



Ulla Lahtinen

**1B10-G3-VASTA-AINEEN ELINKAARI LAADUNVALVONNAN
NÄKÖKULMASTA**

1B10-G3-VASTA-AINEEN ELINKAARI
LAADUNVALVONNAN NÄKÖKULMASTA

Ulla Lahtinen
Opinnäytetyö
1.5.2012
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, Bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä(t): Ulla Lahtinen
Opinnäytetyön nimi: 1B10-G3-vasta-aineen elinkaari laadunvalvonnan näkökulmasta
Työn ohjaaja(t): Elsa Kumpulainen, Johanna Veijola
Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2012 Sivumäärä: 58 + 26 liitettä

Työn tavoitteena oli laatia vasta-aineen tuotannosta laatukäsikirja kuvitteelliselle laboratoriopalveluita tarjoavalle virtuaalilaboratoriolle. Työssä käydään läpi vasta-aineen tuottomekanismi sekä joitakin tarvittavia työohjeita käyttäen esimerkkinä 1B10-G3-vasta-ainetta. Työssä on panostettu laadun tarkkailuun ennen ja jälkeen tuotantoprosessin kuin itse tuotantoprosessinkin aikanakin. Vasta-aineelle 1B10-G3 tehdään ELISA-testejä, jolla varmennetaan vasta-aineen toimivuus ja herkkyys antigeeniänsä kohtaan.

1B10-G3-vasta-aine on monoklonaalinen vasta-aine, joka on spesifinen hormonille NTproBNP. Tätä hormonia erittyy kehoon sydäninfarktin aikana. 1B10-G3:lla voidaan todeta pikatesteissä potilaan verestä otetusta näytteestä hormonin NTproBNP olemassa olo, mikä vaikuttaa potilaan jatkohoitoihin.

Vasta-ainetta 1B10-G3 onnistuttiin valmistamaan ja todettiin sen toimivan eli spesifisesti tarttuvan antigeeniinsä NTproBNP:hen. Opinnäytetyö suoritettiin Oulun Yliopiston, Biolääketieteen laitoksen fysiologian yksikössä.

Asiasanat: Vasta-aine, laadunvalvonta

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ.....	3
1 JOHDANTO	6
2 IMMUNOLOGISEN TESTIN KOMPONENTIT	8
2.2 Rekombinantti Fab-vasta-aine	10
2.3. Antigeeni NTproBNP ₁₋₇₆	11
2.4. Sandwich-menetelmä pikatesteissä	12
3 GLP - HYVÄT LABORATORIOKÄYTÄNNÖT	14
3.1 Reagenssit	14
3.2 Välineet ja laitteet	15
3.3 Välinehuolto	15
3.4 Välineiden ja liuosten sterilointi	16
3.5 Soluviljelytyöskentely laboratoriossa	16
3.6 Vasta-aineen testausmenetelmiä	17
3.6.1 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)	17
3.6.2 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)	19
4 VASTA-AINEEN TUOTANTOPROSESSI	21
4.1 Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto nisäkässoluissa	21
4.2 Vasta-aineen tuotto bakteerissa	22
4.2.1 Geeninsiirto bakteerisoluihin ja kloonien valinta	23
4.2.2 1B10-kloonien kasvatus	24
4.2.3 DNA:n eristys 1B10-klooneista	25
4.2.4 Testidigestio	26
4.2.5 Sekvensointi	27
4.2.7 Tuotteen tarkistus	29
4.2.8 ELISA-testit	29
4.2.9 Vasta-aineen Wester blot -analyysi	31
4.3 Varsinainen vasta-aineen tuotto	32
5 JÄLKIKÄSITTELYVAIHEET	34
5.1 Vasta-aineen affiniteettipuhdistus	34
5.2 Tuotteen formulointi ja varastointi	35
6 PUHTAAN VASTA-AINEEN LEIMAUS JA TESTAUS	36
6.1 HRP-leimatun 1B10:n testaus	36

