

**BORNA-VIRUKSEN FOSFOPROTEIININ p23
EPITOOPPIKARTOITUS BIOSIRULLA**

Sari Pitkänen
Pro Gradu
Biokemian koulutusohjelma
Biotieteellinen kemia
Kuopion yliopiston biotieteiden laitos
Kemian yksikkö
Marraskuu 2007

KUOPION YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta

Biokemian koulutusohjelma

Biotieteellinen kemia

PITKÄNEN SARI: Borna-viruksen fosfoproteiinin p23 epitooppikartoitus biosirulla

Pro Gradu, 70 sivua

Ohjaajat: Dosentti Ale Närvänen

FM Janne Weisell

Marraskuu 2007

Borna-virus, p23, Bornan tauti, peptidisynteesi, epitooppikartoitus, EIA, biosiru

Borna-virus (Borna Disease Virus, BDV) on segmentoitumaton negatiivijuosteinen RNA-virus. Ainutlaatuisten geneettisten ja biologisten ominaisuuksiensa vuoksi se on *Mononegavirales* -lahkon *Bornaviridae* -heimon ainoa jäsen. Borna-virus on vahvasti neurotrooppinen ja aiheuttaa harvinaista Bornan tautia eli etenevää aivojen, aivokalvojen ja selkäytimen tulehdusta keskushermoston immuunipuolustuksen reaktioiden seurauksena. Bornan taudin itämisaika ja oireisto vaihtelevat suuresti riippuen tartunnan saajan lajista, iästä ja immuunipuolustuksen tehokkuudesta sekä elimistöön päässeeseen viruksen määrästä ja tartuntareitistä. Borna-virusinfektio voi johtaa vakaviin käytöshäiriöihin ja jopa kuolemaan eikä tehoavaa hoitoa siihen vielä ole. Bornan tautia on alun perin pidetty hevosten ja lampaiden sairautena, mutta viime vuosina sen on todettu voivan tarttua kaikkiin nisäkkäisiin ja on vahvoja todisteita sen tartumisesta myös ihmiseen. Borna-virusinfektion epäillään olevan yhteydessä ihmisten psykiatriisiin sairauksiin.

Borna-virusinfektion diagnosoimiseksi ei ole vielä olemassa varmaa standardoitua menetelmää. Varmuudella virustartunta ja siitä aiheutuva Bornan tauti saadaan diagnosoitua vasta kuolleen eläimen aivonäytteestä. Bornan taudin laboratoriodiagnostiikka kaipaa vielä lisätutkimusta sekä maailmanlaajuisia standardointia.

Tässä erikoistyössä kartoitettiin Borna-viruksen antigeenisen fosfoproteiini p23:n epitoopit eli vasta-aineiden sitoutumispaikat EIA:lla (Enzyme Immuno Assay) käyttäen fosfoproteiini p23:a vastaan tuotettua polyklonaalista kanin seerumia. Tätä serologista epitooppikartoitusmenetelmää sovellettiin myös biosiruteknologiaan. Käyttämällä hyödyksi biotiinin ja avidiinin vahvaa kompleksimuodostuskykyä, saatiin testausmenetelmä siirrettyä kokonaisuudessaan microarrayformaattiin ja kehitettiin kanimalli Borna-virusvasta-aineiden detektoimiseen soveltuvasta antigeenisirusta.

ESIPUHE

Tein opinnäytetutkielmani 2005 – 2007 Kuopion yliopiston Biotieteiden laitoksen kemian yksikössä. Tutkielman ohjaajana toimi dosentti Ale Närvänen. Erikoistyön peptidien syntetisoinnissa ja karakterisoinnissa ohjaajana toimi FM Janne Weisell. Kiitokset heille kärsivällisyydestä ja asiantuntevasta ohjauksesta.

Kiitokset myös Biomolekyyli ryhmän laboratoriomestareille Jarmo Asikaiselle ja Pekka Savolaiselle hyvistä teknisistä neuvoista käytännön pulmien kanssa, sekä koko kemian yksikön henkilökunnalle miellyttävästä työilmapiiristä.

Kiitos opiskelutovereilleni kannustuksesta loputtomalta tuntuneessa urakassa ja mukavista, koko elämää sivunneista kahvipöytä- ja lounastaukokeskusteluista.

Lopuksi suuri kiitos äidilleni, veljelleni ja erityisesti kolmelle tyttärelleni, jotka ovat jaksaneet piristää ja tukea minua niinä toivottominakin hetkinä. Kiitos, että olette olemassa. Ilman Teitä ei tätä gradua olisi koskaan kirjoitettu.

Kuopiossa marraskuussa 2007

Sari Pitkänen

LYHENNELUETTELO

ACN	Asetonitrili
anti-GST	Polyklonaalinen kaniseerumi
anti-GST-BDV p23	p23-proteiinia vastaan tuotettu polyklonaalinen kaniseerumi
AP	Alkaalinen fosfataasi
BD	Borna Disease (Bornan tauti)
BDV	Borna Disease Virus (Bornan tauti -virus)
BSA	Bovine Serum Albumin (naudan seerumin albumiini)
DIPEA	N, N-di-isopropylietyyliamiini
DMF	N,N-dimetyyliformamidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EB	Enhanced Binding (parannettu sitoutuminen)
EDT	Etaani-1,2-ditioli
EDTA	Diaminoetaanitetraetikkahappo
EIA	Enzyme Immuno Assay (immunoentsyymitekniikka)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (entsyymilinkattu immunoabsorptiotekniikka)
Fab	Fragment antigen binding (antigeeniin sitoutuva fragmentti)
Fc	Fragment crystalline (kiteytyvä fragmentti)
FIA	Fluorescence ImmunoAssay (immunofluoresenssitekniikka)
Fmoc	9-fluorenyylimetyylioksikarbonyyli
GA	Glutaraldehydi
GST	Glutathioni-S-transferaasi
HBTU	O-2-(1-H-bentso-triatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyli -uroniumheksafluorifosfaatti
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (korkean erotuskyvyn nestekromatografia)
HRP	Horseradish peroxidase (piparjuuriperoksidaasi)
IFA	ImmunoFluorescence Assay (immunofluoresenssitekniikka)
Ig (A, D, E, G, M)	Immunoglobuliini (A, D, E, G, M)
LIA	Luminescence ImmunoAssay (immunoluminesenssitekniikka)
MHC	Major histocompatibility complex (kudostyyppikompleksi)
MIF	Mikroimmunofluoresenssi
NNS-RNA	Non-segmented negative strand RNA (segmentoitumaton negatiivijuosteinen RNA)
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfaattipuskuroitu suolaliuos)
PBST	PBS Tween-20
p-NPP	Paranitrofenyylifosfaatti
RIA	Radio ImmunoAssay (immunoisotooppitekniikka)
RNP	Ribonukleoproteiinikompleksi
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (kiinteän faasin peptidisynteesi)
tBoc	Tert-butylioksikarbonyyli
TFA	Trifluoretikkahappo
TIS	Tri-isopropyylisilaani
TMB	3,3', 5,5' -tetrametyyllibentsidiini

SISÄLLYSLUETTELO

Tiivistelmä.....	2
Esipuhe.....	3
Lyhenneluettelo.....	4
Sisällysluettelo.....	5

Kirjallisuuskatsaus

1. Borna-virus.....	7
1.1. Taksonomia.....	8
1.2. Rakenne ja genomi.....	9
1.3. Virusproteiinit.....	11
1.3.1. Fosfoproteiini p23.....	13
1.4. Lisääntyminen.....	15
2. Bornan tauti	15
2.1. Historia.....	15
2.2. Tartunta.....	16
2.3. Leviäminen.....	16
2.4. Epidemiologia.....	17
2.5. Taudinkuva.....	18
3. Immunipuolustus.....	18
3.1. Vasta-aineet.....	19
3.2. Borna-viruksen aiheuttama immuunivaste.....	21
4. Virusserologia.....	21
4.1. EIA.....	22
4.1.1. Kiinteä faasi.....	23
4.1.2. Antigeenit ja vasta-aineet	24
4.1.3. Vasta-aineiden detektointi.....	25
4.1.4. Menetelmän optimointi.....	28
5. Biosirut.....	29
5.1. Antigeenisirut.....	30
5.1.1. Biotiini, avidiini, streptavidini.....	30
5.1.2. Glutaraldehydi.....	32

Materiaalit ja menetelmät

Johdanto.....	33
Työn tavoitteet.....	33
6. Peptidiantigeenit.....	34
6.1. Karakterisointi.....	35
6.2. Uudet peptidiantigeenit.....	35
6.2.1. <i>Peptidisynteesi</i>	35
6.2.2. <i>Peptidien biotinylointi</i>	37
6.2.3. <i>Peptidien irrotus resiinistä ja suojaryhmien poisto</i>	37
6.2.4. <i>Peptidien saostus ja kylmäkuivaus</i>	37
6.2.5. <i>Peptidien puhdistus</i>	38
6.2.6. <i>Peptidien karakterisointi</i>	38
7. Epäsuora EIA.....	38
7.1. Epäsuora EIA EB-levyllä.....	39
7.1.1. <i>Anti-rabbit IgG:n käyttöläimennoksen määrittäminen</i>	40
7.2. Epäsuora EIA avidiinipinnalla.....	41
7.2.1. <i>Anti-rabbit IgG:n biotinylointi</i>	41
7.2.2. <i>Biotinyloidun IgG:n testaus EIA:ssa</i>	41
7.2.3. <i>Biotinyloidun IgG:n käyttöläimennoksen määrittäminen</i>	42
7.2.4. <i>EB-levyn pinnoitus avidiinillä</i>	42
7.2.5. <i>Epäsuora EIA-testaus</i>	43
8. Microarray.....	43
8.1. Mikroskooppilasilevyjen pinnoitus.....	43
8.2. Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n käyttöläimennoksen määrittäminen.....	45
8.3. IFA-testaus.....	45
8.4. Biosirujen kuvaus ja analysointi.....	46
9. Tulokset.....	46
9.1. Peptidien karakterisointi.....	46
9.2. Positiivisen kontrollin titraus.....	48
9.3. Epäsuora EIA-testaus EB-levyllä.....	49
9.4. Biotinyloitu anti-rabbit IgG.....	49
9.5. Epäsuora EIA-testaus avidiinipinnalla.....	51
9.6. Epäsuora IFA-testaus avidiinipinnoitetulla biosirulla.....	52
9.7. Epitopikartoitus.....	55
10. Pohdinta.....	56
Lähdeluettelo.....	60

Kirjallisuuskatsaus

1. Borna-virus

1.1. Taksonomia

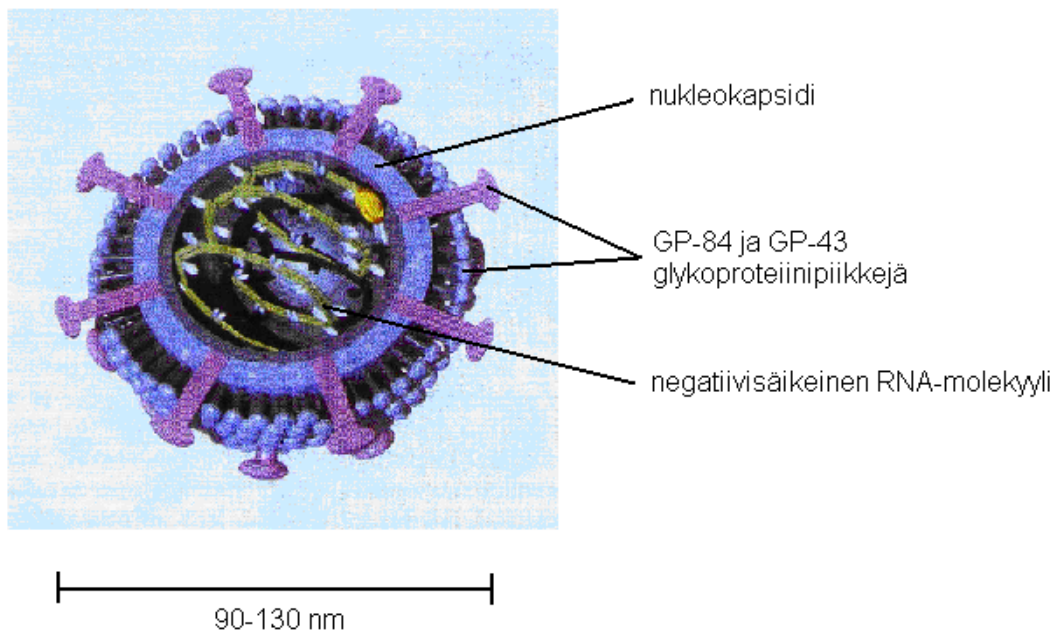
Borna-virus kuuluu *Mononegavirales* -lahkon *Bornaviridae* -heimoon sen ainoana jäsenenä ainutlaatuisten geneettisten ja biologisten ominaisuuksiensa vuoksi (De la Torre 1994, Schneemann ym. 1995). *Mononegavirales*-lahkoon kuuluu lisäksi *Filoviridae* (esim. Ebola-virus), *Paramyxoviridae* (esim. sikotauti- ja tuhkarokkovirukset) ja *Rhabdoviridae* (esim. rabies-virus) -heimot (taulukko 1). Tähän lahkoon kuuluvien virusten genomi on segmentoitumaton ja muodostuu yhdestä negatiivisäikeisestä RNA-molekyylisestä (NNS-RNA -virukset, non-segmented negative strand RNA). Virukset ovat selkärankaisten viruksia, lukuun ottamatta *Rhabdoviridae* -heimoa, johon kuuluu myös kasvien ja selkärangattomien viruksia (Briese ym. 1994, Cubitt ym. 1994, de la Torre 1994, Pringle 1995, Schneemann ym. 1995). Muista tähän lahkoon kuuluvista viruksista poiketen, Borna-viruksen replikaatio ja transkriptio tapahtuvat isäntäsolun tumassa (Briese ym. 1992, Cubitt ja de la Torre 1994).

Taulukko 1. *Mononegavirales* -lahkoon kuuluvat virukset (Pringle ja Easton 1997).

Lahko	Heimo	Alaheimo	Suku
<i>Mononegavirales</i>	<i>Bornaviridae</i>		<i>Borna-virus</i>
	<i>Filoviridae</i>		<i>Marburgvirus</i> <i>Ebolavirus</i>
	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i> <i>Morbillivirus</i> <i>Rubulavirus</i>
		<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i> <i>Metapneumovirus</i>
	<i>Rhabdoviridae</i>		<i>Vesiculovirus</i> <i>Lyssavirus</i> <i>Ephemerovirus</i> <i>Novirhabdovirus</i> <i>Cytorhabdovirus</i> <i>Nucleorhabdovirus</i>

1.2. Rakenne ja genomi

Borna-virus on pyöreä, keskimäärin 90 - 130 nm halkaisijaltaan oleva vaipallinen virus, jonka pinnassa on kahdenlaisia 7 nm:n mittaisia glykoproteiinipiikkejä. Viruksen genomia ympäröi 4 nm:n paksuinen nukleokapsidi (Gonzalez-Dunia ym. 1997b, Kohno ym. 1999). Tietokoneella tehty malli Borna-viruksesta on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Borna-viruksen rakenne (Kuva: Ludvig ja Bode 1997).

Viruksen genomi on segmentoitumaton ja muodostuu yhdestä 8910 emäksen mittaisesta negatiivisäikeisestä RNA-molekyylistä. Genomi sisältää koodaavat sekvenssit kuudelle virusproteiinille, jotka ovat nukleoproteiini p40 (N), negatiivinen säätelyproteiini p10 (X), fosfoproteiini p23/24 (P), matriksiproteiini gp18 (M), glykoproteiini p57 (G) sekä L-polymeraasi (L) (Briese ym. 1994). Genomin proteiineja koodaavat alueet on esitetty taulukossa 2 ja kuvassa 2. Negatiivista säätelyproteiinia lukuunottamatta kaikki muut virusproteiinit löytyvät myös muista *Mononegavirales*-lahkon viruksista (Tordo ym. 1992, Conzelmann 2004).

Taulukko 2. Virusproteiinit ja niitä koodaavat geenit.

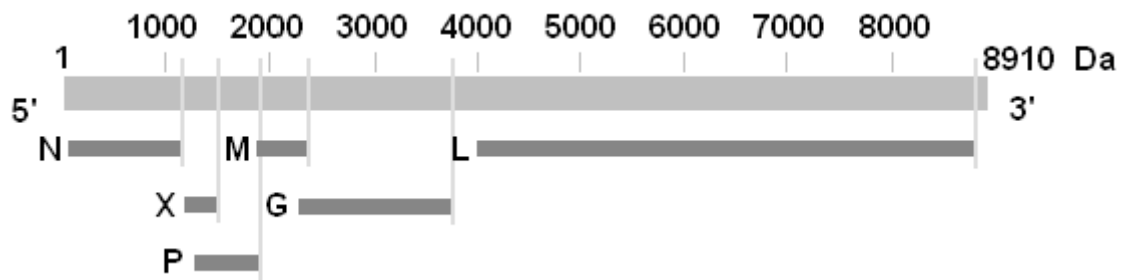
Geeni				Proteiini		
Lokus	Alku	Loppu	Pituus/nukleotidia	Nimi	Pituus/aminohappoa	MW/Da
N	54	1166	1113	p40	370	40808
X	1223	1486	264	p10	87	9254
P	1272	1877	606	p23	201	22358
M	1893	2321	429	gp18	142	16113
G	2236	3747	1512	glykoproteiini (p57)	503	56521
L	3996	8822	4827	L-polymeraasi	1608	180126

Borna-viruksen genomia on tutkittu ympäri maailmaa ja huomattu, että sen nukleotidi- ja aminohapposekvenssit ovat 84,0 %:sta jopa 95,5 %:iin identtisiä kaikkialla (Nowotny ym. 2000, Staeheli ym. 2000). Viruksen genomi on siis poikkeuksellisen stabiili riippumatta sen isäntäeläimestä tai maantieteellisestä sijainnista (de la Torre ym. 1996, Formella ym. 2000).

1.3. Virusproteiinit

Virusproteiinien synteesi tapahtuu kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa viruksen nukleinihapposynteesin aikana isäntäsolu tuottaa pieniä määriä katalyyttisiä virus-spesifisiä entsyymejä, joita tarvitaan replikaatiossa. Virusinfektion toisessa vaiheessa tuotetaan suuria määriä muita virusproteiineja, kuten viruksen rakenneproteiineja.

Nukleoproteiini p40 on käännetty monokistronisesta RNA:sta (N), jota edustaa Borna-viruksen ensimmäinen transkriptioyksikkö. Fosfoproteiini p23 on käännetty RNA:n toisesta transkriptioyksiköstä (P/X), joka sisältää koodaavat sekvenssit p23:n lisäksi myös proteiini p10:lle. Glykoproteiinit gp18 ja p57 sekä L-polymeraasi on käännetty RNA:n kolmannesta transkriptioyksiköstä, polykistronisesta RNA:sta (M/G/L), josta on leikattu tarvittaessa pois yksi tai kaksi intronia (Briese ym. 1994, Schneider ym 1994 ja Schwemmler ym. 1998).



Kuva 2. Genomin proteiineja koodaavat alueet.

Nukleoproteiini muodostaa Borna-viruksen genomia suojaavan nukleokapsidin. Tämä yhdessä viruspolymeraasin ja fosfoproteiini p23:n kanssa muodostaa viruksen aktiivisen transkriptio- ja replikaatiokompleksin, ribonukleoproteiinikompleksin (RNP). Viruspolymeraasin transkriptioaktivaattorina toimii fosfoproteiini p23 ja negatiivisena säätelijänä proteiini p10 (Schneider ym. 2004, Perez ja de la Torre 2005, Schwardt ym. 2005).

Nukleoproteiinia ja fosfoproteiinia löytyy infektoituneesta solusta runsaasti, muita vain vähän (Schneider ym. 1994). Nämä p40 ja p23 -proteiinit käynnistävät elimistön immuunipuolustuksen reaktiot ja siten toimivat antigeeneina elimistön tuottamille vasta-aineille (Ludwig ja Bode 2000, Johansson ym. 2002).

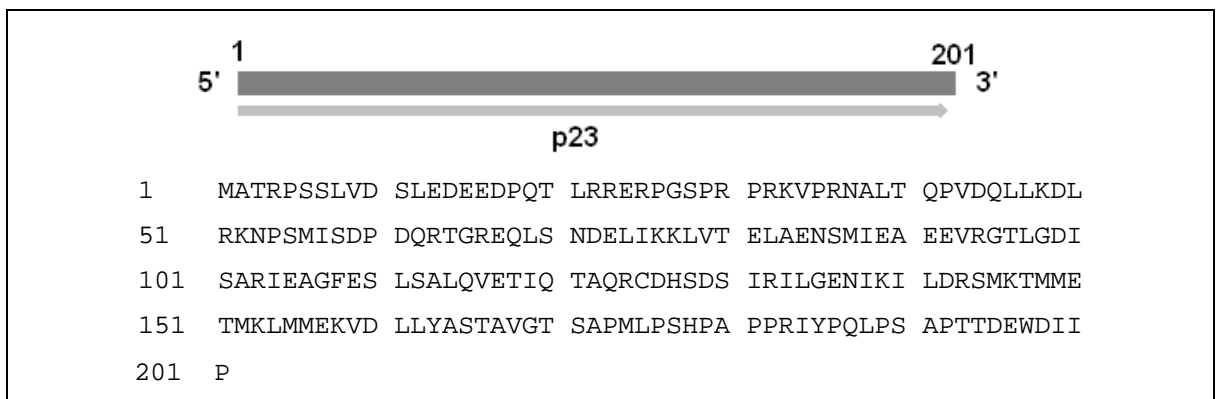
Borna-viruksen kolmannen transkriptioyksikön koodaama proteiini gp18 on matriksiproteiinin tyylinen glykosyloitu proteiini, jota löytyy viruksen membraanin sisäpuolelta. Muilla *Mononegavirales*-lahkon viruksilla vastaavaa matriksiproteiinia ei glykosyloida (Kliche ym. 1994).

