	Unknown	0,0191	20,63	
H3	HEX	Unknown	0,0191	21,24	
A4	HEX	NTC	0,0191	46,1	NC
B4	HEX	NTC	0,0191	No Ct	
C4	HEX	NTC	0,0191	43,76	

Sample	Ct (FAM)	Ct (HEX)	$\Delta Ct = Ct(FAM) - Ct (HEX)$	k.a.	$\Delta\Delta Ct$	relat. gene expression
1	42	23,2	18,8	18,8	0	1
	42	23,05	18,95			
	42	22,72	19,28			
2	39,9	20,79	19,11	19,11	0,31	0,806641759
	42	20,15	21,85			
	42	20,02	21,98			
3	42	20,88	21,12	21,12	2,32	0,200267469
	40,18	20,84	19,34			
	42	21,34	20,66			
4	42	21,19	20,81	20,81	2,01	0,248273124
	41,26	21,6	19,66			
	42	21,8	20,2			
5	17,35	27,13	-9,78	-9,78	-28,58	401270539,7
	17,32	27,13	-9,81			
	17,64	27,13	-9,49			
6	18,13	25	-6,87	-6,87	-25,67	53387549,7
	18,47	25	-6,53			
	18,34	25	-6,66			
7	19,32	23,75	-4,43	-4,43	-23,23	9838452,638
	19,43	23,75	-4,32			
	19,44	23,75	-4,31			
8	20,49	21,83	-1,34	-1,34	-20,14	1155431,259
	20,31	20,63	-0,32			
	20,3	21,24	-0,94			
NC	No Ct	46,1				
	No Ct	No Ct				
	No Ct	43,76				