6.1.1 HRP-Leimaus.....	36
6.1.2 ELISA-testi HRP-leimatulle 1B10:lle	37
6.2 1B10-vasta-aineen ELISA-esitesti.....	38
6.3 Vasta-aineen 1B10:n herkkyystesti ELISA-testillä.....	39
6.4 Luminesenssin ja ALEXA-FLUORin esitestit.....	43
6.5 Syrjäytymiskoe	46
7 TUOTTEEN KUVAUS.....	50
7.1 Tuotteen pääpiirteet	50
7.2 Tuotteen soveltuvuus	50
7.3 Tuotteen varastointi ja säilyvyys.....	51
8 TUOTTEEN HALLINNOINTI.....	52
9 POHDINTA	53
LIITTEET	58

1 JOHDANTO

Laatuasiat eivät ole aivan itsestään selviä. Ne muuttuvat merkittäviksi, kun tuote ei jää vain omaan käyttöön, vaan sitä jaetaan ulkopuoliselle eli asiakkaalle. Kun tuotetta myydään maksaville asiakkaille tai sitä käytetään diagnostiikassa, sen laatuvaatimukset tiukentuvat ja laadunvalvonnalle on säädetty omat viranomaisvaatimukset.

Laatujärjestelmät on kehitetty kuvaamaan organisaation laadukasta työskentelyä eri tasoilla. Yleisimmin käytetyt laatujärjestelmät ovat GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing Practice) ja GHP (Good Hygiene Practises). GLP eli hyvät laboratoriotyötavat pitäisi olla joka yliopiston/korkeakoulun tutkimuslaboratorioissa iskostettuna jokaiseen laboratoriossa työskentelevään työntekijään. GMP on edellistä tiukempi laatujärjestelmä ja sitä käytetään muun muassa lääkeyrityksissä muiden laatujärjestelmien tavoin parantamaan tuotantoprosessia minimoiden virheitä. Lähtökohtana on kuitenkin aina potilasturvallisuuden varmistaminen. GHP eli hyvä tuotantohygienia koskee erityisesti elintarviketeollisuutta. Näiden lisäksi on olemassa myös GCP (Good Clinical Practice), jonka mukaan on suunniteltava, suoritettava ja raportoitava kaikki kliiniset lääketutkimukset, erityisesti ihmiseen kohdistuvat. (GMP Good Manufacturing Practise, Validant 2010; Hyvän Kliinisen tutkimuksen periaatteet, TurkuCRC 2011.)

GLP, GMP ja GCP ovat EU:ssa direktiivillä ohjeistettuja ja maakohtaisesti lakisääteisiä laatujärjestelmiä, joita noudatetaan lääkkeiden kehityksessä, tutkimuksessa ja valmistuksessa. EU:n ulkopuolelle mm. USA:n ja Japaniin lääkkeen myyntilupaa haettaessa on huomioitava kohdemaiden kansalliset määräykset. ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) on yhdenmukaistanut GCP-ohjeet EU:ssa, Japanissa ja USA:ssa (GMP Good Manufacturing Practice, Validant 2010).

Diagnostiikkateollisuus on voimakkaassa kasvussa, kuin myös vasta-aineiden tuottaminen ja hyödyntäminen. Nykyään vasta-aineita voidaan käyttää moniin tarkoituksiin, esimerkiksi ihmisen sisäisten täsmälääkkeiden kuljetukseen, syöpähoitoon, estäjätoimintaan ja sairauksien ennaltaehkäisyyn, samaan tapaan kuin rokotteita. Ihmisessä käytettävien vasta-aineiden tulee aina olla rakenteeltaan ihmisperäisiä allergisten reaktioiden estämiseksi. Vasta-aineita käytetään diagnostiikassa, koska ne ovat spesifisiä, herkkiä ja tunnistavat analyyttien pieniä pitoisuuksia. Nykyään vasta-aineiden tuottaminen ja erityisesti niistä koottujen diagnostisten testien myyminen on tuottoisaa liiketoimintaa, joka on kasvussa myös pienien organisaatioiden taholla.