Myös glykoproteiini p57 on käännetty RNA:n kolmannelta transkriptioyksiköstä, osittain samoista sekvensseistä matriksiproteiini gp18:n kanssa. Infektoituneista soluista löytyy kahta erikokoista glykoproteiinia, GP-84 ja GP-43 (Gonzalez-Dunia ym. 1997b). GP-84 vastaa koko geenin (G) koodaamaa glykosyloitua proteiinia, kun taas GP-43 on GP-84:n C-terminaalista solun furiini -proteaaasin avulla leikattu ja myöhemmin glykosyloitu osa (Gonzalez-Dunia ym. 1998 ja Richt ym. 1998).

Nämä glykoproteiinit muodostavat viruksen pinnan piikit ja vastaavat viruksen pääsystä solun sisään. GP-84:n avulla virus tarttuu solun pinnan reseptoreihin ja GP-43 on mukana pH-riippuvaisessa fuusiossa endosytoosin jälkeen (Gonzalez-Dunia ym. 1998 ja Perez ym. 2001). Solussa GP-84 löytyy solulimakalvostolta, kun taas GP-43 löytyy solun pinnalta (Gonzalez-Dunia ym. 1997b).

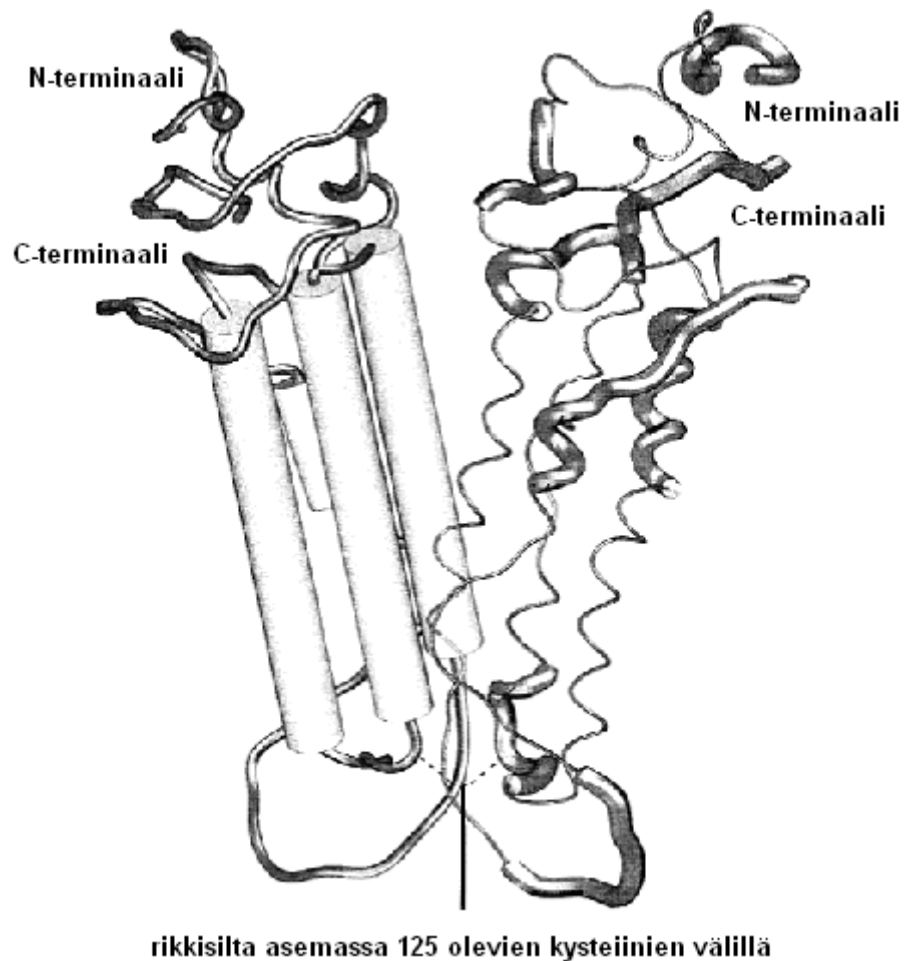
1.3.1. Fosfoproteiini p23

Borna-viruksen fosfoproteiini p23 on käännetty RNA:n toisesta transkriptioyksiköstä (P/X), joka sisältää koodaavat sekvenssit p23:n (P) lisäksi myös proteiini p10:lle (X) (Briese ym. 1994). Sekvenssi koodaa polypeptidiä, jonka massa on 22358 Da. Polypeptidi koostuu 201 aminohaposta, joista suuri osa (16 %) on seriiniä ja treoniinia. Polypeptidin aminohapposekvenssi on esitetty kuvassa 3. Valmiin polypeptidin seriinitähteet ja N-terminaalin happamat aminohappotähteet fosforyloidaan ja proteiini laskostuu lopulliseen muotoonsa. Muita post-translacionaalisia muokkauksia proteiinille ei tehdä (de la Torre 1994, Kliche ym. 1996).



Kuva 3. Proteiini p23:n aminohapposekvenssi.
(<http://au.expasy.org/uniprot/P26668.fas>)

Proteiini p23 esiintyy paitsi monomeerisenä myös dimeerisenä muotona (Lipkin ym 1992, Hsu ym. 1994). Kahden identtisen proteiini p23:n dimerisaation mahdollistaa niiden aminohapposekvenssissä asemassa 125 olevat kysteiinit. Näiden kysteiinitähteiden välille muodostuu sopivissa olosuhteissa rikkisilta, joka sitoo rakenteet yhteen muodostaen 40 kDa proteiinin (Kliche ym. 1996). Fosfoproteiinin p23 dimeerinen rakenne on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Fosfoproteiini p23:n dimeerinen rakenne (kuva: Kliche ym. 1996).

1.4. Lisääntyminen

Borna-virus menee soluun reseptorivälitteisellä, pH-riippuvaisella endosytoosilla. Se tarttuu spesifisesti solun pinnan reseptoreihin glykoproteiini GP-84:n avulla ja pääsee solun sisälle solukalvosta muodostuneessa endosomissa. Syntyneen endosomin sisälle työntyvät vety-ionit aiheuttavat pH:n laskun ja mahdollistavat siten endosomin kalvon ja viruksen vaipan fuusioitumisen (Gonzalez-Dunia ym. 1997b, Perez ym. 2001). Endosomin hajoamisen seurauksena viruksen genomi vapautuu ribonukleoproteiini (RNP) -muodossa solun sytoplasmaan (Cubitt ja de la Torre 1994). Vapautuneet RNP-segmentit kuljetetaan tämän jälkeen solun tumaan niissä olevan tumalokalisaatiosignaalin ohjaamina. Tumassa tapahtuvat viruksen transkriptio ja replikaatio (Cros ja Palese 2003).

Borna-virus on negatiivisäikeinen RNA-virus, joten sen sisältämä RNA ei itsessään ole infektiivistä, koska se ei voi toimia suoraan translaatiossa. Viruksen RNA on RNP -kompleksissa, joka sisältää lisäksi kahdenlaista RNA-synteesiä katalysoivaa RNA-polymeraasia. Negatiivisäikeen mukaisesti tuotetaan lähetti-RNA-molekyylejä, jotka transloidaan solun sytoplasmassa viruksen proteiineiksi. RNA-polymeraasi katalysoi lisäksi koko genomien pituisen komplementaarisen säikeen tuottamista. Tämän tehtävä on olla edelleen mallina uusille negatiivisäikeille uusien virusten tuottoa varten. Viruksen genomien monistaminen tapahtuu muihin *Mononegavirales*-lahkon viruksiin verrattuna poikkeuksellisesti solun tumassa (Cubitt ja de la Torre 1994, Cros ja Palese 2003, Whelan ym. 2004).

Borna-virus on vaipallinen virus, joten syntyneet virukset vapautuvat ulos solusta silmukoitumalla. Se ei tuhoa isäntäsolua, vaan uusien virusten tuotto voi jatkua pitkäänkin. Silmukoitumisessa viruksen genomista ja rakenneproteiineista koostuvat nukleokapsidit vaeltavat solukalvolle, johon viruksen vaippaproteiinit ovat keräytyneet. Nukleokapsidit tunnistavat solukalvolta spesifisesti vaipan glykoproteiinit ja solukalvosta kuroutuu vaippa nukleokapsidin ympärille. Valmis virus irtoaa isäntäsolusta eksosytoosilla. Vaippa koostuu siis isäntäsolun solukalvosta, mutta sen proteiinit ovat viruksen itsensä tuottamia glykoproteiineja.

2. Bornan tauti

2.1. Historia

Bornan tauti on kuvattu ensimmäisen kerran vuonna 1722 Etelä-Saksassa hevosia ja lampaita tappavana neurologisena sairautena. Tauti on nimetty saksenilaisen pikkukaupungin Bornan mukaan, jossa suuri määrä hevosia kuoli epidemiaan vuonna 1885. Borna-viruksen tieteellinen tutkimus alkoi kuitenkin vasta kymmenen vuotta myöhemmin, vuonna 1895.

Viruksen etiologia todistettiin 1900-luvun alussa, kun Saksan Giessenissä Zwick tutkimusryhmänsä kanssa onnistui tartuttamaan koe-eläimelle Bornan taudin siirtämällä aivohomogenaattia infektoituneesta hevosesta kaniin vuonna 1924. Tästä alkoi systemaattinen Bornan taudin tutkimus (Zwick 1939, Gellert 1995, Rott ja Becht 1995).

Muita virustanpylväitä Bornan taudin tutkimuksessa ovat olleet viruksen kasvun demonstraatio soluviljelmässä (Mayr ja Danner 1972, Ludwig ym. 1973, Herzog ja Rott 1980) ja tieto siitä, että Bornan tauti aiheutuu T-solu-riippuvaisesta immuunimekanismista (Narayan ym. 1983, Richt ym. 1989, 1990 ja 1992). Bornan taudin aiheuttaja on karakterisoitu hiljattain vahvasti neurotrooppiseksi Borna-virukseksi (Lipkin ym. 1990, VandeWoude ym. 1990, Richt ym. 1993, Briese ym. 1994, de la Torre 1994 ja Schneemann ym. 1995). Bornan taudin on todettu aiheuttavan keskushermostosairauksia monilla eri eläinlajeilla ja jopa ihmisillä ympäri maailmaa (Rott ja Becht 1995, Gonzalez-Dunia ym. 1997a, Hatalski ym. 1997, Richt ym. 1997, Staeheli ym. 2000, Richt ja Rott 2001).

2.2. Tartunta

Borna-viruksen tartuntatietä ei ole vielä varmaksi todistettu. Tärkeimpänä tartuntareittinä pidetään nenänsisäistä infektiota, koska luonnollisesti infektoituneiden hevosten limakalvoilla näkyy tulehdus jo infektion alkuvaiheessa (Rott ja Becht 1995). On myös ehdotettu, että eläimet saattaisivat saada tartunnan kosketuksesta ruumiineritteiden, kuten silmä- ja sieraineritteiden sekä syljen kanssa, sillä näiden on todettu sisältävän Borna-viruksen RNA:ta. Eläimet voivat saada tartunnan suorasta kontaktista näihin eritteisiin tai altistumalla kontaminoituneelle ruualle tai vedelle (Sierra-Honigmann ym. 1993).

2.3. Leviäminen

Borna-virus on vahvasti neurotrooppinen ja soluvälitteinen virus, jonka tartunta johtaa koko keskushermoston krooniseen pysyvään infektoitumiseen. Virus infektoi hajuhermopäätteitä ja kulkee aksoneita pitkin keskushermostoon, jossa se lisääntyy ja leviää. Virus voi levitä myös lopulta koko perifeeriseen hermostoon, sekä infektoida lisäksi perifeerisen veren valkosoluja ja perifeerisiä elimiä. Heikentynyt vastustuskyky edesauttaa viruksen leviämistä (Carbone ym. 1987, Gosztonyi ja Ludwig 1995, Rott ja Becht 1995, Stitz ym. 1998, Vahlenkamp ym. 2000).

2.4. Epidemiologia

Bornan tautia on pitkään pidetty hevosten tautina. Sitten on havaittu viruksen aiheuttavan tautia myös monille muille nisäkkäille kuten lampaille, vuohille, naudoille, kaneille, kissoille, hirvieläimille, alpakoille, laamoille, virtahevoille, laiskiaisille, strutseille, koirille ja ilveksille. Kokeellisesti tautia on saatu tartutettua lisäksi apinoille, rotille, hiirille ja kananpojille (Richt ym. 1992, Rott ja Becht 1995).

Tautia on ilmennyt pääasiassa Saksassa sekä Itävallassa ja Sveitsissä. Viime vuosikymmenellä tautia on havaittu lisäksi Ruotsissa, Iso-Britanniassa ja Japanissa (Reeves ym. 1998, Berg ym. 1999, Nakamura ym. 1999, Degiorgis ym. 2000, Hagiwara ym. 2000).

Oireettomilta eläimiltä on löytynyt Borna-viruksen vasta-aineita ja/tai viruksen RNA:ta Yhdysvalloissa, Iranissa, Israelissa, Japanissa ja Pohjois-Afrikassa. Viruksen arvellaankin levinneen jo maailmanlaajuisesti (Nakamura ym. 1995, Bahmani 1996, Staeheli ym. 2000).

Saksassa, Yhdysvalloissa ja Japanissa Borna-viruksen vasta-aineita on löydetty ihmisiltä, joilla on neuropsykiatrisia oireita, kuten skitsofreniaa tai maanis-depressiivisyyttä. Myös oireettomilta ihmisiltä on löydetty vasta-aineita, joskin oireilevia vähemmän (Boucher ym 1999, Staeheli ym. 2000).

Saadut tutkimustulokset ovat ristiriitaisia, koska kaikkialla taudin tai vasta-aineiden esiintyvyyttä ei ole tutkittu. Myöskään menetelmiä niiden tutkimiseen maailmanlaajuisesti ei ole vielä standardoitu (Staeheli ym. 2000).

2.5. Taudinkuva

Bornan tauti on Borna-viruksen aiheuttama harvinainen etenevä aivotulehdus. Tauti on osittain immuunivälitteinen, joten tartunnan saaneen eläimen perimästä ja immuniteetistä johtuen se aiheuttaa joko akuutin tai kroonisen, jopa kuolemaan johtavan aivotulehduksen. Tauti voi olla myös kokonaan oireeton (Stitz ym 1995). Borna-virus viihtyy erityisesti hermosoluissa, joten taudin oireet ovat pääasiassa vaihtelevia hermosto-oireita kuten liikkumis- ja syömisvaikeuksia, pakkoliikkeitä, halvauksia ja kouristuskohtauksia (Gosztanyi ja Ludwig 1995, Rott ja Becht 1995). Bornan tauti aiheuttaa lisäksi myös käyttäytymismuutoksia kuten apaattisuutta, depressiivisyyttä ja aggressiivisuutta (Rubin ym. 1993, Pletnikov ym. 1999, Hornig ym. 2001 ja Sauder ym. 2001). Oireet ovat monimuotoisia ja vaihtelevat yksilöiden välillä ja jopa samalla yksilöllä. Mitään selkeää ja varmaa oiretta tartunnan toteamiseen ei ole. Bornan tauti voi tarttua myös ihmiseen (Rott ja Becht 1995, Staeheli ym. 2000). On epäilyksiä, että se olisi yhteydessä joihinkin ihmisen psyykkisiin sairauksiin, kuten autismiin, skitsofreniaan ja maanis-depressiivisyyteen (Rott ym. 1985, Bode ym. 1995, Bode ym. 2000, Ludwig ja Bode 2000, Carbone 2001, Hornig ym. 2001, Lipkin ym. 2001).

3. Immuunipuolustus

Kaikkialla elinympäristössämme on mikrobeja kuten viruksia ja bakteereja. Suurin osa mikrobeista on harmittomia, mutta jotkut ovat patogeenisia. Näitä taudinaiheuttajia vastaan on olemassa monia eri puolustautumismuotoja ja osa niistä on valmiina jo ennen patogeenin saapumista elimistöön kuten esimerkiksi fagosytoivat solut. Kaikilla eläimillä on myös opittu immuniteetti, jossa ensimmäisen kerran elimistöön saapuva vieras-aine eli antigeeni aiheuttaa vastaainemuodostuksen. Nämä vasta-aineet säilyvät elimistössä ja kohdatessaan saman antigeenin toistamiseen ne tunnistavat sen ja käynnistävät tehokkaan puolustuksen.

Saavuttuaan elimistöön, vieras-aine joko menee solun sisään tai kulkee verenkierrassa kunnes se tunnistetaan vieraaksi ja fagosytoidaan. Kiertävä antigeeni voi tarttua myös B-solun antigeenireseptoriin ja käynnistää vasta-ainetuotannon. Solun sisään kulkeutunut antigeeni pilkotaan peptideiksi, jotka kuljetetaan solun pinnan MHC-molekyyleihin (major histocompatibility complex). Ohi kulkevat T-solut aktivoituvat tunnistessaan MHC-peptidi-kompleksin solun pinnasta ja riipuen MHC-luokasta, ne joko tuhoavat solun tai stimuloivat B-soluja tuottamaan vasta-aineita (Metzger 1990, Liu ym. 1991, Rajewsky 1996).

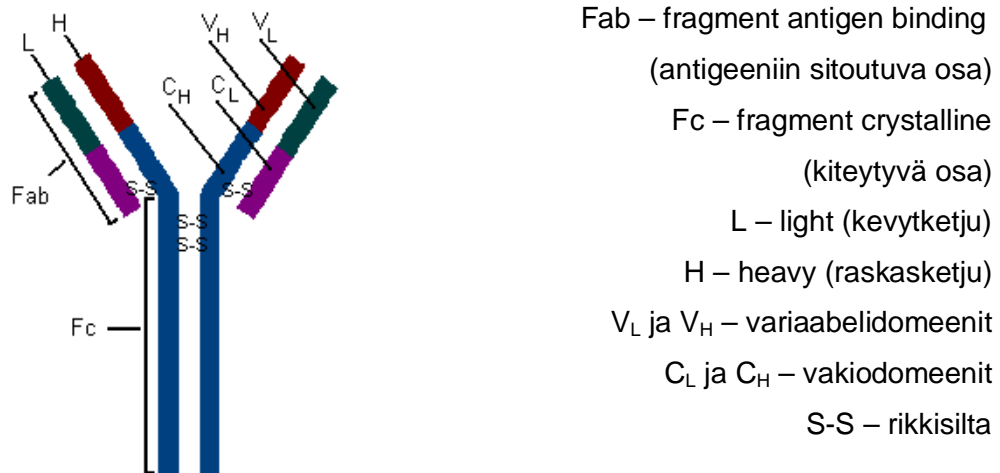
MHC-molekyylit ovat peptidispesifisiä reseptoreita, jotka sitovat itseensä peptidejä solun sisältä ja kuljettavat ne sitten solun pinnalle. MHC-molekyylejä on kahdenlaisia. Solun pinnalla oleva MHC I-peptidi-kompleksi on merkki tappaja-T-soluille tuhota solu, kun taas MHC II-peptidi-kompleksi aktivoi auttaja-T-solut stimuloimaan B-soluja vasta-ainetuotantoon (Morris ym. 1986, Abbas 2003).

B-solujen pinnalla on antigeenireseptoreita, jotka tunnistavat vierasta materiaalia kohdatessaan sen. Antigeenireseptorit ovat immunoglobuliineja, joiden variaatioita on ääretön määrä. Kuitenkin yhden solun pinnalla on vain yhdenlaista immunoglobuliinia. B-solun tunnistettua antigeenin, se alkaa jakautua ja tuottaa vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä juuri kohdatulle antigeenille (Vitetta ym. 1991). T-soluja on kahdenlaisia, joista toiset ovat auttajasoluja (CD4) ja toiset tappajasoluja (CD8). Osa auttaja-T-soluista aktivoi B-soluja vasta-ainetuotantoon ja osa stimuloi tappaja-T-soluja sekä makrofageja tuhoamaan solut, joiden sisällä patogeenit ovat (Parker 1993).

3.1. Vasta-aineet

Vasta-aineet koostuvat neljästä polypeptidiketjusta, joista kaksi on identtisiä kevytketjuja (L=light) ja kaksi identtisiä raskasketjuja (H=heavy). Polypeptidiketjuja yhdistävät rikkisillat. Vasta-aine jaetaan kahteen alueeseen niiden tehtävän mukaan. Fab (fragment antigen binding) osia on kaksi identtistä, jotka koostuvat variaabeli- (V_L ja V_H) ja vakiodomeeneista (C_L ja C_H).

Variaabelidomeenin rakenne on antigeenispesifinen, joten se toimii antigeenin tunnistus- ja sitoutumisalueena. Fc (fragment crystalline) osan rakenteen perusteella vasta-aineet jaetaan eri Ig-luokkiin (Poljak 1991, Davies ja Chacko 1993). Vasta-aineen rakenne on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Vasta-aineen rakenne.

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) jaetaan viiteen eri luokkaan, joilla kullakin on oma tehtävänsä elimistössä. IgM muodostuu aina ensimmäisenä uusissa infektioiden, mutta sen tasot laskevat pian ensikontaktin jälkeen. IgG on yleisin ihmisen immunoglobuliini. Sen tasot nousevat infektioiden ja se voi säilyä taudinaiheuttajasta riippuen muutamista kuukausista jopa vuosiin. IgG-tasot eivät siis aina kerro mahdollisesta uudesta infektiosta, vaan antigeenialtistus on saattanut tapahtua jopa vuosia aiemmin (Davies ja Metzger 1983). Lisäksi on olemassa IgA, joka toimii limakalvojen suojaustehtävissä, IgE, joka on mukana allergisissa reaktioissa sekä IgD, jolla ei tietyllä tavalla ole mitään erityistehtävää (Stavnezer 1996).

Vasta-aineiden tehtävänä elimistössä on neutraloida sinne saapuvat mikrobit ja toksiniit eli estää patogeenien haitallinen toiminta sitoutumalla niiden antigeeniin osiin. Vasta-aineet auttavat myös tuhoamaan vieraita tai kontaminoituneita soluja opsonoimalla eli merkitsemällä ne fagosytoivien solujen syötäviksi, sekä aktivoimalla vieraita soluja tuhoavan immuunipuolustuksen järjestelmän eli komplementin. Lisäksi vasta-aineet voimistavat tulehdusreaktiota (Davies ja Chacko 1993).

3.2. Borna-viruksen aiheuttama immuunivaste

Bornan tauti aiheutuu T-soluvälitteisestä immuunipuolustuksen reaktiosta. Borna-viruksen aiheuttamassa infektiossa muodostuu ensimmäisenä solun pinnan MHC I -molekyylien indusoimia CD8+ T-soluja. Näitä spesifisiä tappajasoluja on havaittavissa jo kolme vuorokautta infektion jälkeen. CD8+ T-solut yhdessä makrofagien kanssa tuhoavat viruksen sisältäviä soluja aiheuttaen vakavaa kudostuhoa (Bilzer ja Stitz 1993, 1994).

Virusproteiineja p23 ja p40 tuotetaan suuria määriä Borna-virusinfektiossa. Viruksen nukleoproteiinia p40 on havaittavissa jo kuudesta kymmeneen ja fosfoproteiinia p23 viidentoista vuorokauden kuluttua tartunnasta. B-solut tuottavat CD4+ T-solujen aktivoimina spesifisiä vasta-aineita näitä virusproteiineja vastaan. Ensimmäiset vasta-aineet voidaan havaita jo kahden - kolmen viikon kuluttua tartunnasta (Carbone ym. 1993, Stitz ym. 1991, Hatalski ym. 1995).

4. Virusserologia

Virusinfektion diagnosointi perustuu joko viruksen osien, koko viruksen tai elimistön sitä vastaan tuottamien vasta-aineiden osoitukseen. Kokonainen virus voidaan nähdä elektronimikroskoopilla suoraan paljon viruksia sisältävästä näytteestä tai siitä tehdystä virusviljelystä. Virus koostuu nukleiinihaposta ja proteiineista. Nukleiinihapot voidaan osoittaa joko suoralla hybridisaatiolla tai geenimonistusmenetelmällä. Näistä jälkimmäinen on tärkeä menetelmä sellaisten virusten diagnosoinnissa, joita ei pystytä viljelemään. Virusproteiinien osoitus taas voidaan tehdä serologisesti, virusspesifisten vasta-aineiden käyttöön perustuvilla immunologisilla menetelmillä (Baron 1994, White ja Fenner 1994).

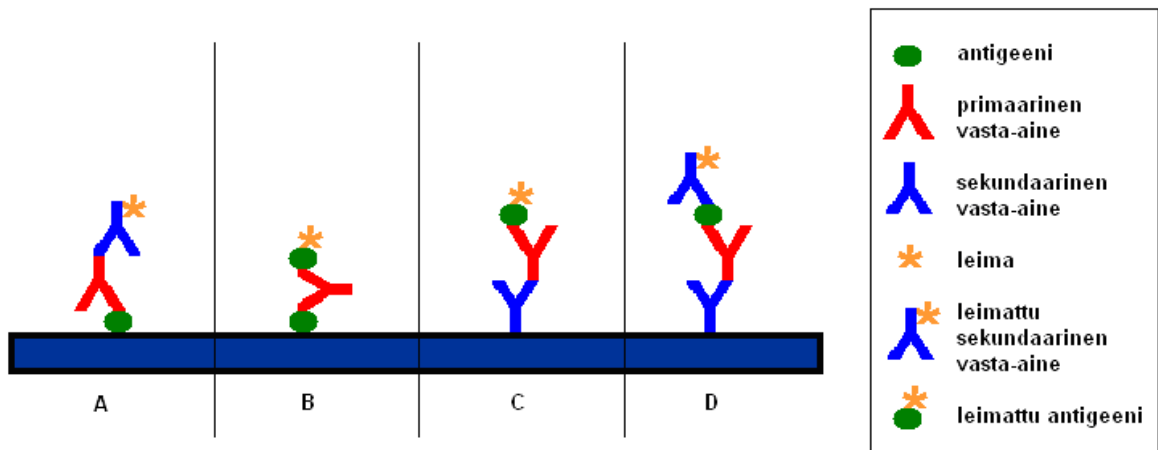
Vierasaineen pääsy elimistöön aiheuttaa vasta-aineiden muodostumisen. Näiden vasta-aineiden havaitsemiseksi seerumista ja siten mahdollisen infektion toteamiseksi on kehitetty monenlaisia menetelmiä. Perusta kaikilla menetelmillä on kuitenkin sama, kiinnittää vasta-aineeseen havaitsemisen mahdollistava molekyyli.

Vasta-aineiden määritysmenetelmät nimetään yleensä niissä käytettävän leiman mukaan. Entsyymileimaa käyttävä menetelmä on yleisesti EIA (Enzyme ImmunoAssay) tai vanhalta nimeltään ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Poikkeuksena tästä kuitenkin luminesenssiin perustuva leimaus lusiferaasientsyymillä eli LIA (Luminescence ImmunoAssay). Radioaktiiviseen leimaan perustuva detektointimenetelmä on RIA (Radio ImmunoAssay) ja vastaavasti fluorokromilla tapahtuva detektointi on FIA (Fluorescence ImmunoAssay) tai enemmän käytetty IFA (ImmunoFluorescence Assay). Näiden lisäksi on olemassa suuri joukko muita sovelluksia ja nimiä niille (Lequin 2005). Vaikka eri leimausmenetelmiin perustuvat määritykset nimetään eri tavalla, usein käytetään kuitenkin yleisnimitystä EIA tai ELISA tarkoitettaessa kaikkia kiinteällä faasilla tapahtuvia vasta-ainemäärityksiä (Lequin 2005).

4.1. EIA

Vasta-aineiden detektoimiseksi seerumista, ne voidaan sitoa eri tavoilla kiinteään faasiin. Epäsuorassa (Indirect EIA) menetelmässä (kuva 7A) vasta-ainetta sitova antigeeni immobilisoidaan kiinteään faasiin. Näytteestä antigeeniin tarttuva vasta-aine eli primaarinen vasta-aine detektoidaan siihen kiinnitettävän leimatun sekundäärisen vasta-aineen eli konjugaatin avulla. Vasta-aine on homodimeeri, joten sen kahteen identtiseen variaabelidomeeniin voi tarttua samanlainen antigeeni. Vasta-aine voidaan detektoida antigeenin päältä siten myös sitouttamalla siihen vastaava antigeeni leimattuna (kuva 7B). Kaappausmenetelmässä (Capture EIA) kiinteään faasiin kiinnitetään sekundäärinen vasta-aine, johon seerumin vasta-aine sitoutuu.

Tällainen sitoutuminen on epäspesifistä, mutta primaarisen vasta-aineen detektointi suoritetaan sille spesifisen antigeenin avulla joko leimatulla antigeenilla (kuva 7C) tai antigeeniin kiinnittyvällä leimatulla sekundäärisellä vasta-aineella (kuva 7D) (Hornbeck 1992, Goldsby ym. 2000).



Kuva 7. Primaarinen eli seerumissa oleva vasta-aine voidaan osoittaa eri menetelmillä kiinteän faasin pinnalla.

Kiinteäksi faasiksi sopii melkein mikä tahansa pinta, johon sidottava molekyyli pystyy tarttumaan. Tällaisia ovat esimerkiksi muovi ja lasi. Käytettävä faasimateriaali riippuu siihen sidottavan molekyylin ja testimenetelmän, sekä testauksessa käytettävien reagenssien ominaisuuksista.

4.1.1. Kiinteä faasi

Muovista valmistetaan esimerkiksi paljon käytettyjä mikrotiiterilevyjä. Näiden toiselta nimeltään kuoppalevyjen yleisin materiaali on kova ja läpinäkyvä polystyreenimuovi. Mikrotiiterilevyllä on yleensä 96 kuoppaa, joissa reaktiot ja pesut voidaan suorittaa. Immonohistokemiassa kiinteänä faasina käytetään yleisesti lasista valmistettuja mikroskooppilevyjä, joiden pintaan kudosteille voidaan immobilisoida ja osoittaa vasta-aineet siitä. Kiinteä faasi voi koostua myös liuoksessa olevista partikkeleista, joiden pintaan haluttu molekyyli sidotaan. Tällaisia partikkeleita ovat esimerkiksi raudasta valmistetut magneettipartikkelit, joita voidaan liikuttaa paikasta toiseen magneetin avulla. Partikkeleita voivat olla myös lateksi- tai kultakolloidihiuksiset. Kiinteänä faasina voi toimia myös huokoinen kalvo. Immunoblottauksessa molekyylit imeytetään elektroforeesigeelistä kalvolle ja määritetään vasta-aineet kalvon pinnalta niiden avulla. Pikatesteissä taas tutkittavat molekyylit liikkuvat kalvon pintaa pitkin ja osoitetaan siihen kiinnitettyjen leimattujen molekyylien avulla (Goldfarb 1988, Hornbeck 1992, Zhang ja Meyerhoff 2006).

Molekyyli voi sitoutua kiinteään faasiin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien kuten varauksen mukaan. Jos näin ei tapahdu, voidaan molekyyliin liittää tarttumista edistävä rakenne tai muuttaa kiinteän faasin sitomisominaisuuksia. Molekyyliin liitettävä rakenne voi olla uusi sekvenssi, joka sitoo molekyylin suoraan kiinteään faasiin. Molekyylin immobilisoinnissa voidaan käyttää hyväksi myös avidiinin/streptavidiinin ja biotiinin vahvaa kompleksinmuodostuskykyä kiinnittämällä biotiini molekyyliin ja avidiini/streptavidiini kiinteään faasiin tai toisinpäin (Suter ym. 1989, Butler ym. 1992).

Kiinteän faasin ominaisuuksia voidaan muuttaa säteilyttämällä. Esimerkiksi gamma- ja UV-säteily pilkkoo polystyreenin hiiliketjuja ja molekyyliin tulee uusia varauksellisia ryhmiä (Bora ym. 2002). Kiinteä faasi voidaan myös pinnoittaa kemiallisesti aktiivisilla ryhmillä kuten primäärisellä amiinilla. Tällöin kiinnitettävä molekyyli (proteiini tai peptidi) sitoutuu siihen reaktiivisten aminohappojensa sivuketjuista (Butler ym. 1992).

4.1.2. Antigeenit ja vasta-aineet

Vasta-ainemäärityksiin käytettävä seerumi on verinäyte, josta on poistettu solut ja hyytymistekijät. Luonnollisen immunitetin seerumin immunoglobuliini-pitoisuudet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Immunoglobuliinien pitoisuudet seerumissa.

Viitearvot g/l	Pitoisuudet g/l		
	IgA	IgG	IgM
Lapset	0.10 - 2.80	2.40 - 15.70	0.30 - 3.00
Naiset	0.52 - 4.02	6.80 - 15.00	0.47 - 2.84
Miehet	0.88 - 4.84	6.80 - 15.00	0.36 - 2.59

(www.yhtyneetlaboratoriot.fi)

Laboratorio-olosuhteissa immunisaatio voidaan tehdä kokeellisesti koe-eläimelle. Tutkittavan viruksen tai bakteerin antigeenisia osia kuten pintaproteiineja ruiskutetaan koe-eläimeen ja tietyn ajan kuluttua eläimelle muodostuu immunitetti kyseistä patogeenia vastaan.

Eläimeltä otettu verinäyte sisältää käytettyjä antigeeneja vastaan tuotettuja vasta-aineita ja voidaan käyttää tutkimustarkoituksiin. Saatu seerumi on polyklonaalinen, jolloin se sisältää vasta-aineita useaa epitooppia kohtaan. On olemassa myös monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat spesifisesti vain yhden epitoopin (Anderson ym. 1983).

Antigeeni, joka aiheuttaa vasta-ainemuodostuksen, voi olla melkein mikä tahansa elimistölle vieras molekyyli. Yleisesti antigeenisia komponentteja ovat virusten ja bakteerien pintaproteiinit, joten näitä käytetään paljon serologisissa testauksissa. Proteiiniantigeeneja voidaan tuottaa rekombinanttitekniikalla tutkimuksia varten (Haynes ym. 2007).

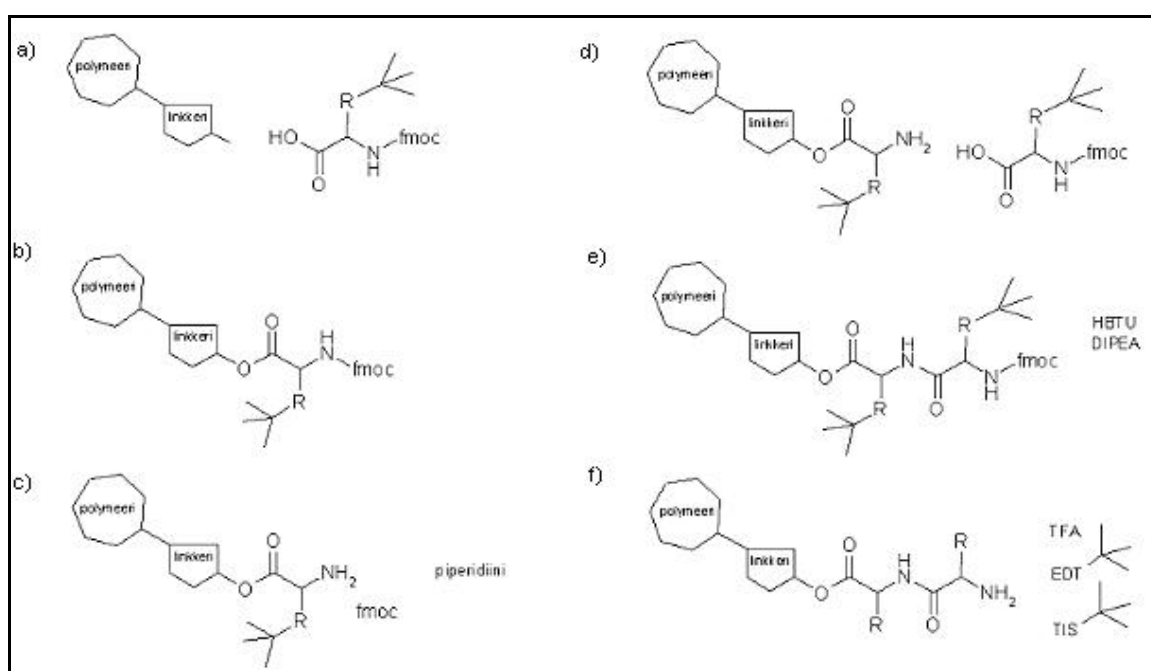
Vasta-aineet eivät sitoudu koko proteiiniin vaan tunnistavat niille spesifiset alueet eli epitoopit proteiinin pinnalta ja sitoutuvat näihin (Poljak 1991, Davies ja Chacko 1993). Proteiini voidaan pilkkoa peptideiksi ja käyttää saatuja peptidiantigeeneja vasta-ainemäärityksiin. Peptidiantigeeneja voidaan myös syntetisoida halutun sekvenssin mukaan (Mitchell ym. 1992). Peptidit syntetisoidaan yleensä kiinteään faasin peptidisynteesillä käyttäen Fmoc- tai tBoc-menetelmää ja puhdistetaan kromatografisesti.

Kiinteään faasin peptidisynteesi (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) (kuva 8) voidaan suorittaa joko manuaalisesti tai automaattisella peptidisyntetisaattorilla. Peptidisynteesi alkaa liittämällä ensimmäinen suojattu aminohappo karboksyyli-terminaalistaan liukenemattomaan polymeeriin (resiiniin) (kuva 8a) kovalenttisen sidoksen muodostavan linkkerin avulla (kuva 8b). Valmiiksi linkattuja resinejä on myös kaupallisesti saatavilla.

Seuraavien aminohappojen liittäminen peptidiin koostuu aina kahdesta vaiheesta. Ensimmäisessä vaiheessa peptidiketjuun aiemmin liitetystä aminohaposta poistetaan aminoterminaalien suojaryhmä siihen tarkoitetulla reagenssilla (kuva 8c). Toisessa vaiheessa uusi aminoterminaalistaan suojattu aminohappo (kuva 8d) liitetään aktivointireagenssien avulla edelliseen aminohappoon, jolloin niiden välille muodostuu amidi- eli peptidisidos (kuva 8e). Vaiheita jatketaan kunnes peptidin sekvenssi on halutun mukainen.

Synteesin viimeisestä peptidistä irrotetaan aminoterminaalin suojaryhmän lisäksi myös aminohappojen sivuketjujen suojaukseen käytetyt suojaryhmät ja valmis peptidi irrotetaan resiinistä (kuva 8f) (Merrifield 1963).

Fmoc-menetelmää (kuva 8) käytettäessä aminohappojen aminoterminaalit suojataan Fmoc (9-fluorenyylimetyylioksikarbonyyli) -suojaryhmillä, jotka voidaan poistaa ammoniakin tai piperidiinin avulla. Vastaavasti aminoterminaalien suojaukseen käytettävät tBoc (tert-butylioksikarbonyyli) -suojaryhmät voidaan poistaa TFA:n (trifluoretikkahappo) avulla (Chan ja White 2000).



Kuva 8. Dipeptidin synteesi Wang-hartsin päälle Fmoc-menetelmällä.

Aminoterminaalien suojauksen poistoon käytettävät reagenssit on valittava siten, etteivät ne poista sivuketjujen suojaryhmiä tai irrota peptidiä resiinistä. Kaikkien aminohappojen sivuketjuja ei tarvitse suojata. Joidenkin aminohappojen sivuketjujen aktiiviset ryhmät sitä vastoin tarvitsevat ehdottomasti suojauksen ei-toivottujen reaktioiden välttämiseksi. Tällaisia ovat esimerkiksi kysteiinin SH-ryhmät.

4.1.3. Vasta-aineen detektointi

Antigeeni-vasta-aine -kompleksin detektoimiseksi kiinteän faasin pinnalta, vasta-aine on joko leimattava tai siihen on liitettävä leimattu molekyyli, joka on yleensä itsekin vasta-aine. Tämä leimattu sekundaarinen vasta-aine eli konjugaatti tunnistaa tutkittavan vasta-aineen ja sitoutuu siihen. Konjugaattiin kiinnitetty leima voidaan havaita eri menetelmillä käytetystä leimasta riippuen.

Sekundaariseen vasta-aineeseen voidaan liittää entsyymi, joka visualisoidaan värireaktion avulla. Tunnetuimmat entsyymileimat ovat piparjuuriperoksidaasi (HRP) ja alkaalinen fosfataasi (AP). HRP:n substraatti on tetrametyylibentsidiini (TMB), joka reagoi hapen kanssa, värjää liuoksen siniseksi. Hapon lisääminen reaktioon muuttaa värin keltaiseksi, jonka absorbanssi voidaan mitata aallonpituudella 450 nm. AP:n substraatti on paranitrofenyylifosfaatti (p-NPP), joka värjää liuoksen keltaiseksi. Värin absorbanssi voidaan mitata 405 nm:n aallonpituudella (Nakane ja Pierce 1967).