Toimialana diagnostiikkatuotteiden valmistus luetaan ”lääkinnällisten laitteiden” valmistukseen. ISO13485-standardi määrittää vaatimukset laadunhallintajärjestelmälle organisaatioissa, joilla on mahdollisuus tarjota lääkinällisiä laitteita ja niihin liittyviä palveluita, jotka säännönmukaisesti täyttävät lääkinällisille laitteille ja niiden palveluille viranomaismääräysten mukaiset vaatimukset.

Tässä opinnäytetyössä selvitetään virtuaalilaboratorion 1B10-G3 vasta-aineen tuotantoa ja palvelun myyntiä laadunvalvonnan näkökulmasta. 1B10-vasta-aine ja sen pari Fab32 toimivat NTproBNP-antigeenin osoittajana, joka on koko maailmassa yleisimmin käytetty merkkiaine sydämen toimintahäiriön tutkimiseen. Opinnäytetyössä käytetyt ohjeet ja reagenssit ovat esimerkkejä yleisimmistä käytetyistä tuotantotavoista. Opinnäytetyö on tehty talven 2011–2012 aikana Oulun Yliopiston Biolääketieteen laitoksella, Fysiologian yksikössä.

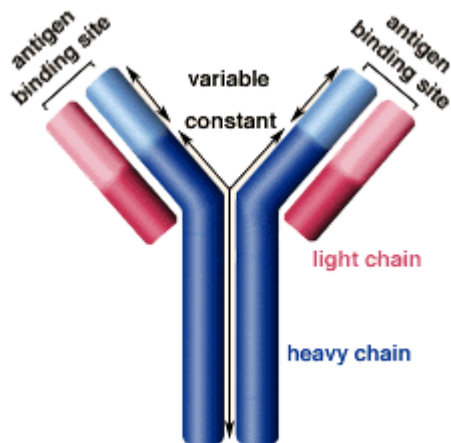
2 IMMUNOLOGISEN TESTIN KOMPONENTIT

Immunologiset testit perustuvat usein vasta-aineparin spesifiseen sitoutumiseen tutkittavan analyysin, antigeenin pintaan. Puhtaan vasta-aineen avulla ja herkillä menetelmillä voidaan mitata hyvin pieniä antigeenipitoisuuksia. Useat lääke diagnostiikan pikatestit, kuten raskaustesti, perustuvat tähän menetelmään.

2.1. Luonnolliset vasta-aineet

Perna on tärkeä sisäelin, mikä tuottaa luonnollisesti vasta-aineita. Luonnollista vasta-aine tuotantoa tapahtuu silloin kun ihminen altistuu jollekin elimistön ulkopuoliselle vieraille aineelle esimerkiksi sairastuessaan. Tällöin ihmiskeho aloittaa pitkän ja hitaan prosessin vasta-ainetuotannossa. Vastakohtana luonnolliselle altistumiselle vieraille aineille on rokottaminen. Perna sijaitsee vatsaontelon vasemmassa yläneljänneksessä eli kehon vasemmalla puolella alimman kylkikaaren suojassa. Perna koostuu niin sanotusti punaisesta ja valkoisesta ytimestä. Punainen ydin poistaa verestä vanhat ja vahingoittuneet punasolut kun taas valkoisen ytimen päätehtävä on tuottaa vasta-aineita. Perna valikoi verestä antigeenit, jotka aktivoivat pernassa sijaitsevia B-soluja vasta-ainetuotantoon. (Vesänen 2001.)

Vasta-aineet ovat pallomaisia proteiineja, joita kutsutaan immunoglobuliineiksi eli lyhennettynä Ig-molekyyleiksi. Niitä erittyy selkärankaisten verenkiertoon ja kehon eritteisiin immuunijärjestelmän tuottamina, ja niillä on spesifisiä antigeenejä sitovia kohtia. Tyypillinen vasta-aine onkin Y-kirjaimen muotoinen, jossa Y:n ylimmät sakarat ovat antigeenin tarttumiskohdat. Näitä kutsutaan Fab-alueiksi. Vasta-ainemolekyylit muodostuu kahdesta raskaasta H (heavy)-ketjusta ja kahdesta keveästä L (light)-ketjusta. Ketjut ovat sitoutuneet rikkisilloin toisiinsa kiinni. Kuva 1 esittää vasta-aineen Y-kirjaimen muotoista rakennetta. (Vasta-aineet 2006.)