Leimaamiseen sopiva entsyymi on myös lusiferaasi, joka tuottaa valoa ATP:sta vapautuvalla energialla. Syntyvä valo mitataan luminometrilla, jossa valo vahvistetaan valomonistinputken tai fotodiodin avulla (Venisknik ym. 2006). Konjugaatin leima voi olla myös fluoresoiva merkkiaine eli fluorokromi. Yleisiä fluoresoivia molekyyliä ovat esimerkiksi fluoreseiini ja rodamiini, jotka absorboivat tiettyä lyhytaaltoista valoa, yleensä UV-valoa. Eksitaatioaallonpituudella fluorokromi emittoi pitempiaaltoista, näkyvää aallonpituutta, joka voidaan mitata tai havaita esimerkiksi fluoresenssimikroskoopilla (Cobb ja Gotcher 1982).

Vasta-aineen leimaukseen voidaan käyttää lisäksi radioaktiivisia molekyyliä. Yleisimpänä näistä jodi-125, jolla voidaan leimata lysiinin sivuketjun amiiniryhmä tai tyrosiinin sivuketjun hydroksiryhmä (Holmskov-Nielsen ym. 1984).

4.1.4. Menetelmän optimointi

Vasta-aineiden osoitukseen käytettävän menetelmän optimointi on tärkeää toistettavien ja luotettavien tulosten saamiseksi. Edellä esiteltyjen vaihtoehtojen kuten erilaisten kiinteiden faasien ja leimaussysteemien tarkoituksenmukaisen valinnan lisäksi oleellista testin onnistumiseksi ovat myös testausolosuhteet sekä epäspesifisten sitoutumispaikkojen eliminointi. Testausolosuhteiden luomisessa tärkeää on puskureiden valinta, reagoivien aineiden pitoisuuksien, reaktioaikojen ja lämpötilojen optimointi sekä luotettavan laitteiston käyttö (Tuuminen ym. 2000).

Sopivan kiinteän faasin sekä siihen kiinnitettävän antigeenin tai vasta-aineen valintojen lisäksi immobilisoitumiseen vaikuttavat myös kiinnittyvän molekyylin konsentraatio sekä käytettävä puskuri. Konsentraation ollessa liian korkea, osa molekyylistä voi tarttua kiinteään faasiin liian heikosti ja irrota testauksen aikana. Liian matalaa konsentraatiota käytettäessä tulosten havainnointi estyy testin antaman liian matalan signaalin vuoksi.

Puskureiden valintaan vaikuttavat niin kiinteän faasin kuin testimolekyylienkin ominaisuudet. Neutraalien kantajaproteiinien kuten BSA:n (Bovine Serum Albumin) lisääminen puskureihin minimoi epäspesifistä sitoutumista. Samoin pinta-aktiivisten aineiden kuten Tween-20 sisällyttäminen käyttöpuskureihin vähentää epäspesifistä sitoutumista ja siten häiritsevän taustasignaalin muodostumista (Tuuminen ym. 2000).

Testauksessa reagoivien molekyylien optimipitoisuuksiin vaikuttavat myös reaktio- eli inkubaatioaika sekä reaktiolämpötila. Verrattuna huoneenlämmössä tapahtuvaan reaktioon, lämpötilan nosto nopeuttaa reaktiotasapainon saavuttamista. Vastaavasti reaktiolämpötilan lasku hidastaa sitä. Sama vaikutus on myös reagoivien aineiden yli- tai alimäärällä toistensa suhteen. Korkeissa lämpötiloissa (37 °C) ja korkeilla konsentraatioilla epäspesifisten sitoutumisten todennäköisyys kasvaa reaktion nopeutumisen kustannuksella. Molekyylien optimipitoisuuksia voidaan määrittää titraamalla niitä toisiaan vastaan positiivisilla ja negatiivisilla näytteillä (Hornbeck 1992).

Ylimääräisten reagenssien poistaminen reaktioiden välillä on myös tärkeää testin onnistumiseksi. Pesu suoritetaan huuhtelemalla kiinteä faasi useita kertoja tarkoituksenmukaisella pesupuskurilla joko käsin tai koneellisesti. Huuhtelukertojen määrä voi vaihdella tarpeen mukaan.

Pesu voidaan suorittaa myös liottamalla kiinteää faasia pesupuskurissa tarvittava aika, yleensä muutamia minuutteja, sekoituksella tai ilman. Liian useat huuhtelut tai liian pitkä liotus voivat irrottaa kiinteään faasiin sitoutuneet molekyylit (Baunoch ym. 1992).

Menetelmän optimoinnissa tärkeää on myös käytettävien laitteiden ja ohjelmistojen luotettavuus. Testauksista saatavat tulokset on pystyttävä mittaamaan toistettavasti ilman, että laitteisto tai ohjelmisto lisäisi vaihtelua eri testauskertojen välillä. Esimerkiksi entsyymireaktiolla aikaansaadun värin absorbanssin mittaukseen on käytettävä menetelmän optimointivaiheessa sekä testausvaiheessa koko ajan samaa laitetta samoilla asetuksilla suoraan verrannollisten numeeristen tulosten saamiseksi.

5. Biosirut

Microarray-teknologia on mullistanut koko biomolekyylien tutkimuksen mahdollistamalla jopa tuhansien eri molekyylien tutkimisen samanaikaisesti minimaalisen pienillä näyte- ja reagenssimäärillä. Teknologian perustana on kiinnittää pieneen, esimerkiksi lasista tai muovista valmistettuun levyyn eli biosiruun suuria määriä erilaisia molekyyliä, kuten DNA:ta tai proteiineja. Biosiruilla tarkoitetaan usein juuri DNA-siruja, vaikka nykyisin on olemassa jo lukuisia muitakin eri siruteknologian biokemiallisia sovelluksia, kuten solun toimintaa tutkivat solusirut tai proteiineja tutkivat proteiinisirut. Yleisimmin käytössä olevien DNA-sirujen avulla on mahdollista selvittää esimerkiksi, mitkä ihmisen 30 000 geenistä aktivoituvat, kun soluja käsitellään lääkeaineilla. Mahdollisuudet kehittää biosiruille eri sovellutuksia ovat lähes rajattomat (Bacarese-Hamilton ym. 2004, Campbell ja Ghazal 2004, Gabig-Ciminska ym. 2004, Livingston ym. 2005, Yeung ym. 2006).

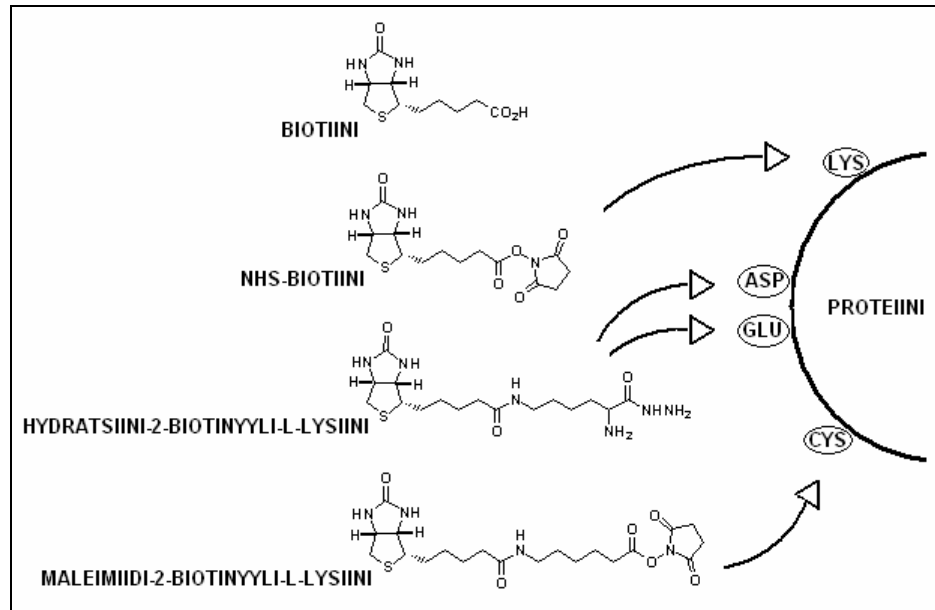
5.1. Antigeenisirut

Eräs microarray-sovellus on antigeenisiru eli mikroimmunofluoresenssi-määritys (MIF) (Wang ja Grayston 1970, Grayston ym. 1990), jossa spesifinen antigeeni kiinnitetään mikroskooppilasilevylle. Antigeeniin sitoutunut vasta-aine detektoidaan sekundaarisella vasta-aineella, johon on konjugoitu fluoresoiva leima.

Antigeeni voidaan immobilisoida mikroskooppilasilevylle usealla eri tavalla. Yksi tapa on hyödyntää biotiinin ja avidiinin/streptavidiinin vahvaa kompleksinmuodostuskykyä hyödyksi käyttämällä biotinyloituja antigeeneja ja pinnoittamalla glutaraldehydi-liuoksella käsitelty lasipinta (strept)avidiinilla.

5.1.1. *Biotiini, avidiini, streptavidiini*

Biotiini eli H tai B₇ -vitamiini on elintärkeä kaikille eläville organismeille. Sen biosynteesi tapahtuu bakteereissa, joissakin sienissä sekä kasveissa. Biotiini on vesiliukoinen molekyyli, joka koostuu rikkiä sisältävästä kaksoisrenkaasta ja orgaanisesta happosivuketjusta (kuva 9). Biotiini voidaan liittää sivuketjunsä avulla moniin eri molekyyliin ilman että sen tai kohdemolekyylin ominaisuudet juuri muuttuvat. Biotiinin sivuketjun happoryhmää voidaan myös muokata reaktiivisemmaksi biotiinijohdannaiseksi (kuva 9). Biotiini toimii kofaktorina sekä avidiinille että streptavidiinille ja sitoutuu niihin kaksoisrenkaansa avulla (Dakshinamurti ja Cauhan 1989, Knowles 1989, Livanh ym. 1993).



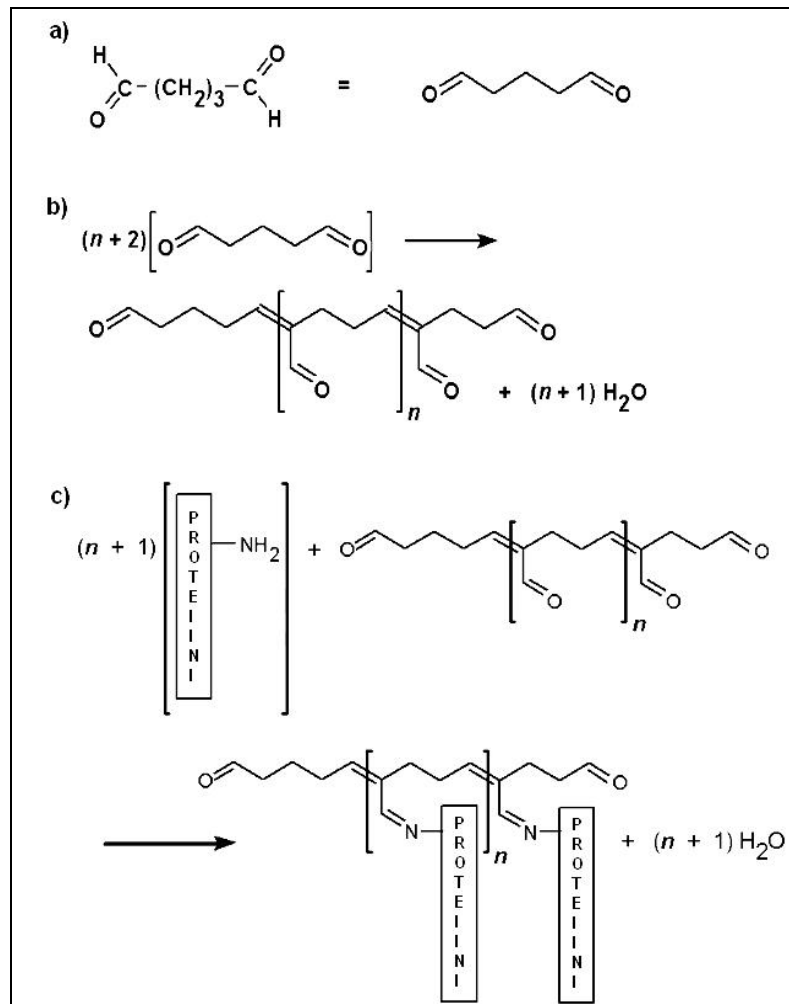
Kuva 9. Biotiini ja eräitä proteiiniin sitoutuvia biotiini johdoksia.

Avidiini ja streptavidiini ovat biotiinia spesifisesti sitovia homotetrameerisiä ja stabiileja proteiineja. Avidiini on (lintujen, liskojen tai sammakkoeläinten) munanvalkuaisen glykoproteiini ja streptavidiini sitä vastoin glykosyloimaton *Streptomyces avidinii* -bakteerista saatava avidiinin proteiinianalogi. Molemmat proteiinit koostuvat neljästä identtisestä alayksiköstä, joista jokainen sisältää yhden tyrosiinitähteeseen perustuvan sitoutumispaikan biotiinille.

Streptavidiinin ja avidiinin ligandinsitomisvoimakkuudet ovat huomattavan suuret, avidiinin affiniteettivakio (K_a) on noin 10^{15} M^{-1} ja streptavidiinin noin 10^{13} M^{-1} . Tästä johtuen ne muodostavat biotiinin kanssa pysyvän kompleksin (Gitlin ym. 1990, Hiller ym. 1991, Livnah ym. 1993).

5.1.2. Glutaraldehydi

Glutaraldehydiä käytetään histologiassa yleisesti kiinnittämään näytteet, kuten solut, mikroskooppilasilevyn pintaan esimerkiksi elektronimikroskopiaa varten. Glutaraldehydi koostuu kahdesta reaktiivisesta aldehydiryhmästä joiden välillä on joustava kolmesta metyleenistä muodostunut hiiliketju ($\text{HCO}-(\text{CH}_2)_3-\text{HCO}$) (kuva 10a). Vesiliuoksessa glutaraldehydi muodostaa erikokoisia polymeerejä (kuva 10b) (Monsan ym. 1975). Polymeerien molemmissa päissä säilyy edelleen aldehydiaktiivisuus ja jokainen vapaa aldehydiryhmä pystyy sitoutumaan yhteen proteiinin typpiryhmään (kuva 10c) (Kiernan 2000).



Kuva 10. Glutaraldehydin polymerisaatio ja proteiinin sitominen.

Materiaalit ja menetelmät

Johdanto

Borna-viruksen diagnosoimiseksi ei ole vielä olemassa varmaa standardoitua menetelmää. Virusinfektio todetaan yleensä sille spesifisten vasta-aineiden osoituksella. Varmuudella virustartunta ja siitä aiheutuva Bornan tauti saadaan kuitenkin diagnosoitua vasta kuolleen eläimen aivonäytteestä. Bornan taudin laboriodiagnostiikka kaipaa vielä lisätutkimusta sekä maailmanlaajuisia standardointia.

Työn tavoitteet

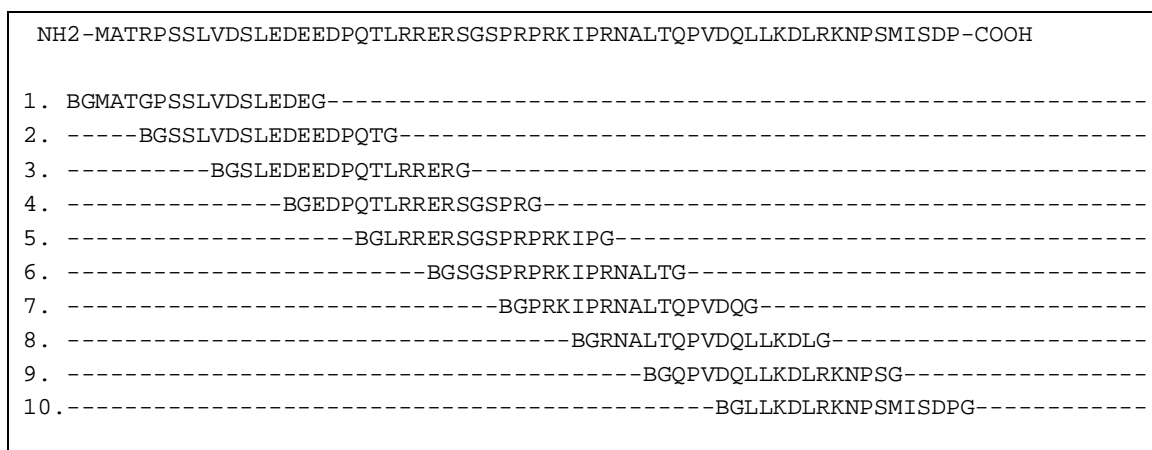
Erikoistyöni tarkoituksena oli kartoittaa Borna-viruksen fosfoproteiini p23:n vasta-aineiden sitoutumispaikat eli epitoopit syntetisoimalla koko proteiinin genomi limittäin peptideiksi ja testaamalla saadut peptidiantigeenit EIA:ssa polyklonaalisella Borna-viruksen fosfoproteiinia vastaan tuotetulla kanin seerumilla epitooppien löytämiseksi.

Vasta-aineet eivät sitoudu koko proteiiniin vaan tunnistavat niille spesifiset alueet eli epitoopit proteiinin pinnalta ja sitoutuvat näihin. Pelkkien epitooppien syntetisointi peptideiksi ja niiden käyttö antigeeneina vasta-ainediagnostiikassa voisi lisätä tulosten oikeellisuutta minimoimalla epäspesifisistä sitoutumisista johtuvat väärät positiiviset tulokset. Tarkoituksenmukaisten epitooppien sekvenssiä vastaavien synteettisten peptidien käyttö serologiassa voisi olla merkittävä apu Borna-viruksen diagnostiikassa.

Lisäksi erikoistyöni tarkoituksena oli kehittää entistä nopeampaa ja edullisempaa virusdiagnostiikkaa soveltamalla perinteistä epäsuoraa EIA-menetelmää microarray-formaattiin mikroskooppilasilevylle hyödyntäen löydettyjä Borna-virus p23-epitooppeja.

6. Peptidiantigeenit

Borna-viruksen fosfoproteiinin p23 koko aminohapposekvenssi oli syntetisoitu 15 aminohapon mittaisiksi (n. 2000 Da) peptideiksi. Näiden peptidien sekvenssit erosivat toisistaan aina viiden aminohapon verran edelliseen verrattuna. Proteiinin koko sekvenssi tuli näin katettua tarkasti 39 limittäisen peptidin avulla. Lisäksi synteessissä liitettiin jokaisen peptidin molempiin päihin rakenteen tueksi glysiini sekä aminoterminaaliin testauksissa tarvittava biotiini. Kuvassa 11 on havainnollistettu kymmenen ensimmäisen peptidin sekvenssin muodostuminen.



Kuva 11. Borna p23 - peptidien aminohapposekvenssien määrittäminen proteiinin sekvenssin mukaan.

Työssä käytetyt peptidit oli syntetisoitu, puhdistettu ja karakterisoitu Kuopion yliopiston kemian laitoksella vuonna 2003. Synteesi tapahtui syntetisaattorilla (APEX 396 DC) käyttäen kiinteän faasin peptidisynteesiä, jossa peptidi syntetisoidaan resiniin pinnalle sekä Fmoc-menetelmää, jossa aminohappojen aminoterminaalien suojaukseen käytetään Fmoc-suojaryhmiä.

Syntetisoidut peptidit oli puhdistettu preparatiivisella HPLC:llä (High Performance Liquid Chromatography) sekä lyofilisoimalla ja liuotettu veteen 5 mg/ml konsentraatioon. Peptidit säilytettiin pakastimessa -18 °C.

6.1. Karakterisointi

Syntetisoidut peptidit oli karakterisoitu synteessin ja puhdistuksen jälkeen vuonna 2003. Pitkän säilytysajan vuoksi peptidien puhtaus tutkittiin ja peptidit karakterisoitiin uudestaan massaspektrometrin (ABI QStar LC-ESI, Applied Biosystems, Foster City, USA) ja analyyttisen käänteisfaasi HPLC:n (Shimadzu, Kioto, Japani) avulla.

Kaikista valmiina olleista peptidiliuoksista otettiin näytteet ja selvitettiin massaspektrometrillä niissä olevien molekyylien molekyylipainot. Oikeaa peptidiä sisältäneiden peptidiliuosten puhtaus tutkittiin analyyttisellä HPLC:llä käyttäen C₁₈-käänteisfaasikolonnia (240 x 1,4 mm, XTerra, Waters, Milford, USA) asetonitriiligradientilla (0-60 % ACN, ChromanormTM, Prolabo, Pariisi, Ranska, ajoaika 30 minuuttia).

6.2. Uudet peptidiantigeenit

Karakterisoinnin perusteella nähtiin mitkä alueet proteiinin sekvenssistä vielä jäivät puuttumaan. Tarvittavat alueet syntetisoitiin uudestaan peptideiksi vastaavalla tavalla kuin alkuperäiset.

6.2.1. Peptidisynteesi

Uusien korvaavien peptidien synteesi tapahtui syntetisaattorilla (APEX 396 DC, Advanced ChemTech, Louisville, USA) käyttäen kiinteän faasin peptidisynteesiä ja Fmoc-menetelmää, kuten alkuperäisessäkin synteessissä.

Syntetisaattori ohjelmoitiin syntetisoimaan peptidit sykleittäin halutun sekvenssin mukaan. Yksi sykli koostui aina yhden aminohapon liittamisestä peptidiketjun perään sekä tarvittavista pesuista ja sekoituksista.

Kiinteänä faasina synteessissä käytettiin Fmoc-Gly-Wang -resiiniä (Advanced ChemTech, Louisville, USA), josta Wang-hartsin irrotuksen jälkeen jää peptidin karboksiterminaaliin glysiini. Aminohappojen (GL Biochem, Shanghai, Kiina) aminoterminaalit oli suojattu Fmoc-suojaryhmillä ja sivuketjut kullekin aminohapolle tyypillisellä suojaryhmällä. Käytetyt aminohapot suojaryhmineen on esitelty taulukossa 4. Fmoc-suojaryhmien poistamiseen synteessissä käytettiin piperidiiniä (Aldrich, Steinheim, Saksa) ja HBTU:n (O-2-(1-H-bentso-triatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyli-uroniumheksafluorifosfaatti, GL Biochem, Shanghai, Kiina) sekä DIPEA:n (N, N-di-isopropyylietyyliamiini, Fluka, Seelze, Saksa) avulla saatiin uusi aminohappo liitettävä edellisen perään peptidiketjuun. Liuottimena kaikille aminohapoille sekä reagensseille käytettiin DMF:ää (N, N-dimetyyliformamidi, Prolabo, Pariisi, Ranska).

Suojattu aminohappo	Molekyylipaino (Da)	
	Suojattu	Ei-suojattu
Fmoc-Ala-OH	311,30	71,08
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,80	156,19
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,70	114,14
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411,50	115,09
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,70	103,15
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,70	128,13
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	425,50	129,12
Fmoc-Gly-OH	297,30	57,05
Fmoc-His(Trt)-OH	619,70	137,14
Fmoc-Ile-OH	353,40	113,16
Fmoc-Leu-OH	353,40	113,16
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,60	128,17
Fmoc-Met-OH	372,50	131,20
Fmoc-Phe-OH	387,40	147,18
Fmoc-Pro-OH	337,40	97,12
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,40	87,08
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397,50	101,11
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,60	186,21
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459,50	163,18
Fmoc-Val-OH	339,40	99,13

Taulukko 4. Synteessissä käytetyt suojatut aminohapot.

6.2.2. Peptidien biotinylointi

Viimeisen syklin jälkeen aktivointireagenssit HBTU ja DIPEA laimennettiin DMF:ään 1:10 alkuperäisestä sekä lisättiin DMF:ään laimennettu biotiini (Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kiina) sille varattuun paikkaan. Biotiinin konsentraatio oli vain kymmenesosa aminohappojen konsentraatiosta. Syntetisaattoriin ohjelmoitiin vielä yksi sykli, jolla biotiini liitettiin juuri syntetisoitujen peptidien viimeiseen aminohappoon, glysiiniin.

6.2.3. Peptidien irrotus resiinistä ja suojaryhmien poisto

Peptidien irrottamiseksi resiinistä ja suojaryhmien poistamiseksi sivuketjuista, peptidit käsiteltiin biotinyloinnin jälkeen liuoksella, joka sisälsi 95 % TFA (trifluorietikkahappo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 3 % EDT (etaani-1,2-ditioli, Fluka, Buchs, Sveitsi), 1 % TIS (tri-isopropyyilisilaani, Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa) ja 1 % H₂O. EDT ja TIS toimivat suoja-aineina. Peptidejä inkuboitiin TFA-liuoksessa kaksi tuntia koko ajan sekoittaen. Lopuksi syntetisaattori suodatti resiinistä irrotetut peptidit filterin läpi näytepulloihin.

6.2.4. Peptidien saostus ja kylmäkuivaus

Syntetisaattorin näytepulloista peptidit saostettiin kaatamalla peptidiliuokset jääkylmään (-18 °C) eetteriin (vedetön dietyylieetteri, J.T. Baker Deventer, Hollanti). Muodostunut sakka sentrifugoitiin kylmässä (+4 °C) putken pohjaan ja eetteri kaadettiin pois. Sakka lietettiin 10 ml:aan vettä ja pakastettiin (-70 °C) tunnin ajan. Jäätäneitä peptidiliuoksia kylmäkuivattiin kaksi vuorokautta lyofilisaattorissa, kunnes putkista oli kaikki neste haihtunut. Peptidit liuotettiin veteen 10 mg/ml ja säilytettiin -18 °C.

6.2.5. *Peptidien puhdistus*

Peptidien puhdistus tapahtui preparatiivisella HPLC:llä (Shimadzu, Kioto, Japani) käyttäen C₁₈-käänteisfaasikolonnia ja asetonitriiligradienttia (0-60 % ACN). Peptidejä sisältävät fraktiot otettiin talteen ja lyofilisoitiin kuten edellä.

6.2.6. *Peptidien karakterisointi*

Lyofilisoidut peptidit liuotettiin veteen kuiva-aineen painosta riippuen konsentraatioon 5-10 mg/ml. Oikeaa peptidiä sisältävät fraktiot selvitettiin mittaamalla niistä otetuissa näytteissä olevien molekyylien molekyylipainot massaspektrometrin avulla. Karakterisoitujen peptidien puhtaus tutkittiin analyttisellä HPLC:llä käyttäen C₁₈-käänteisfaasikolonnia ja asetonitriiligradienttia (0-60 % ACN, ajoaika 30 minuuttia).

Jos massaspektrometrian ja HPLC:n tulosten perusteella voitiin päätellä tutkittavan peptidiliuoksen sisältävän peptidin lisäksi huomattavan määrän muita peptidejä tai molekyyliä, puhdistus suoritettiin uudelleen.

7. **Epäsuora EIA**

Kaikki peptidiantigeenit testattiin epäsuoralla EIA-menetelmällä. Kiinteänä faasina käytettiin 96-kuoppaisia polystyreenistä valmistettuja ja säteilytettyjä Enhanced Binding (EB) Combiplate -mikrotiitterilevyjä (Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Suomi).

Vasta-aineina epitooppien tunnistamiseen käytettiin Ruotsissa tuotettua (Johansson ym. 2002) ja Helsingin yliopiston virusopin laitokselta saatua polyklonaalista, Borna-viruksen fosfoproteiinia vastaan tuotettua kanin seerumia a-GST-BDV p23. Nollaseerumina työssä käytettiin Helsingin yliopiston virusopin laitoksella tuotettua polyklonaalista anti-GST-kaniseerumia (vastaava kuin artikkelissa Vapalahti ym. 1995).

7.1. Epäsuora EIA EB-levyllä

Peptidistokeista (1 mg/ml vedessä) tehtiin 10 µg/ml laimennokset 10 mM NaHCO₃:iin (Riedel-de Haën, Seelze, Saksa). Saatuja peptidiliuoksia pipetoitiin 100 µl/kuoppa rinnakkaisina EB-levylle. Testin toimivuuden varmistamiseksi neljään kuoppaan pipetoitiin 100 µl pelkkää 10 mM NaHCO₃:a (nollakuopat), sekä sitomaan seerumin IgG:tä, neljään kuoppaan vuohessa tuotettua anti-rabbit IgG:tä (positiivikontrolli) (H+L, Rockland, Gilbertsville, USA). Positiivikontrolli laimennettiin 1:4000 NaHCO₃:iin. Antigeenilaimennoksia inkuboitiin nollakuoppien kanssa yön yli huoneenlämmössä pimeässä, EIA-teipillä suojattuna. Peptidiylimäärä pestiin seuraavana päivänä pois huuhtelemalla kuopat kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuri PBST:tä (1x PBS (Phosphate Buffered Saline), 0,5 % Tween-20, Fluka, Buchs, Sveitsi).

Epäspesifisten sitoutumispaikkojen blokkaukseksi kuopat saturoitiin inkuboimalla saturaatiopuskuria (1 % BSA, 0.5 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 x PBS) 100 µl/kuoppa 60 minuuttia lämpökaapissa +37 °C. Inkubaation jälkeen saturaatiopuskuri kaadettiin pois ja kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria.

Saturaation jälkeen kuoppiin pipetoitiin kahtena rinnakkaisena 1:1000 näytekuriin (0.5 % BSA, 0.05 % Tween-20, 1 x PBS) laimennetut positiivinen (α-GST-BDV p23) ja negatiivinen (α-GST), seerumi 100 µl/kuoppa. Seerumeja inkuboitiin 60 minuuttia lämpökaapissa +37 °C. Inkuboinnin jälkeen seerumit kaadettiin pois ja kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria.

Seerumista peptidiantigeeneihin ja positiivisena kontrollina käytettyyn anti-rabbit IgG:hen mahdollisesti tarttuneiden vasta-aineiden detektoimiseen käytettiin vuohessa kanin IgG:tä vastaan tuotettua ja piparjuuriperoksidaasi (HRP)-konjugoitua sekundaarista vasta-ainetta (goat anti-rabbit IgG HRP, H+L, Rockland, Gilbertsville, USA). Tätä konjugaattia laimennettiin 1:10 000 näytekuriin juuri ennen käyttöä.

Laimennosta pipetoitiin 100 µl/kuoppa ja inkuboitiin 30 minuuttia lämpökaapissa +37 °C. Inkuboinnin jälkeen konjugaattilaimennos kaadettiin pois ja kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria.

Mahdollisen värireaktion aikaansaamiseksi valmistettiin HRP:lle substraatti sekoittamalla juuri ennen käyttöä 1 osa 0,5 % TMB:tä (3,3', 5,5' - tetrametyylilibentsidiini, Riedel-de Haën, Seelze, Saksa) DMSO:ssa (dimetyylisulfoksidi, Merck, Darmstadt, Saksa) ja 50 osaa substraattipuskuria (0,1 M Na-asetaatitrihydraatti, 1,5 M sitruunahappo monohydraatti, 0,005 % H₂O₂, pH 5,9 - 6,0). Substraattia pipetoitiin 100 µl/kuoppa ja värireaktion annettiin kehittyä 15 minuuttia huoneenlämmössä. Reaktio pysäytettiin lisäämällä kuoppiin 50 µl 2M H₂SO₄:a (Riedel-de Haën, Seelze, Saksa).

Kuoppien keltaisen värin absorbanssit mitattiin 96-kuoppaiselle mikrotiiterilevyille tarkoitetulla spektrofotometrillä (Labsystems Multiskan RC, Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Suomi) aallonpituudella 450 nm.

Jos rinnakkaisten kuoppien absorbanssit erosivat huomattavasti (0,10 +/- 0,05) toisistaan, yksittäiset testikuopat hylättiin ja niiden peptidiantigeenit testattiin uudestaan. Vastaavasti koko testi hylättiin ja uusittiin jos negatiivisten kontrollien kuopat värjäytyivät tai positiivisten kontrollien merkkikuoppien absorbanssit olivat liian matalat (1,5 +/- 0,1).

7.1.1. Anti-rabbit IgG:n käyttölaimennoksen määrittäminen

Ennen anti-rabbit IgG:n käyttöä positiivisena kontrollina EIA:ssa, sille määritettiin sopiva käyttölaimennos. Sopivan konsentraation löytämiseksi anti-rabbit IgG titrattiin sekä negatiivista että positiivista seerumia vasten epäsuoraa EIA-menetelmää käyttäen. Seerumin tiitteri testauksessa oli 1:1000.

7.2. Epäsuora EIA avidiinipinnalla

Avidiinipinnoitus kiinteän faasin pinnassa yhdessä biotinyloitujen antigeenien kanssa mahdollistaa spesifisemmän antigeenin immobilisoinnin kiinteään faasiin biotiinin ja avidiinin muodostaman pysyvän kompleksin avulla. Tämä vähentää väärin positiivisten tulosten esiintyvyyttä.

7.2.1. *Anti-rabbit IgG:n biotinylointi*

Avidiinipinnalla tapahtuvassa epäsuorassa EIA:ssa biotinyloidut antigeenit tarttuvat avidiiniin biotiinistaan. Tämän vuoksi myös positiivisen kontrollin merkinä toimiva anti-rabbit IgG pitää olla biotinyloitu tarttuakseen kiinteän faasin avidiiniin samoin kuin peptidiantigeenit.

Biotinylointia varten 2 mg anti-rabbit IgG:tä liuotettiin 1 ml:aan PBS ja 2 mg biotiinia (EZ-Link® NHS-Biotin, Pierce, Rockford, USA) 590 µl:aan DMF. IgG-liuokseen lisättiin 27 µl biotiiniliuosta välittömästi biotiinin liuotuksen jälkeen. Seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia.

Inkuboinnin jälkeen biotinyloitu IgG puhdistettiin geelisuodatuksella (HiTrap™ Desalting, Bio-Science AB, Uppsala, Ruotsi) irtonaisen biotiinin poistamiseksi. Biotinyloitunutta IgG:tä sisältävä fraktio selvitettiin EIA-menetelmällä.

7.2.2. *Biotinyloidun IgG:n testaus EIA:ssa*

Kaikista saaduista fraktioista valmistettiin titraussarja 10 mM NaHCO₃:iin ja saadut laimennokset pipetoitiin EB-levylle 100 µl/kuoppa rinnakkaiset. Titraussarjan viimeiset kuopat sisälsivät ainoastaan 10 mM NaHCO₃:a ja toimivat siten negatiivisena kontrollina testin toimivuuden seuraamiseksi. Näytteitä inkuboitiin yksi vuorokausi huoneenlämmössä valolta ja kuivumiselta suojattuna.

Inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria. Biotiinin detektoimiseksi konjugaattina käytettiin HRP-leimattua avidiinia (Rockland, Gilbertsville, USA). Konjugaattia laimennettiin 1:1000 näytepuskuriin, pipetoitiin 100 µl jokaiseen kuoppaan ja inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä valolta ja kuivumiselta suojattuna.

Kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria. Värireaktio käynnistettiin HRP:n substraatin avulla kuten aiemmassa EIA:ssa ja reaktio pysäytettiin rikkihapolla. Väriin absorbanssit mitattiin ja tulosten perusteella nähtiin mikä fraktio sisälsi biotinyloitunutta IgG:tä. Testi hylättiin ja uusittiin jos joku negatiivisista kontrolleista värjäytyi.

7.2.3. Biotinyloidun IgG:n käyttöläimennoksen määrittäminen

Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n valitun fraktion sopiva konsentraatio avidiinipinnalle epäsuoraan EIA:han määritettiin titraamalla se sekä positiivista että negatiivista seerumia vasten, kuten ennen biotinylointiakin.

7.2.4. EB-levyn pinnoitus avidiinilla

Ennen EIA-testauksen suorittamista tarvittava määrä EB-levyn kuoppia pinnoitettiin avidiinilla peptidiantigeenien immobilisoimiseksi kuoppiin biotiinistaan.

Avidiini (Rockland, Gilbertsville, USA) liuotettiin ensin 10 mg/ml veteen stokeiksi, jotka säilytettiin pakastimessa -20 °C. Avidiinistokista laimennettiin juuri ennen käyttöä 10 µg/ml liuos 10 mM NaHCO₃:iin. Avidiiniliuosta pipetoitiin 110 µl/kuoppa EB-levylle ja inkuboitiin yön yli pimeässä huoneenlämmössä EIA-teipillä suojattuna. Seuraavana päivänä kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria.

7.2.5. Epäsuora EIA-testaus

Testattavat peptidiantigeenit laimennettiin 10 µg/ml BSA-puskuriin (1 % BSA, 1 x PBS) ja pipetoitiin 100 µl/kuoppa rinnakkaisina avidiinipinnoitetulle EB-kuoppalevyille. Testin toimivuuden varmistamiseksi neljään kuoppaan pipetoitiin 100 µl 1:2000 BSA-puskuriin laimennettua positiivikontrollina toimivaa biotinyloitua anti-rabbit IgG:tä ja neljään kuoppaan pelkkää BSA-puskuria (nollakuopat). Kuoppalevyä inkuboitiin 60 min lämpökaapissa +37 °C. Tämän jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria.

Positiivinen (α-GST-BDV p23) ja negatiivinen (α-GST) seerumi laimennettiin 1:1000 näytekuskuriin ja pipetoitiin 100 µl/kuoppa testin onnistumisen seurantaan varten. Seerumeja inkuboitiin pinnoittamattomalla kuoppalevyllä tapahtuvasta epäsuorasta EIA-testauksesta poiketen vain 30 min lämpökaapissa +37 °C, jonka jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa 250 µl:lla pesupuskuria.

Vasta-aineiden detektointi toteutettiin kuten aiemmassakin EIA-menetelmässä HRP:llä leimatun sekundaarisen antigeenin ja HRP:n substraatin avulla. Tulosten oikeellisuus määriteltiin samoilla perusteilla kuin aiemmin.

8. Microarray

Kaikki peptidiantigeenit testattiin seuraavaksi microarrayformaattissa soveltaen epäsuoraa EIA-menetelmää. Positiivikontrollinatestissä käytettiin aiemmin biotinyloitua anti-rabbit IgG:tä ja negatiivisena kontrollina peptidien laimentamiseen käytetty PBS. Lisäkontrollina toimi mikroskooppilasilevyn käsitelty, mutta printtaamaton alue spottien läheisyydessä.

8.1. Mikroskooppilasilevyjen pinnoitus

Mikroskooppilasilevyjen pinnoitusta varten valmistettiin 1 % glutaraldehydi-liuos (Merck, Darmstadt, Saksa) 10 mM NaHCO₃:iin. Saatua GA-liuosta polymerisoitiin kolme vuorokautta pimeässä lämpöhuoneessa +37 °C magneettisekoittajalla.

Kuusi tavallista mikroskooppilasilevyä (Menzel Glaser GmbH, Braunschweig, Saksa) upotettiin 200 ml:aan esipolymeroitua glutaraldehydiä ja inkuboitiin yön yli huoneenlämmössä valolta suojattuna. Seuraavana päivänä GA-pinnoitetut mikroskooppilasilevyt pestiin upottamalla ne kaksi kertaa veteen ja yhden kerran 10 mM NaHCO₃:iin, sekä kuivattiin lämpökaapissa +37 °C noin 30 min.

Avidiinistokista tehtiin juuri ennen käyttöä 10 µg/ml laimennos 10 mM NaHCO₃:iin. GA-käsiteltyjä mikroskooppilasilevyjä inkuboitiin avidiiniliuoksessa yön yli huoneenlämmössä valolta suojattuna. Inkubointi tapahtui kotelossa, jossa oli 13 ml avidiiniliuosta kolmea mikroskooppilasilevyä kohti. Inkuboinnin jälkeen lasilevyt pestiin kahdesti vedellä ja kerran 10 mM NaHCO₃:lla.

Epäspesifien sitoutumispaikkojen poistamiseksi mikroskooppilasilevyt saturoitiin inkuboimalla niitä 200 ml:ssa BSA-liuosta (1 % BSA 10 mM NaHCO₃:ssa). Mikroskooppilasilevyjä saturoitiin kaksi tuntia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Tämän jälkeen mikroskooppilasilevyt pestiin upottamalla ne kolme kertaa pesupuskuriin. Pesuliuos huuhdottiin pois vedellä ja mikroskooppilasilevyjä valutettiin huoneenlämmössä 30 minuuttia. Lopuksi lasilevyt kuivattiin pitämällä niitä lämpökaapissa +37 °C kaksi tuntia. Levyt säilytettiin kuivauksen jälkeen jääkaapissa +4 °C valolta ja kosteudelta suojattuna.

Ennen testausta tarvittava määrä pinnoitettuja lasilevyjä päällystettiin tarkoitusta varten kehitetyillä sapluunateipeillä (Oy Jurilab Ltd, Kuopio, Suomi). Mittatilaustyönä teetetyt sapluunateipit peittävät mikroskooppilasilevyn pinnan lukuun ottamatta 2 x 6 matriisin 7 mm halkaisijaltaan olevia pyöreitä aukkoja teipissä. Nämä aukot toimivat kuoppalevyn kuoppia vastaavasti reagenssien inkuboinnissa. Yhteen sapluunatarran aukkoon voidaan, kuoppalevytestauksesta poiketen, laittaa jopa satoja antigeenejä pieniksi spoteiksi ilman, että ne sekoittuisivat keskenään.

8.2. Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n käyttöläimennoksen määrittäminen

Ennen testausta biotinyloitu anti-rabbit IgG titrattiin GA-avidinipinnoitetulle mikroskooppilasilevyille ja määritettiin sekä positiivista että negatiivista seerumia vasten sille microarrayhin sopiva laimennos.

8.3. IFA-testaus

Tutkittavat peptidiantigeenit laimennettiin 10 µg/ml PBS:iin ja siirrettiin GA-avidinipinnoitetulle mikroskooppilasilevyille sapluunateipin aukkoihin kuparilangan ja preparatiivisen mikroskoopin avulla. Eri peptidiantigeenilaimennoksia printattiin 20 kpl/kuoppa ja inkuboitettiin pimeässä kosteuskammiossa (kosteus n.100 %) huoneenlämmössä yön yli. Mikroskooppilasilevyille printattiin ennen inkubointia peptidiantigeenien lisäksi negatiiviseksi kontrolliksi kaksi spottia PBS:ia ja positiiviseksi kontrolliksi kaksi spottia 1:2000 laimennettua biotinyloitua anti-rabbit IgG:tä. Seuraavana päivänä mikroskooppilasilevyt pestiin irtonaisen peptidin poistamiseksi sumuttamalla ensin pesupuskuria (PBST) suihkupullolla lasilevyille ja sitten upottamalla ne kaksi kertaa pesupuskuriin.