KUVA 1. Vasta-aineen rakenne (MIT-4070/MIT-4076 Biosensors)

Vasta-aineantigeenireaktioita käytetään biokemiallisissa tutkimuksissa. Suuren spesifisyytensä vuoksi voidaan vasta-aineilla tunnistaa hyvin pieniä antigeenipitoisuuksia verestä, elimistön nesteistä tai solunrakenteista. (Turpeenoja 2005, 99.)

Antigeenit ovat elimistölle vieraita molekyylejä. Antigeenin avulla elimistö herättää vasta-ainetuotannon eli elimistössä olevat B-solut muokkautuvat ja spesifisoituvat aina yhtä antigeeniä vastaan. B-solut ovat erilaistuneita valkosoluja, jotka aktivoituvat antigeenistä. Kun B-solu aktivoituu tuottamaan vasta-ainetta, se muuttuu efektorisoluksi, joka tuottaa suuria määriä liukoisia vasta-ainemolekyylejä. Kun vieras antigeeni on poistunut elimistöstä, B-solut lakkaavat toimimasta, mutta jättävät muistisoluja, jotka sisältävät vasta-ainetuotannon koodin. Saman antigeenin joutuessa elimistöön uudelleen alkaa vasta-aineentuotanto heti, jolloin immunovaste toimii tehokkaammin ja antigeeni ehditään tuhota ennen sen leviämistä. (Histologia 2006.)

Vasta-aineita tuotetaan laboratorioissa altistamalla eläin antigeenille, jolloin eläimessä muodostuu tietyille antigeenille spesifisiä vasta-aineita. Periaate on sama kuin ihmisen rokotuksissa. Kun spesifistä vasta-ainetta on muodostunut jotain antigeeniä vastaan, vasta-aine tunnistaa tämän tietyn antigeenin. Vasta-aine tunnistaa antigeenin Fab (variable)- alueellansa.

Vasta-aine ja antigeeni sitoutuvat toisiinsa non-kovalenttisin sidoksin. Koska sidos on hyvin löysä, voi vasta-aineella olla kaksi tai useampi antigeenin tarttumiskohtaa. Vasta-aineen sitouduttua antigeeniin, antigeenin vaikutus neutralisoituu ja elimistössä vasta-aineen sitomat antigeenit tuhoutuvat. (Soppi 1992, 5–10.)

Diagnostisissa vasta-ainetesteissä antigeeniä käytetään kontrollimolekyyleinä, joiden avulla tehdään muun muassa tutkittavan analyysin standardikuvaajia. Antigeenit toimivat myös itse testissä positiivisina kontrollinäytteinä, jolla varmistetaan testin luotettavuus. (Turpeenoja 2005, 188.)

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan soluviljelmissä yhdistelmäsoluilla eli hybridisoluilla. Hiiri rokotetaan antigeenillä. Vasta-aineen muodostumisen jälkeen hiiren perna eristetään jatkokäsittelyä varten. Perna kudosis hajotetaan ja pernan solut yhdistetään loputtomasti jakautuvien syöpäsolujen kanssa, joita kasvatetaan soluviljelmässä. Solupopulaatiosta valikoidaan haluttua vasta-ainetta tuottavat solut, kloonit, joita kasvatetaan huolellisesti. Näistä soluista saadaan eristettyä yhden lymfosyyttityypin tuottamaa spesifistä vasta-ainetta, jota kutsutaan monoklonaaliseksi vasta-aineeksi. (Turpeenoja 2005, 100.)