Seerumit (a-GST-BDV p23 ja a-GST) laimennettiin 1:1000 näytekupuriin ja pipetoitiin 20 µl/aukko. Seerumeja inkuboitettiin mikroskooppilasilevyillä viisitoista minuuttia kosteuskammiossa huoneenlämmössä valolta suojattuna ja pestiin sen jälkeen kerran sumuttamalla ja kahdesti upottamalla pesupuskuriin.

Konjugaattina käytettiin vuohessa tuotettua ja fluorokromilla leimattua anti-rabbit IgG:tä (goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor[®] 546 (H+L), Molecular Probes, Leiden, Alankomaat), joka laimennettiin 1:1000 näytekupuriin. Konjugaattilaimennosta pipetoitiin 20 µl/kuoppa ja inkuboitettiin viisitoista minuuttia huoneenlämpöisessä pimeässä kosteuskammiossa. Inkuboinnin jälkeen mikroskooppilasilevyt pestiin kolmesti pesupuskurilla. Pesun jälkeen mikroskooppilasilevystä poistettiin sapluunatarra ja lasilevyä huuhdeltiin jäävedessä, jonka jälkeen se kuivattiin nopeasti paineilmalla. Testattuja mikroskooppilasilevyjä eli mikrosiruja säilytettiin jääkaapissa +4 °C pimeässä ja kuivassa.

8.4. Biosirujen kuvaus ja analysointi

Valmiit mikrosirut kuvannettiin niille tarkoitettulla kaksois-UV-laserskannerilla (GSI Luminomics ScanArray5000, Packard Bioscience, USA). Skannerin asetukset on esitelty taulukossa 5. Fluoresenssin intensiteetti määritettiin saaduista kuvista käyttäen SpotFinder (<http://www.tm4.org/spotfinder.html>) -kvantitointiohjelmaa.

Taulukko 5. ScanArray5000 skannausprotokolla.

Scan resolution	10 μ m	PMT Gain	70 %
Scan speed	full	Laser Power	90 %
Fluorophore	Alexa 546		
Laser	3 (543 nm)		

9. Tulokset

9.1. Peptidien karakterisointi

Kaikki vuonna 2003 syntetisoidut peptidit karakterisoitiin analyyttisen käänteisfaasi HPLC:n ja massaspektrometrian avulla. Tutkituista 39 peptidistä käyttökelpoisia oli 32 kpl eli 82,1 %. Uudelleen syntetisoiduista puuttuvista seitsemästä peptidistä edelleen viisi eli 71,4 % onnistui. Viimeisistä kahdesta peptidistä vain toinen onnistui, toisesta jäi puuttumaan biotiini (p23-23). Karakterisoinnin tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Peptidien karakterisointi HPLC:n ja massaspektrometrian avulla.

Peptidit	Koodi	Sekvenssi	Analyttinen	Massaspektrometria	
			HPLC	Molekyylipaino (Da)	
			Retentioaika	Laskennallinen	Määritetty
p23-1	BGMATGPSSLVDSLEDEG		16,08	1 889,71	1 889,73
p23-2	BGSSLVDSLEDEEDPQTG		15,24	2 002,74	2 002,76
p23-3	BGSLEDEEDPQTLRRERG		10,86	2 211,93	2 211,98
p23-4	BGEDPQTLRRERSGSPRG		8,90	2 122,94	2 123,01
p23-5	BGLRRERSGSPRPRKIPG		7,72	2 144,10	2 144,16
p23-6	BGSGSPRPRKIPRNALTG		9,29	1 988,98	1 988,97
p23-7	BGPRKIPRNALTQPVDQG		10,38	2 072,01	2 072,07
p23-8	BGRNALTQPVDQLLKDLG		8,71	2 063,00	2 063,01
p23-9	BGQPVDQLLKDLRKNPSG		13,36	2 090,01	2 090,05
p23-10	BGLLKDLRKNPSMISDPG		12,63	2 065,98	2 066,02
p23-11	BGRKNPSMISDPDQRTGG		9,38	2 040,86	2 040,90
p23-12	BGMISDPDQRTGREQLSG		11,69	2 071,85	2 071,86
p23-13	BGDQRTGREQLSNDELIG		11,60	2 112,90	2 112,84
p23-14	BGREQLSNDELIKKLVTVG		13,12	2 125,03	2 124,95
p23-15	BGNDELIKKLVTELAENG		15,48	2 067,96	2 067,86
p23-16	BGKKLVTELAENSMIEAG		13,58	2 014,92	2 014,86
p23-17	BGELAENSMIEAEVVRGG		14,25	2 015,81	2 015,83
p23-18	BGSMIEAEVVRGTLGDIG		15,00	1 958,82	1 958,84
p23-19	BGEEVRGTLGDISARIEG		13,48	1 983,88	1 983,91
p23-20	BGTLGDISARIEAGFESG		15,89	1 904,81	1 904,83
p23-21	BGSARIEAGFESLSALQG		14,78	1 917,84	1 917,86
p23-22	BGAGFESLSALQVETIQG		16,14	1 931,84	1 931,86
p23-23	BGLSALQVETIQTAQRCG		7,70	1 999,89	1 770,84 ²
p23-24	BGVETIQTAQRCDHSDSG		7,77	2 028,78	2 028,82
p23-25	BGTAQRCDHSDSIRILGG		-- ¹	2 010,85	2 010,90
p23-26	BGDHSDSIRILGENIKIG		12,68	2 048,94	2 048,99
p23-27	BGIRILGENIKILDRSMG		5,53	2 110,05	2 110,09
p23-28	BGENIKILDRSMKTMMEG		13,47	2 177,94	2 177,98
p23-29	BGLDRSMKTMETMKLMG		10,32	2 184,90	2 187,54
p23-30	BGKTMETMKLMMEKVDG		14,77	2 184,89	2 184,81
p23-31	BGTMKLMMEKVDLLYASG		-- ¹	2 111,93	2 111,98
p23-32	BGMEKVDLLYASTAVGTG		14,95	1 936,84	1 936,86
p23-33	BGLLYASTAVGTSAPMLG		17,83	1 833,81	1 833,83
p23-34	BGTAVGTSAPMLPSPHAG		12,49	1 775,75	1 775,78
p23-35	BGSAPMLPSPHAPPRIYG		12,48	1 972,88	1 972,83
p23-36	BGPSHPAPPRIYPQLPSG		12,17	1 995,91	1 995,85
p23-37	BGPPRIYPQLPSAPTADG		13,56	1 961,88	1 961,91
p23-38	BGPQLPSAPTAEWDIIG		16,90	1 991,84	1 991,86
p23-39	BGQLPSAPTAEWDIIPG		16,82	1 991,84	1 991,85

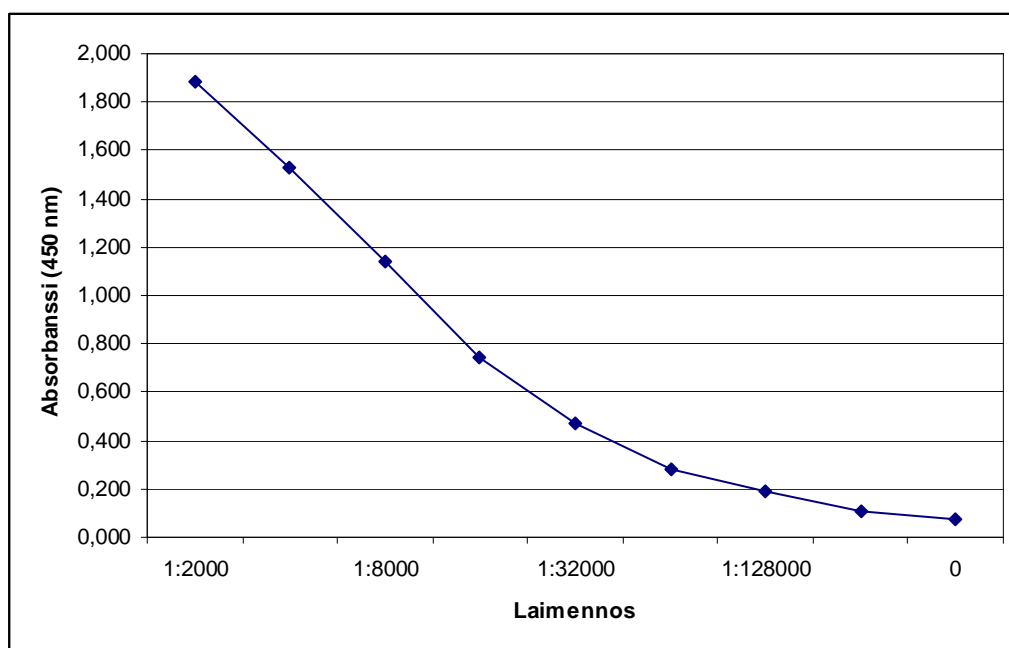
¹ Tuloksia ei saatavilla² Biotiini puuttuu

9.2. Positiivisen kontrollin titraus

Epäsuoraan EIA:han sopivan konsentraation löytämiseksi positiivinen kontrolli anti-rabbit IgG titrattiin (taulukko 6) sekä negatiivista että positiivista seerumia vasten seerumin tiitterillä 1:1000. Saatu titrauskaavio on esitetty kuvassa 12. Käyttöön sopivaksi a-rabbit IgG:n laimennokseksi soveltui 1:4000.

Taulukko 6. Anti-rabbit IgG:n titraus.

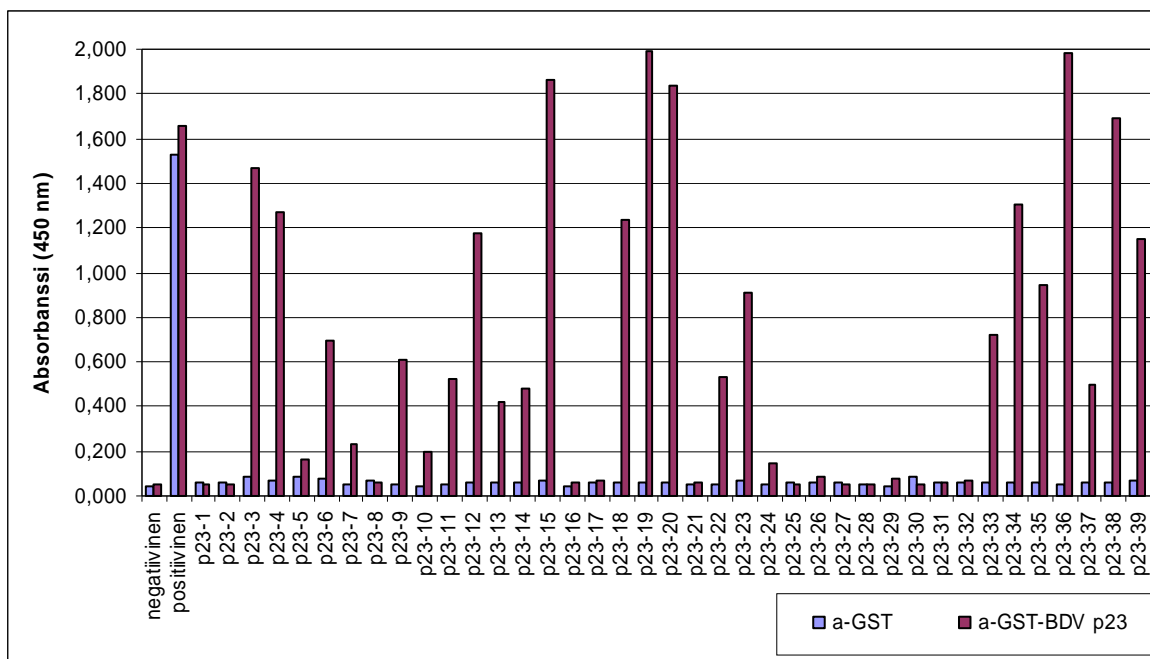
Laimennos	Konsentraatio (µg/ml)	BDV-positiivinen kaniseerumi
1:2000	1,000	1,881
1:4000	0,500	1,530
1:8000	0,250	1,137
1:16000	0,125	0,740
1:32000	0,063	0,468
1:64000	0,031	0,280
1:128000	0,016	0,193
1:254000	0,008	0,110
0	0	0,076



Kuva 12. Anti-rabbit IgG:n titraus. EIA-testaukseen sopiva laimennos on 1:4000, joka antaa absorbanssin 1,5+/-0,1 Borna-virus -positiivisen seerumin tiitterillä 1:1000.

9.3. Epäsuora EIA-testaus EB-levyllä

Peptidien testauksesta epäsuoralla EIA:lla kaniseerumeja käyttäen saadut tulokset on esitetty kuvassa 13. Peptidien konsentraationa käytettiin 10 µg/ml laimennettuna 10 mM NaHCO₃:iin. Seerumien tiitterinä oli 1:1000.



Kuva 13. Epäsuora EIA p23-peptidiantigeeneilla.

9.4. Biotinyloitu anti-rabbit IgG

Vuohessa tuotettu anti-rabbit IgG biotinyloitiin käytettäväksi positiivisena kontrollina epäsuorassa EIA:ssa avidiinipinnalla.

Tarvittava 20-kertainen molaarinen biotiiniylimäärä on laskettu kaavalla (Pierce):

$$1) \text{ ml IgG} \times \frac{\text{mg IgG}}{\text{ml IgG}} \times \frac{\text{mmol IgG}}{\text{mg IgG}} \times \frac{20 \text{ mmol biotiini}}{\text{mmol IgG}} = \text{mmol biotiini}$$

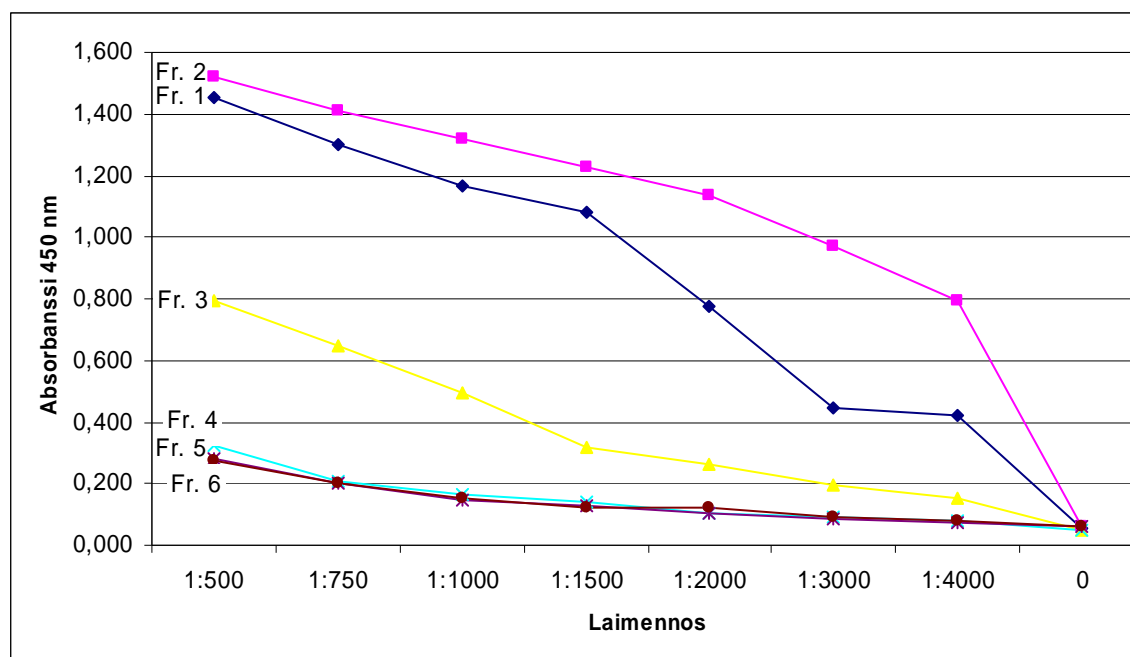
$$2) \text{ mmol biotiini} \times \frac{1\,000\,000 \text{ } \mu\text{l}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{10 \text{ mmol}} = \text{ } \mu\text{l biotiinia}$$

Tulokseksi saadaan 1) 0.000 266 mmol biotiini 2) 26.6 µl biotiinia

Biotinyloitu a-rabbit IgG geelisuodatettiin ja saadut fraktiot testattiin epäsuoralla EIA:lla ja detektoitiin avidiini-HRP:n avulla. Saadut tulokset on esitetty taulukossa 7 ja niistä piirretty titrauskäyrä kuvassa 14. Käyttöön valittiin fraktio 2 suurimman biotiinipitoisuutensa perusteella.

Taulukko 7. Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n geelisuodatusfraktioiden titraus EIA:ssa.

Laimennos	Biotinyloitu a-rabbit IgG fraktiot geelifiltraatiosta					
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6
1:500	1,452	1,523	0,791	0,324	0,281	0,272
1:750	1,300	1,410	0,648	0,208	0,200	0,204
1:1000	1,164	1,317	0,493	0,163	0,146	0,153
1:1500	1,079	1,229	0,318	0,138	0,129	0,125
1:2000	0,778	1,133	0,261	0,106	0,103	0,125
1:3000	0,443	0,971	0,198	0,094	0,084	0,091
1:4000	0,420	0,791	0,155	0,080	0,074	0,077
0	0,057	0,059	0,048	0,049	0,059	0,061

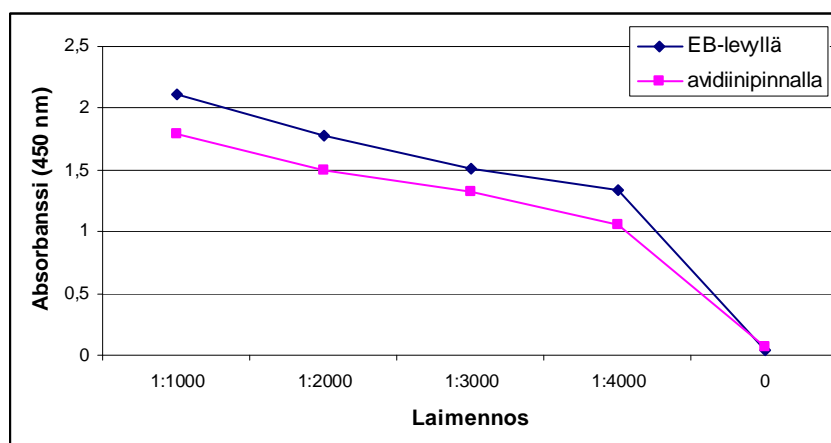


Kuva 14. Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n geelifiltraatiofraktioiden titraus EIA:ssa. Vahvin avidiinin affiniteetti eli biotiinikonsentraatio on fraktiossa 2, joten se valittiin positiivikontrolliksi.

Valittu fraktio titrattiin vielä negatiivista ja positiivista kaniseerumia vasten ja epäsuoraan EIA:han sopivaksi laimennokseksi saatiin 1:2000. Titrauskaavio on esitetty kuvassa 15 ja numeeriset tulokset taulukossa 8.

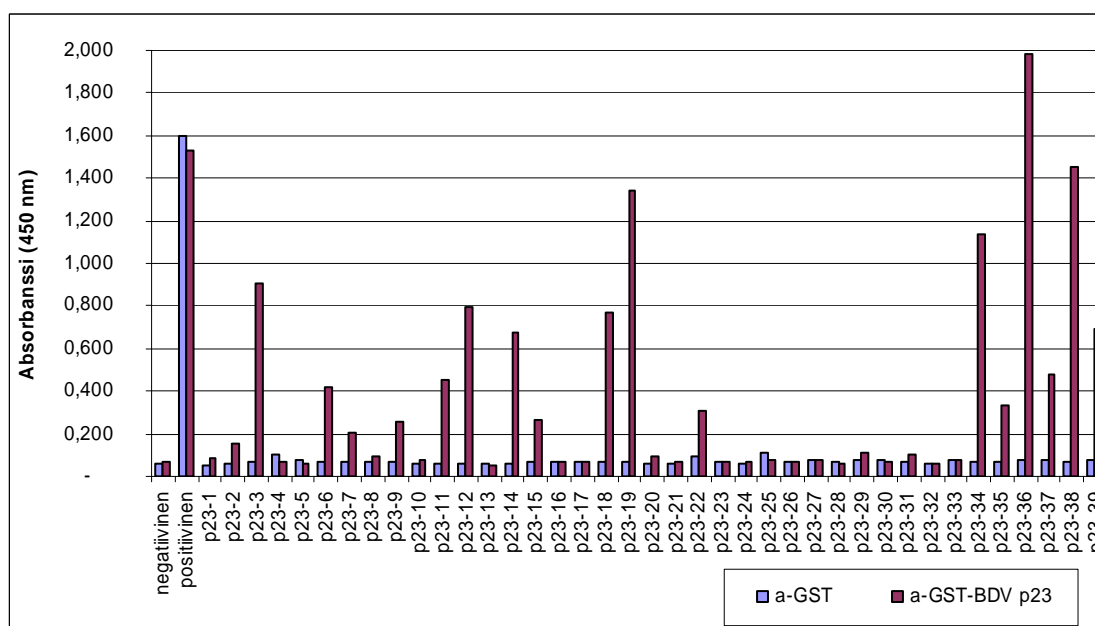
Taulukko 8. Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n fraktion 2 titraus epäsuorassa EIA:ssa.