2.2 Rekombinantti Fab-vasta-aine

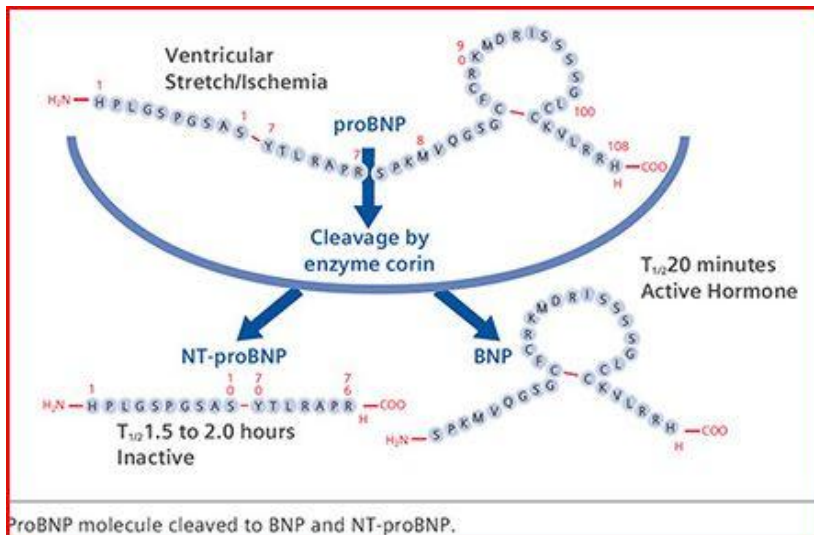
Kokonaisten IgG-vasta-aineiden valmistus nisäkässoluissa on kallista muun muassa käytetyn ravintoaineen vasikanseerumin takia. Vasta-aineen osia voidaan tuottaa halvemmissä systeemeissä kuten bakteereissa ja muissa mikrobeissa geeniteknisesti. Mikrobeissa tuottomäärät ovat paljon suurempia. Koska Fab-vasta-ainetta koodaava DNA-sekvenssi on tiedossa, voidaan aina valmistaa uusi vasta-ainetuottovektori, jos vahingossa vasta-ainesolulinja pääsee tuhoutumaan tai eristetty DNA hajoaa. (Veijola. 2011.)

Rekombinantti Fab-vasta-aine on geenitekniikan avulla rakennettu vasta-aine, jonka geenijärjestys tunnetaan. Geenitekniikan avulla Fab-vasta-

aineen rakennetta voidaan muokata: Fab-vasta-aineen sitoutumisominaisuuksia voi parantaa muuttamalla aminohappojärjestystä tai lisäämällä proteiiniosia. Rakenteeltaan Fab-vasta-aine vastaa IgG-molekyylin Y-kirjaimen yhtä haaraa. Geenitekniikan avulla voidaan muodostaa Fab-vasta-aineita, jotka sisältävät jopa kolme Y-haaraa, ilman vasta-aineen jalka-osaa. Fab-vasta-aine on kooltaan pienempi molekyylillä, josta diagnostiikassa on hyötyä, sillä pienempikokoista molekyylillä voidaan kiinnittää kuoppalevyn kaivon pohjalle suhteessa enemmän kuin suurikokoista IgG-molekyylillä.