Laimennos	EB-levyllä	Avidiinipinnalla
1:1000	2,110	1,798
1:2000	1,774	1,502
1:3000	1,516	1,328
1:4000	1,337	1,062
0	0,041	0,063



Kuva 15. Biotinyloidun anti-rabbit IgG:n valitun geelifraktion titraus epäsuorassa EIA:ssa. Sopivaksi käyttölaimennokseksi saatiin 1:2000, joka antaa absorbanssin 1,5+/-0,1 Borna-virus -positiivisen seerumin tiitterillä 1:1000.

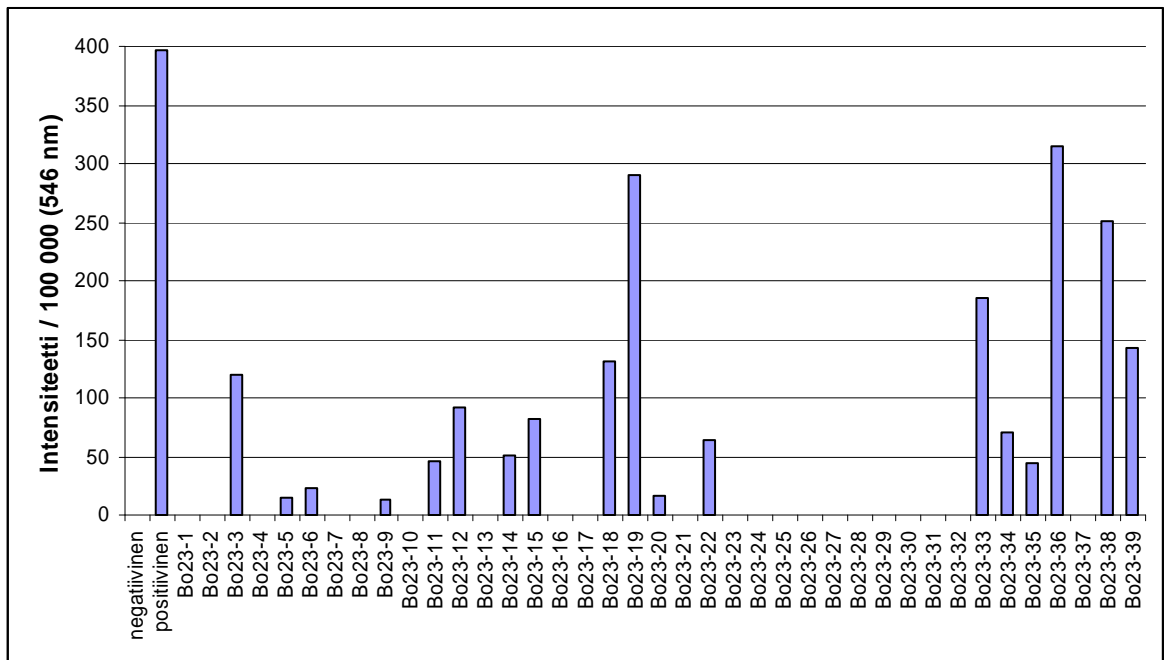
9.5. Epäsuora EIA-testaus avidiinipinnalla



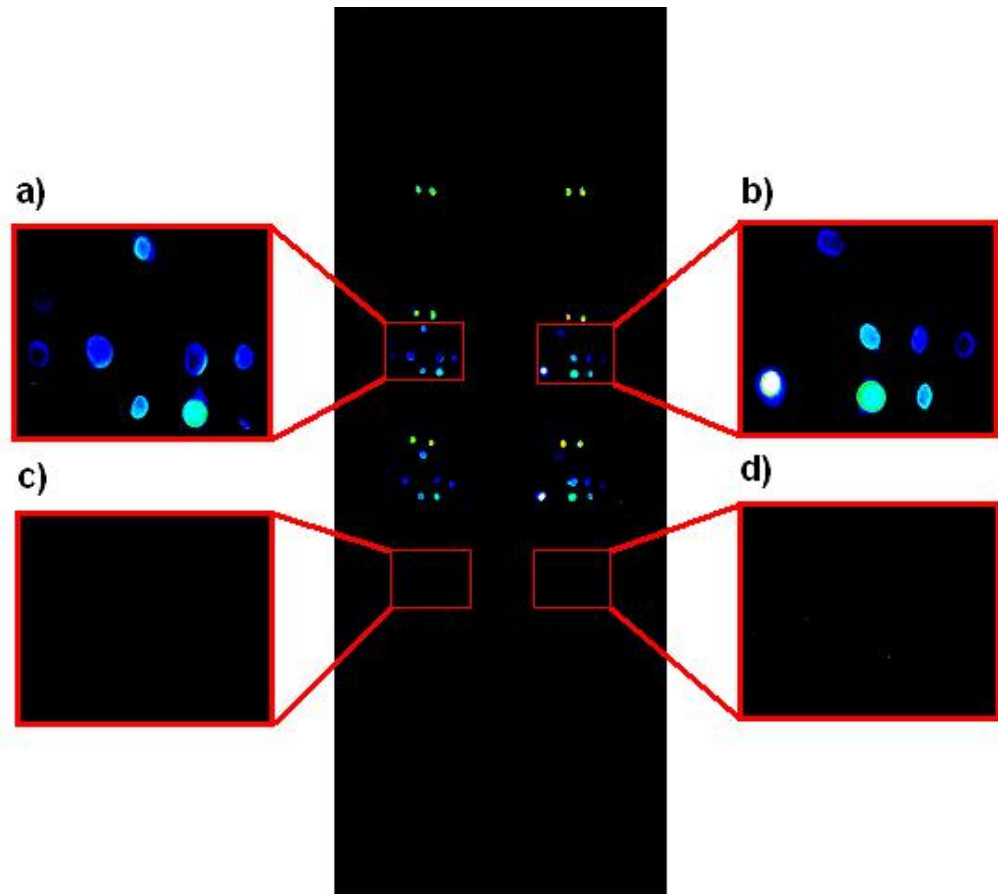
Kuva 16. Proteiinin p23 epitooppikartoitus epäsuoralla EIA-menetelmällä avidiinipinnalla.

9.6. Epäsuora IFA-testaus avidiinipinnoitetulla biosirulla

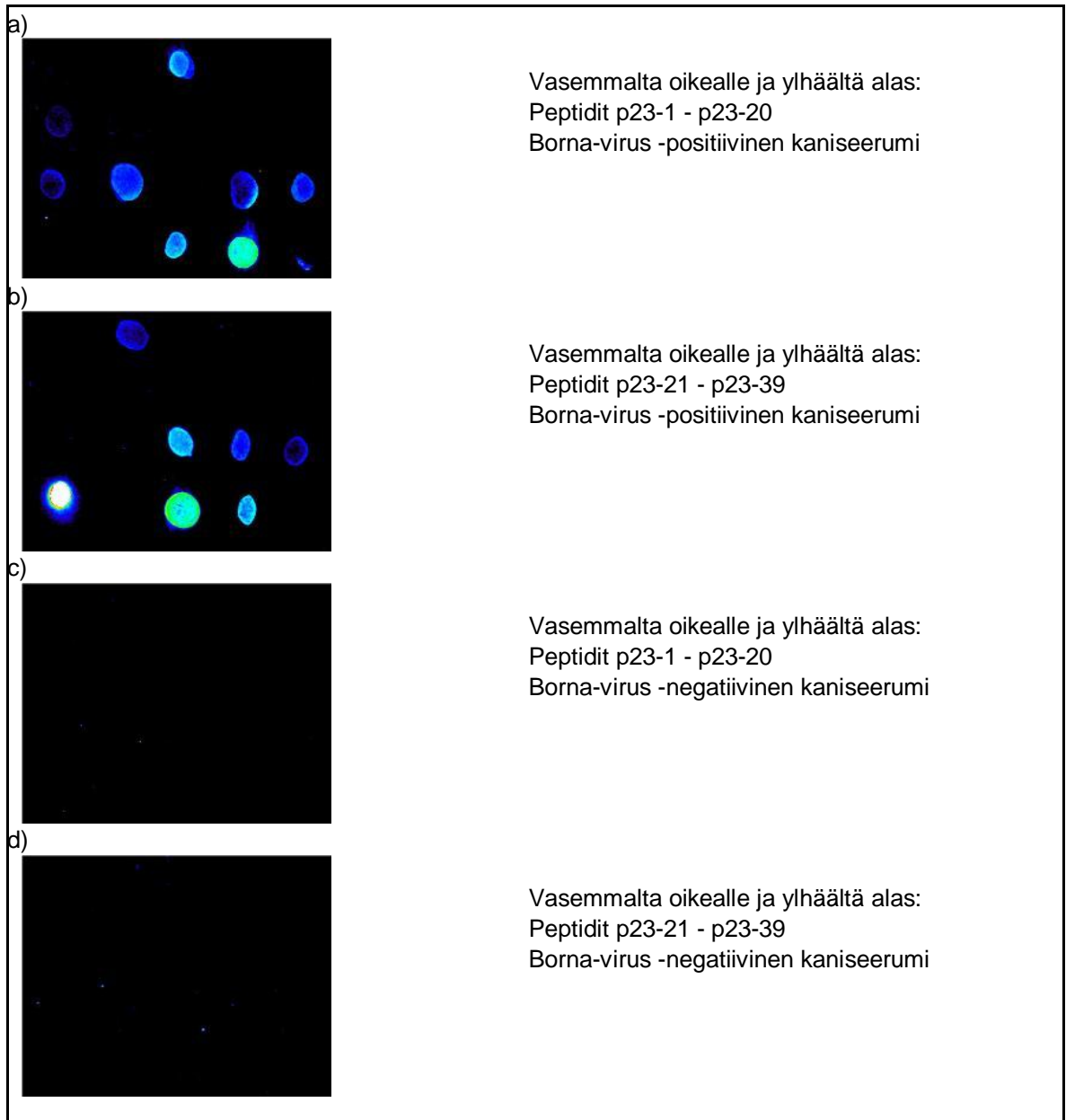
Biosirulla tapahtuneesta epäsuoralla IFA-menetelmällä tehdystä epitooppikartoituksesta saadut tulokset on esitelty kuvassa 17. Kuvassa 18 on esitelty työssä skannattu biosiru ja kuvassa 19 tarkemmat kuvat epitooppikartoitukseen käytetyistä alueista.



Kuva 17. Biosirulla tehty epäsuora IFA. Positiivisena kontrollina biotinyloitu anti-rabbit IgG ja negatiivisena pelkkä antigeenipuskuri.



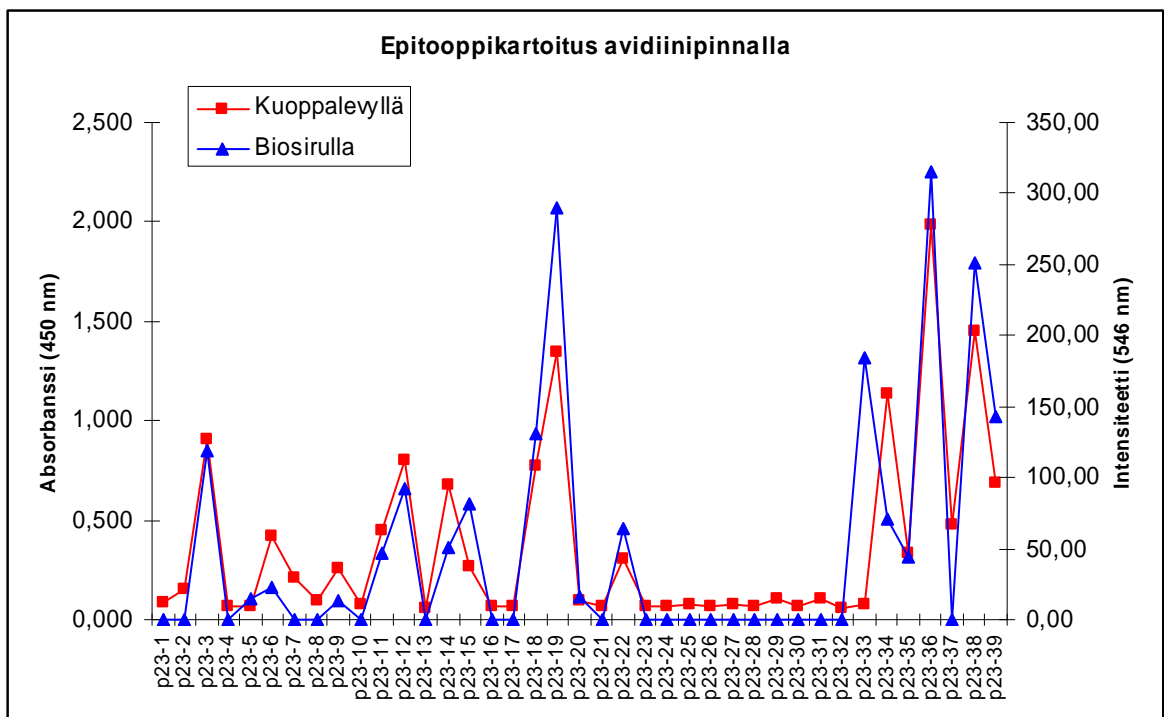
Kuva 18. Skannattu biosiru kokonaisuudessaan. Suurennetuissa kuvissa tarkemmat otokset testialueilta. Spotin intensiteetti on suoraan verrannollinen sitoutuneen vasta-aineen määrään.



Kuva 19. Epi-tooppikarointu biosirulla.

10. Pohdinta

Borna-viruksen fosfoproteiinin p23 epitooppikartoituksessa avidiinipinnoitetulla biosirulla löytyi 18 peptidiepitooppia, joka on yksi enemmän kuin vastaavassa testauksessa avidiinipinnoitetulla kuoppalevyllä. Biosirulta puuttumaan jäi proteiinisekvenssin 37. peptidi (p23-37), johtuen luultavasti teknisistä ongelmista peptidin printtauksessa sirulle. Kuvassa 21 avidiinipinnalla tehdyt EIA-testaukset sekä kuoppalevyllä että sirulla on esitetty rinnakkain.

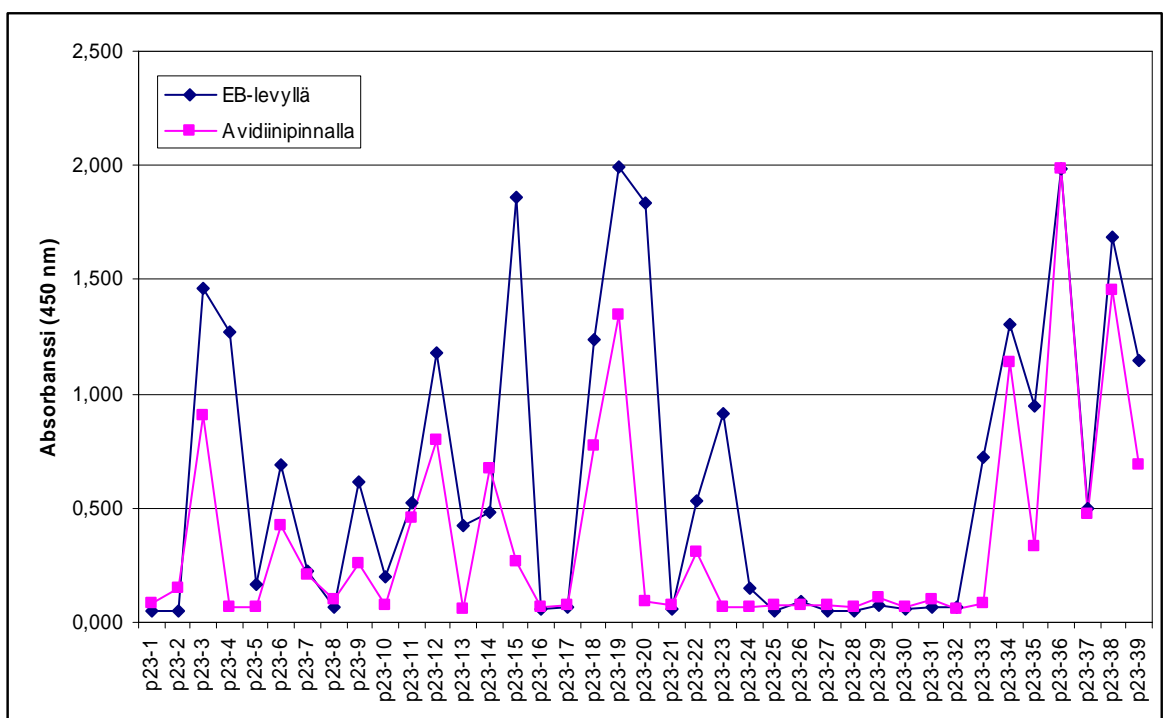


Kuva 21. Epitooppikartoitus avidiinipinnalla.

Lukuun ottamatta hienoisia eroja vasta-aineiden affiniteeteissä antigeeneihin, epitooppikartoitus avidiinipinnoitetulla biosirulla on yhtä luotettava menetelmä kuin kuoppalevyllä tehtynäkin. Biosirufurmaatin etuna kuoppalevytestaukseen on sen nopeus ja erittäin pienet reagenssi- ja näytemäärät.

EB-levyllä tehdyssä epitooppikartoituksessa havaittiin 21 vasta-ainetta sitovaa peptidiä. Verrattuna vastaavaan testaukseen samoilla peptideillä, avidiinipinnalla tehdyssä epitooppikartoituksessa löytyi vain 17 antigeenista peptidiä.

Avidiinipinnalla tehdyssä epäsuorassa EIA:ssa osa proteiinin p23 epitoopeista jäi löytymättä. Vasta-aineiden affiniteetti käytettyjä peptidiantigenejä kohtaan vaikuttaisi olleen hieman heikompi avidiinipinnalla kuin EB-levyllä, mutta nämä erot saattavat johtua EIA-teknisistä tekijöistä, kuten vaihtelusta entsyymileiman substraatin vaikutusajassa. Avidiinipinnalla havaitsematta jääneet peptidiepitootit sen sijaan ovat saattaneet jäädä kiinnittymättä avidiiniin esimerkiksi niiden rakenteesta puuttuvan biotiinin vuoksi. Kuvassa 22 epäsuorassa EIA:ssa saadut tulokset on laitettu rinnakkain, jolloin käy selville, että avidiinipinnalla tehty epitooppikartoitus vastaa pääosiltaan EB-levyllä tehtyä.



Kuva 22. Borna-virusproteiinin p23 epitooppikartoitus EB-levyllä ja avidiinipinnalla.

Kuten kuvasta 22 on havaittavissa, p23-sekvenssin 23. peptidi eli p23-23 on positiivinen EB-levyllä, mutta ei avidiinipinnalla. Tämä selittyy sen epäonnistuneella synteesillä, jossa peptidistä jäi puuttumaan biotiini (taulukko 6), jolloin peptidin ei ole mahdollista kiinnittyä avidiiniin.

Kaikkia epitooppeja ei näillä menetelmillä kuitenkaan voida määrittää. Synteettisillä peptideillä tehtävässä epitooppikartoituksessa saadaan selville ainoastaan proteiininantigeenin primaarirakenteen mukaisia epitooppeja. Peptidien ollessa täysin lineaarisia ja irrallisina toisistaan, jäävät proteiinin laskostumisesta aiheutuvat sekundaariset rakenne-epitoopit kokonaan havaitsematta.

Biosirulla tapahtuva vasta-aineiden määrittäminen voisi olla hyvä apu joihinkin virusdiagnostisiin ongelmiin. Esimerkiksi todella pienistä näytemääristä voidaan tällä menetelmällä saada testaus suoritettua toisin kuin monessa muussa menetelmässä.

Tässä työssä biosirun päällä käytetty sapluunatarra mahdollistaa usean eri näytteen tutkimisen samalta mikrosirulta, sen lisäksi että se pienentää tarvittavia näyte- ja puskurivilavuuksia kuoppalevyyn nähden. Sapluunatarran aukkojen kokoa pienentämällä ja määrää kasvattamalla, saataisiin samalta sirulta tutkittua vielä useampia näytteitä.

Tällaisen antigeenisirun käyttö vasta-ainediagnostiikassa mahdollistaa usean eri antigeenin käytön samanaikaisesti seeruminäytteen testauksessa lisäten näin testin varmuutta ja oikeellisuutta. Biosiru mahdollistaa myös huomattavasti pienempien näyte- ja puskurivilavuuksien käytön kuin vastaava EIA-testaus 96-kuoppalevyllä. Tämä taas vähentää kustannuksia sekä lyhentää inkubaatioaikoja nopeuttaen testausta. Näin ollen virusdiagnostinen biosirutestaus peptidiantigeenien avulla on siis huomattavasti nopeampi tapa seuloa vasta-ainepositiiviset kuin mikään muu tapa tällä hetkellä.

Samaa formaattia voisi soveltaa vastaavasti myös muiden virusten tai bakteerien diagnostiikkaan. Koska testaus perustuu vasta-aineiden tarttumiseen niille spesifisiin kohteisiin, testiä voisi soveltaa kaikkeen vasta-ainetestaukseen, jos vain tarvittavan spesifisen antigeenin sekvenssi on tiedossa ja mahdollista syntetisoida peptidiksi.