2.3. Antigeeni NTproBNP₁₋₇₆

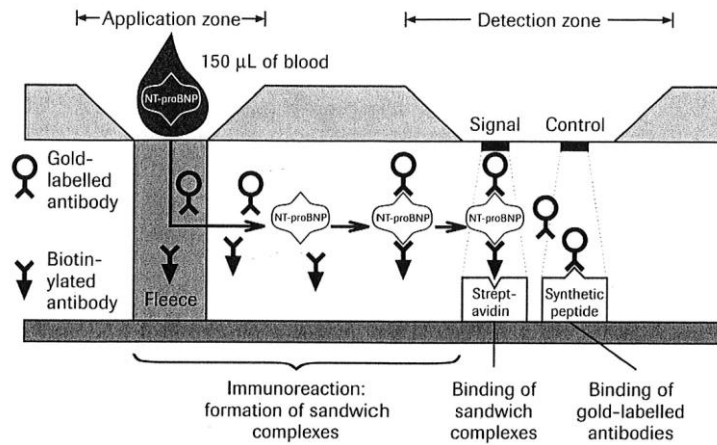
NTproBNP (amino terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide) on hormoni, jota sydänsolu tuottaa ihmisen verenkiertoon sydämen voimakkaan rasituksen aikana. Kun sydämen toiminta heikkenee, sydänlihassolut syntetisoivat solun sisälle hormonin esimuotoa proBNP:tä. Verisuoniin imeytyessään se tehostaa verisuonten seinämien relaksaatiota sekä veren ja suolojen eritystä munuaisissa. proBNP pilkkoutuu ennen verenkiertoon päätymistä kahdeksi osaksi: biologisesti aktiiviseksi BNP₇₇₋₁₀₈:ksi ja ei-aktiiviseksi rakenteeksi, NTproBNP₁₋₇₆:ksi. Kuvassa 2 esitetään proBNP:n pilkkoutuminen, kun se erittyy ulos solusta. Hormonin NTproBNP(1-76) osa on pitkäikäisempi kuin BNP-osa, jota ”esiintyy” vain noin 20 minuuttia ennen hajoamistaan. NTproBNP:tä tutkitaan ihmisen verestä pikatesteillä, joiden avulla voidaan todeta, onko potilaalla ollut sydäninfarktia muutamaa tuntia aikaisemmin. proBNP muodostuu 108 aminohaposta, johon sisältyy 17 aminohapon rengas. (Ala-Kopsala 2006, 23-25; Lommi 2003.)



KUVA 2. Proteiinin proBNP esimuoto (Natriuretic Peptides 2011)

2.4. Sandwich-menetelmä pikatesteissä

BNP-pikatestit perustuvat pääasiassa niin sanottuun Sandwich-menetelmään. Testiliuskalle tiputetaan pisara verta, joka sisältää tutkittavaa analyyyttiä, NTproBNP:tä. Kultapartikkelilla leimattu vasta-aine tarttuu spesifisesti NTproBNP-molekyylin yhteen osaan ja biotiini-leimattu vasta-aine toiseen osaan. NTproBNP-molekyylä jää ikään kuin sämpylän puoliskojen väliin. Sandwich-kompleksi kulkeutuu kohti alustan sitoutumiskohtaa, johon on kiinnitetty biotiinia sitova streptavidini. Vain jos sandwich-kompleksi on syntynyt, muodostuu liuskalle värisignaali. Kultaleimattu monoklonaalinen vasta-aine tunnistaa NTproBNP-molekyylin aminohapot 27-31, joihin se tarttuu. Kakkosvasta-aineena on polyklonaalinen biotiininen vasta-aine, joka tunnistaa aminohapot 39-50. Kuva 3 havainnollistaa pikatestin toimintaperiaatteen.



KUVA 3. NTproBNP:n pikatestin kaaviokuva (Bertsch ym, 2007)

Testeissä on aina myös kontrolliviiva, joka osoittaa testin toimivuuden. Testin pohjassa on kiinni synteettinen peptidi, jonka rakenne vastaa antigeenin sitoutumiskohtaa, johon kultaleimattu vasta-aine sitoutuu tuottaen silmin havaittavan punertavan väriyöhykkeen, jonka perusteella testin voidaan todeta toimivan.

3 GLP - HYVÄT LABORATORIOKÄYTÄNNÖT

Validointi ja hyvät tuotantotavat ovat osa laadukasta tuotantoprosessia. GLP eli hyvät laboratoriokäytännöt on laatujärjestelmämalli, jota pitäisi kaikkien tutkimuslaboratorioiden noudattaa. Laatujärjestelmän avulla pyritään edistämään testaustulosten vastavuoroista hyväksymistä eri maissa. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) on päätössuosituksissa säätänyt GLP:n periaatteista, joita noudatetaan kaikissa OECD:n jäsenmaissa, kuten myös Suomessa. EU-maissa on säädetty EU-direktiivi koskettamaan GLP-periaatteita. (Räisänen 2007.)

GMP eli hyvät tuotantotavat koskevat kaikkia farmaseuttisen tuotteen tuotantoprosessia. Sitä käyttävät ohjenuoranaan viranomaiset, jotka tarkastavat tuotantoprosesseja. Hyvien tuotantotapojen periaatteisiin liittyvät esimerkiksi henkilöstön ammattitaitoisuus, prosessivalvontajärjestelmän kalibrointi ja dokumentointi, varastointi ja laadunvarmistus. (Aittomäki – Eerikäinen – Leisola – Ojamo – Suominen & von Weymarn 2002, 402.)