Mahdollista olisi myös yhdistää samaan testiformaattiin useamman eri taudinaiheuttajan spesifisiä antigeenejä. Näin saataisiin samasta näytteestä testattua yhdellä kertaa useita, jopa satoja eri vasta-aineita.

Koneellisella printtauksella yhdelle levyille voidaan printata jopa tuhansia eri antigeenejä. Verrattuna tässä työssä kuvattuun manuaaliseen printtaukseseen, koneellisella antigeenin printtauksella pystytään säätämään sirulle tulevan antigeenin määrää. Tämä mahdollistaa myös vasta-aineiden affiniteettien määritykset eri antigeenejä kohtaan, koska mitattu fluoresenssi on suoraan verrannollinen sitoutuneen vasta-aineen määrään, kun tarkka antigeenimäärä tiedetään.

Lähdeluettelo

1. **Abbas AK, 2003.** Cellular and Molecular Immunology, 5. painos. Saunders Press, USA.
2. **Anderson LJ, Godfrey E, McIntosh K, Hierholzer JC, 1983.** Comparison of a monoclonal antibody with a polyclonal serum in an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting adenovirus. *J Clin Microbiol.* 18(3):463–468.
3. **Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ardizzoni A, Bistoni F, Crisanti A, 2004.** Serodiagnosis of infectious diseases with antigen microarrays. *J Appl Microbiol.* 96(1):10-7.
4. **Bachi T, 1988.** Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells. *J Cell Biol.* 107(5):1689-95.
5. **Bahmani MK, Nowrouzian I, Nakaya T, Nakamura Y, Hagiwara K, Takahashi H, Rad MA, Ikuta K. 1996.** Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res.* 45:1-13.
6. **Baron EJ, Pererson LR, Finegold SM (toim.), 1994.** Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9. painos. CV Mosby, St. Louis, USA
7. **Baunoch DA, Das P, Browning ME, Hari V, 1992.** R-ELISA: repeated use of antigen-coated plates for ELISA and its application for testing of antibodies to HIV and other pathogens. *Biotechniques.* 12(3):412-7.
8. **Berg A-L, Dörries R, Berg M., 1999.** Borna Disease Virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders. *Arch. Virol.* 144; 547-559.
9. **Bilzer T, Stitz L, 1993.** Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Arch Virol Suppl.* 7:153–158.
10. **Bilzer T, Stitz L, 1994.** Immune-mediated brain atrophy. CD8⁺ T cells contribute to tissue destruction during borna disease. *J Immunol.* 153:818–823.
11. **Bode L, Ferszt R, Czech G, 1993.** Borna disease virus infection and affective disorders in man. *Arch. Virol.* 7(Suppl.):159–167.

12. **Bode L, Reckwald P, Severus WE, Stoyloff R, Ferszt R, Dietrich DE, Ludwig H. 2001.** Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies—the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol. Psychiatry* 6:481-491.
13. **Bode L, Zimmermann W, Ferszt R, Steinbach F, Ludwig H. 1995.** Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nat. Med.* 1:232-236.
14. **Bora U, Chugh L, Nahar P, 2002.** Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *J Immunol. Methods.* 268(2):171-7.
15. **Boucher JM, Barbillon E, Cliquet F. 1999.** Borna disease: a possible emerging zoonosis. *Review. Vet. Res.* 30: 549-557.
16. **Briese T, de la Torre JC, Lewis A, Ludwig H, Lipkin WI, 1992.** Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11486-11489.
17. **Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park YS, Kim S, Ludwig H, Lipkin WI, 1994.** Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4362–4366 *Immunol* 283, 1–4.
18. **Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, Chang J, Brown WR, Cantarero LA, 1992.** The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods.* 150(1-2):77-90.
19. **Campbell CJ, Ghazal P, 2004.** Molecular signatures for diagnosis of infection: application of microarray technology. *J Appl Microbiol.* 96(1):18-23.
20. **Carbone KM, 2001.** Borna disease virus and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:513-527.
21. **Carbone KM, Duchala CS, Griffin JW, Kincaid AL, Narayan O, 1987.** Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol;* 61:343140.
22. **Carbone KM, Rubin SA, Sierra-Honigmann AM, Lederman HM, 1993.** Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol.*67:1453–1460.
23. **Chan W, White P, 2000.** Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. 2. painos. Oxford University Press, New York, USA.

24. **Cobb M, Gotcher S, 1982.** Fluorescence immunoassay in the clinical laboratory. *Am. J Med Technol.* 48(8):671-7.
25. **Conzelmann, KK, 2004.** Reverse genetics of mononegavirales. *Curr Top Microbiol Immunol.* 283:1-41. Review
26. **Cros JF, Palese P, 2003.** Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and borna disease viruses. *Virus Res.* 95, pp. 3–12.
27. **Cubitt B, de la Torre JC, 1994.** Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J. Virol.* 68:1371-1381.
28. **Cubitt B, Oldstone C, de la Torre J C, 1994.** Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol.* 68:1382–1396.
29. **Dakshinamurti K, Cauhan J, 1989.** Biotin. *Vitam. Horm.* 45: 337– 84. Artikkelissa: Alban C, Job D, Douce R, 2000. Biotin metabolism in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 51:17-47.
30. **Davies DR, Chacko S, 1993.** Antibody structure *Acc. Chem. Res.* 26: 421-427.
31. **Davies DR, Metzger H, 1983.** Structural basis of antibody function *Annu. Rev. Immunol.* 1: 87-117.
32. **De la Torre JC, 1994.** Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* 68:7669-7675
33. **De la Torre JC, 2002.** Bornavirus and the Brain. *J Infect Dis.* 186 Suppl 2:S241-7. Review.
34. **De la Torre JC, 2006.** Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus. *Nat Rev Microbiol.* 4(10):777-83.
35. **De la Torre JC, Bode L, Dürrwald R, Cubitt B, Ludwig H, 1996.** Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res.* 44:33-44.
36. **Degiorgis MP, Berg AL, Hård af Segerstad C, Mörner T, Johansson M, Berg M, 2000.** Borna disease in a free-ranging Lynx (*Lynx lynx*). *J. Clin. Microbiol.* 38: 3087-3091.
37. **Formella S, Jehle C, Sauder C, Staeheli P, Schwemmler M, 2000.** Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may contribute to high genome stability in persistently infected cells. *J. Virol.* 74:7878-7883.

38. **Gabig-Ciminska M, Andresen H, Albers J, Hintsche R, Enfors SO, 2004.** Identification of pathogenic microbial cells and spores by electrochemical detection on a biochip. *Microb Cell Fact.* 3(1):2.
39. **Gellert M, 1995.** "In the beginning the horse is sad"--a historical abstract of Borna disease. *Tierarztl Prax.* 23(3):207-16.
40. **Gitlin G, Bayer EA, Wilchek M. 1990.** Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochem J.* 269(2):527–530.
41. **Goldfarb MF, 1988.** Effect of heat inactivation on results of HIV antibody detection by Western blot assay. *Clin Chem.* 34(8):1661-2.
42. **Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000.** Kuby Immunology, 4. painos. W. H. Freeman and Company, USA.
43. **Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, de la Torre JC, 1998.** Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J. Virol.* 72:783-788.
44. **Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, Grässer FA, de la Torre JC, 1997a.** Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J. Virol.* 71:3208-3218.
45. **Gonzalez-Dunia D, Sauder C, de la Torre JC, 1997b.** Borna disease virus and the brain. *Brain Res Bull;* 44:647-64.
46. **Gosztanyi G, Ludwig H, 1995.** Borna disease neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol;* 190:39-73.
47. **Hagiwara K, Kamitani W, Takamura S, Taniyama H, Nakaya T, Tanaka H, Kirisawa R, Iwai H, Ikuta K, 2000.** Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet. Microbiol.* 72; 207-216.
48. **Hatalski CG, Kliche S, Stitz L, Lipkin WI. 1995.** Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol.* 69:741–747.
49. **Hatalski, CG, Lewis AJ, Lipkin WI, 1997.** Borna disease. *Emerg. Infect. Dis.* 3:129-135.
50. **Haynes LM, Miao C, Harcourt JL, Montgomery JM, Le MQ, Dryga SA, Kamrud KI, Rivers B, Babcock GJ, Oliver JB, Comer JA, Reynolds M, Uyeki TM, Bausch D, Ksiazek T, Thomas W, Alterson H, Smith J, Ambrosino DM, Anderson LJ, 2007.** Recombinant protein-based assays for detection of antibodies to severe acute respiratory syndrome coronavirus spike and nucleocapsid proteins. *Clin Vaccine Immunol.* 14(3):331-3.
51. **Herzog S, Rott R, 1980.** Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol (Berl);* 173:153-8.

52. **Hiller Y, Bayer EA, Wilchek M, 1991.** Studies on the biotin-binding site of avidin. Minimized fragments that bind biotin. *Biochem J.* 278:573-585.
53. **Holmskov-Nielsen U, Jensenius JC, Erb K, Husby S, 1984.** Immune complex formation analysed by high-performance size exclusion chromatography (HPLC-SEC) using either 125I-labelled antigen or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection. *Immunology.* 51(4):809-14.
54. **Hornbeck P, 1992.** Enzyme-linked immunosorbent assays. Kirjassa: Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E, Strober W toim. Current protocols in immunology, 2.1.1-22, Greene Publishing Associates, Wiley-Interscience, USA.
55. **Hornig M, Solbrig M, Horscroft N, Weissenbock H, Lipkin WI. 2001.** Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: Models for neuropsychiatric disease. *Curr Top Microbiol Immunol.*253:157–177.
56. **Hsu TA, Carbone KM, Rubin SA, Vonderfecht SL, Eiden J, 1994.** Borna disease virus p24 and p38/40 synthesized in a baculovirus expression system: Virus protein interactions in insect and mammalian cells. *Virology* 204, pp. 854–859.
57. **Johansson M, Berg M, Berg AL, 2002.** Humoral immune response against Borna disease virus (BDV) in experimentally and naturally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 90:23-33.
58. **Kiernan JA, 2000.** Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 00-1, 8-12.
59. **Kishi M, Nakaya T, Nakamura Y, Zhong Q, Ikeda K, Senjo M, Kakinuma M, Kato S, Ikuta K, 1995.** Demonstration of human Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* 364:293–297.
60. **Kliche S, Briese T, Henschen AH, Stitz L, Lipkin WI, 1994.** Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J Virol.* 68:6918–6923.
61. **Kliche S, Stitz L, Mangalam H, Shi L, Binz T, Niemann H, Briese T, Lipkin WI, 1996.** Characterization of the Borna disease virus phosphoprotein, p23. *J. Virol.* 70:8133-8137.
62. **Knowles JR. 1989.** The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 195– 21.
63. **Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Kurane I, Sano K, Nakai M, 1999.** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J. Virol.* 73:760-766.

64. **Koprowski H, Lipkin WI, 1995.** *Borna disease. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190.
65. **Kubo K, Fujiyoshi T, Yokoyama MM, Kamei K, Richt JA, Kitze B, Herzog S, Takigawa M, Sonoda S, 1997.** Lack of association of Borna disease virus and human T-cell leukemia virus type 1 infections with psychiatric disorders among Japanese patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4:189–194.
66. **Lequin RM, 2005.** Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin. Chem.*, 51(12): 2415 - 2418.
67. **Lipkin WI, Briese T, de la Torre JC, 1992.** Borna disease virus: molecular analysis of a neurotropic infectious agent. *Microb. Pathogenesis* 13, pp. 167–170.
68. **Lipkin WI, Hornig M, Briese T, 2001.** Borna disease virus and neuropsychiatric disease—a reappraisal. *Trends Microbiol.* 9:295-298.
69. **Lipkin WI, Travis GH, Carbone KM, Wilson MC, 1990.** Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci*; 87:4184-8.
70. **Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC, 1991.** Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur. J. Immunol.* 2:2951-2962.
71. **Livingston AD, Campbell CJ, Wagner EK, Ghazal P, 2005.** Biochip sensors for the rapid and sensitive detection of viral disease. *Genome Biol.* 6(6):112.
72. **Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, Sussman JL, 1993.** Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5076–5080.
73. **Ludwig H, Bode L, 1997.** The neuropathogenesis of Borna disease virus infections. *Intervirology* 40:185-97.
74. **Ludwig H, Bode L, 2000.** Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev. Sci. Tech.* 19 1, pp. 259–288.
75. **Ludwig H, Bode L, Gosztanyi G, 1988.** Borna disease: a persistent infection of the central nervous system. *Prog. Med. Virol.* 35, pp. 107–151.
76. **Ludwig L, Becht H, Groh L, 1973.** Borna disease (BD), a slow virus infection--biological properties of the virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 158:275-89.

77. **Mayr A, Danner K, 1972.** Production of Borna virus in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:511-5.
78. **Merrifield RB, 1963.** Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*; 85, 2149.
79. **Metzger, H. (toim.), 1990.** Fc Receptors and the Action of Antibodies. 1. painos. American Society for Microbiology, Washington, USA.
80. **Mitchell LA, Zhang T, Ho M, Décarie D, Tingle AJ, Zrein M, Lacroix M, 1992.** Characterization of rubella virus-specific antibody responses by using a new synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 30(7):1841-7.
81. **Monsan P, Puzo G, Marzarguil H, 1965. Artikkelissa: Kiernan JA, 2000.** Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 00-1, 8-12.
82. **Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ, 1986.** Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T-lymphocyte clones *J. Exp. Med.* 163: 903.
83. **Nakamura Y, Kishi M, Nakaya T, Asahi S, Tanaka H, Sentsui H, Ikeda K, Ikuta K, 1995.** Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine.* 13(12):1076-9.
84. **Nakamura Y, Watanabe M, Kamitani W, Taniyama H, Nakaya T, Nishimura Y, Tsujimoto H, Machida S, Ikuta K, 1999.** High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet. Microbiol.* 70: 153-167.
85. **Nakane PK, Pierce GB, 1967.** Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol*; 33:307-318.
86. **Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R, 1983.** Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent Borna virus in the brain. *Science*; 220:1401-3.
87. **Nowotny N, Kolodziejek J, Jehle CO, Suchy A, Staeheli P, Schwemmler M, 2000.** Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J. Virol.* 74:5655-5658.
88. **Parker DC, 1993.** T cell-dependent B-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 331-340.

89. **Perez M, de la Torre JC, 2005.** Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *J Gen Virol.* 86(Pt 7):1891-5.
90. **Perez M, Watanabe M, Whitt MA, de la Torre JC, 2001.** N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J. Virol.* 75:7078-7085.
91. **Pletnikov MV, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM, 1999.** Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav. Brain Res.* 100, 43-50.
92. **Poljak RJ, 1991.** Structure of antibodies and their complexes with antigens. *Mol. Immunol.* 28: 1341-1345.
93. **Pringle CR, 1995.** The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the sixth ICTV report in. *Arch Virol.* 143:203–209.
94. **Pringle CR, Easton AJ, 1997.** Monopartite negative strand RNA genomes. *Semin. Virol.* 8: 49– 57.
95. **Rajewsky K, 1996.** Clonal selection and learning in the antibody system *Nature.* 381: 751-758.
96. **Reeves NA, Helps CR, Gunn-Moore DA, Blundell C, Finnemore PL, Pearson GR, Harbour DA, 1998.** Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 143; 523-526.
97. **Richt JA, Furbringer T, Koch A, Pfeuffer I, Herden C, Bause-Niedrig I, Garten W, 1998.** Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J. Virol.* 72:4528-4533.
98. **Richt JA, Herzog S, Pyper JM, Clements JE, Narayan O, Bechter K, Rott R, 1993.** Borna disease virus: nature of the etiologic agent and significance of infection in man. *Arch Virol* 7 Suppl: 101-9.
99. **Richt JA, Pfeuffer I, Christ M, Frese K, Bechter K, Herzog S, 1997.** Borna Disease virus infection in animals and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 3:343-352.
100. **Richt JA, Rott R, 2001.** Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet. J.* 161:24-40.
101. **Richt JA, Stitz L, Deschl U, Frese K, Rott R, 1990.** Borna disease virus-induced meningoencephalomyelitis caused by a virus-specific CD4+ T cell-mediated immune reaction. *J Gen Virol* 71:2565-73.

102. **Richt JA, Stitz L, Wekerle H, Rott R, 1989.** Borna disease, a progressive encephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med* 170:1045-50.
103. **Richt JA, VandeWoude S, Zink MC, Clements JE, Herzog S, Stitz L, Rott R, Narayan O, 1992.** Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. *Clin Inf Dis* 14:1240-50.
104. **Rott R, Becht H, 1995.** Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol*; 190:17-30.
105. **Rott R, Herzog S, Fleischer B, Winokur A, Amsterdam J, Dyson W, Koprowski H, 1985.** Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228:755-756.
106. **Rubin SA, Waltrip R. W, Bautista JR, Carbone KM, 1993.** Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J. Virol.* 67, 548-552.
107. **Sauder C, Müller A, Cubitt B, Mayer J, Steinmetz J, Trabert W, Ziegler B, Wanke K, Mueller-Lantzsch N, de la Torre JC, Grässer FA, 1996.** Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol.* 70:7713–7724.
108. **Sauder C, Wolfer DP, Lipp H, Staeheli P, Hausmann J, 2001.** Learning deficits in mice with persistent Borna disease virus infection of the CNS associated with elevated chemokine expression. *Behav. Brain Res.* 120: 189-201.
109. **Schneemann A, Schneider PA, Lamb RA, Lipkin WI, 1995.** The remarkable coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210:1-8.
110. **Schneider PA, Schneemann A, Lipkin WI, 1994.** RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* 68, 5007-5012.
111. **Schneider U, Blechschmidt K, Schwemmler M, Staeheli P, 2004.** Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J. Biol. Chem.* 279:55290-55296.
112. **Schwardt M, Mayer D, Frank R, Schneider U, Eickmann M, Planz O, Wolff T, Schwemmler M, 2005.** The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J. Gen. Virol.* 86:3163-3169.
113. **Schwemmler M, Salvatore M, Shi L, Richt J, Lee C, Lipkin W, 1998.** Interactions of the Borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J. Biol. Chem.* 273:9007-9012.

114. **Shin DS, Kim DH, Chung WJ, Lee YS, 2005.** Combinatorial solid phase peptide synthesis and bioassays. *J Biochem Mol Biol.* 38(5):517-25. *Review.*
115. **Sierra-Honigmann AM, Rubin SA, Estafanous MG, Yolken RH, Carbone KM, 1993.** Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol;* 45:31-2.
116. **Staheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmle M, 2000.** Epidemiology of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 81:2123-2135.
117. **Stitz L, Dietzschold B, Carbone KM, 1995.** Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr Top Microbiol Immunol;* 190:75-92.
118. **Suter M, Butler JE, Peterman JH, 1989.** The immunochemistry of sandwich ELISAs--III. The stoichiometry and efficacy of the protein-avidin-biotin capture (PABC) system. *Mol Immunol.* 26(3):221-30.
119. **Tordo N, DeHaan P, Goldbach R, Poch O, 1992.** Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Semin Virol.* 3, pp. 341–357.
120. **Tuuminen T, Palomaki P, Paavonen J, 2000.** The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods.* 42(3):265-79. *Review*
121. **Vahlenkamp TW, Enbergs HK, Muller H, 2000.** Experimental and natural borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of peripheral blood. *Vet. Microbiol.* 76: 229-244.
122. **Waltrip RW II, Buchanan RW, Carpenter WT Jr, Kirkpatrick B, Summerfelt A, Breier A, Rubin SA, Carbone KM, 1997.** Borna disease virus antibodies and the deficit syndrome of schizophrenia. *Schizophr Res.* 23:253–257.
123. **VandeWoude S, Richt JA, Zink MC, Rott R, Narayan O, Clements JE, 1990.** A Borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral diseases. *Science* 250:1278-81.
124. **Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Närvänen A, Julkunen I, Lundkvist A, Plyusnin A, Lehvälaiho H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Lankinen H, 1995.** Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. *J Med Virol.* Aug 46(4):293-303.
125. **Venisnik KM, Olafsen T, Loening AM, Iyer M, Gambhir SS, Wu AM, 2006.** Bifunctional antibody-Renilla luciferase fusion protein for in vivo optical detection of tumors. *Protein Eng Des Sel.* 19(10):453-60.

126. **Whelan SP, Barr JN, Wertz GW, 2004.** Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 283:61-119. Review.
127. **White DO, Fenner F (toim.) 1994.** Medical Virology, 4.painos. Academic Press, San Diego, USA.
128. **Vitetta ES, Berton MT, Burger C, Kepron M, Lee WT, Yin XM, 1991.** Memory B and T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 193–217.
129. **Yeung SW, Lee TM, Cai H, Hsing IM, 2006.** A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification. *Nucleic Acids Res.* 34(18):e118.
130. **Zhang H, Meyerhoff ME, 2006.** Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance. *Anal Chem.* 78(2):609-16.
131. **Zwick W, 1939.** Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. Artikelissa: Gildenmeister E, Haagen E, Waldmann O, editors. Handbuch der Viruserkrankungen. Gustav Fischer Verlag, Jena;. p. 252-354.