Laadunhallintaan kuuluu yleisesti työskentelytapojen, reagenssien ja välineiden oikeaoppinen käyttö ja puhtaus. Laboratorion eri osastojen ja laitteiden sijoittelu tulee olla mietitty työskentelyn tehokkuuden ylläpitämiseksi sekä kontaminaatioiden eli näytteiden tai materiaalin saastumisen estämiseksi. Laadunhallintaan kuuluu yhtenä osana selkeät työskentelyohjeet, jotka helpottavat uusien työntekijöiden työskentelyä.

3.1 Reagenssit

Laboratorion reagenssien täytyy olla laatujärjestelmien mukaiset ja niistä täytyy huolehtia laatujärjestelmien mukaisesti. Reagensseja säilytetään omassa huoneessa, jonka välittömässä läheisyydessä sijaitsevat vaa'at reagenssien punnitsemista varten. Myrkylliset ja hapettavat reagenssit sekä puhtaat etanolivalmisteet sijaitsevat lukitussa kaapeissa, joiden avaimista vastaa laboratoriopäällikkö tai muu nimetty vastuuhenkilö. Puhtaiden etanolivalmisteiden

käyttöä valvoo myös laboratoriopäällikkö. Reagenssien tulisi olla hyllyissään aakkosjärjestyksessä työskentelyn helpottamiseksi. Reagensseista pidetään omaa kortistoa sekä laboratoriopäällikön tietokoneella että erillisessä kansiossa.

Punnittaessa reagensseja punnitsijan tulisi ottaa erilliseen puhtaaseen astiaan sopiva määrä reagenssia ja siitä annostella punnitusastiaan, jotta alkuperäinen reagenssi säilyisi mahdollisimman puhtaana ja kuivana. Punnittaessa vaakahuoneen oven tulisi olla kiinni turhien ilmavirtojen estämiseksi. Osa reagensseista voi olla hyvinkin kalliita, joten hukkaan heittämistä tulisi välttää.

3.2 Välineet ja laitteet

Laboratoriossa eri tarkoituksiin hankitut välineet ja laitteet on tärkeä tuntea, jotta niitä osaa käyttää oikeaoppisesti. Välineet ja laitteet kaipaavat aina tietyn väliajoin huoltoa ja kalibrointia. Jokaista laitetta valvotaan ja niiden huolloista pidetään kirjaa. Jokainen laite on merkitty laiteluetteloon, johon on merkitty yleisimmät laitteen tiedot: merkki, malli, sarjanumero ja käyttöönottopäivä. Esimerkkinä yhdestä tärkeimmästä laboratoriovälineestä on vaaka. Vaa'at täytyy kalibroida ja huoltaa säännöllisesti. Jokainen vaa'an käyttäjä pitää huolen jälkien siistimisestä käytön jälkeen. Yksi hyvän laadun merkeistä on, etteivät reagenssipurkit loju pitkin pöytiä, ja sekä käytetyt että käyttämättömät lusikat ja alustat ovat omissa paikoissaan. Pöydät pyyhitään joka päivä ja vaa'an läheisyydessä on oltava sivellin vaa'an puhdistamista varten.

3.3 Välinehuolto

Vasta-aineita käsiteltäessä on tärkeää, että käytettävät välineet ja astiat ovat puhtaita. Laboratoriossa puhtaat astiat sijaitsevat omassa tilassaan lasikaapissa pölyyntymisen estämiseksi. Lasikaapissa puhtaat astiat ovat järjestyksessä. Välinehuoltajat tiskaavat likaiset astiat ja tuovat puhtaat välineet niille tarkoitetuille paikoille. Käytetyt likaiset välineet käyttäjä huuhtelee vedellä ja

joko vie likaisille astioille tarkoitettuun tilaan tai tarvittaessa itse tiskaa käsin tai tiskikoneella.

3.4 Välineiden ja liuosten sterilointi

Sterilointia vaativat välineet ja liuokset toimitetaan autoklaavihuoneeseen, jossa välinehuoltajat autoklavoivat ne. Autoklavoitavien astioiden suut peitetään foliolla ja folion päälle liimataan pala autoklavointiteippiä. Pipetin kärjet steriloidaan niiden omissa rasioissa tai ne tulevat tehtaalta valmiiksi steriloituna. Eppendorf-putkia voidaan steriloida foliolla peitetyssä isossa dekantterilasissa tai erityisissä autoklavointipusseissa

Liuoksia autoklavoitaessa on huomioitava, että pullon tilavuudesta jätetään noin 1/3 on tyhjäksi kuohumisen varalta. Korkki laitetaan ½ kierrosta auki, jotta pullon sisäinen ja ulkoinen paine pysyisivät tasapainossa. Korkki peitetään foliolla ja sen päälle laitetaan autoklavointiteippiä, joka kertoo, onko sterilointi tapahtunut oikeissa olosuhteissa. Teippiin merkataan pullon sisältö ja huonenumero. Joitakin liuoksia ja reagensseja, kuten esimerkiksi happoja, emäksiä, antibiootteja ja kasvatusseerumeja ei voi steriloida autoklaavilla. Ne pitää steriilisuodattaa 0,22 µm:n filterillä, jonka läpi bakteerit eivät mahdu.

3.5 Soluviljelytyöskentely laboratoriossa

Soluviljelytyöskentelyssä pahin kontaminaatioiden lähde on itse työntekijä. Jo pienikin ilmavirran mukana tullut hiukkanen voi pilata koko työn. Siksi onkin tärkeää huolehtia oikeista työskentelytavoista. Aina ennen soluviljelylaboratorioon saapumista ja sieltä lähdettäessä on pestävä kädet. Hansikkaita pidetään koko ajan, ja ne vaihdetaan tarvittaessa uusiin. Eppendorf-putkia käsiteltäessä käytetään apuna pinsettejä: Putket aukaistaan pinseteillä, jottei työntekijän hanskoista siirtyisi epäpuhtauksia putkiin. Putkia myös siirretään mahdollisimman paljon pinseteillä ja varotaan koskettamasta lähelle putkien suuta. Esimerkiksi DNA-työskentelyssä on tärkeä muistaa, että ihmisen kädet sisältävät paljon DNA-aaseja eli entsyymejä, jotka tuhoavat DNA:ta. Siksi

herkimmissä työskentelyvaiheissa on tärkeää muistaa huuhtoa kädet 70 prosenttisella etanolilla ja antaa niiden myös kuivua ennen työn aloittamista. Aina ennen työskentelyn siirtymistä laminaarikaappiin, on muistettava käsien ja tavaroiden suihkuttaminen 70 prosenttisella alkoholilla kontaminaatioiden estämiseksi.

Ennen työn aloittamista työntekijällä tulisi olla selvillä työn eri vaiheet, jotta hän voi sijoittaa lähelleen tarvittavat välineet ja reagenssit. Tavaroiden hakeminen kesken kaiken hidastaa aina työtä ja lisää kontaminaatoriskiä. Pipetoitaessa reagenssien tulisi olla lähekkäin, jotta hyvät laboratoriotyötavat toteutuisivat. Työskennellessä pyritään aina toimimaan hyvien laboratoriokäytännön mukaisesti. Soluviljelyn työohjeet ovat laboratoriopäällikön hyväksymät.

3.6 Vasta-aineen testausmenetelmiä

Vasta-aineen ominaisuuksien tutkimiseen käytetään yleisesti ELISA-testejä niiden helppouden takia. ELISA-testit perustuvat antigeenin ja vasta-aineen spesifiseen sitoutumiseen. Toinen tärkeä vasta-ainetuotannossa käytetty testimenetelmä on erottaa vasta-ainegeenejä sisältävät näytteen DNA:t agarosigeelille, jolla voidaan todeta, että tuottovektori sisältää vasta-aineen tuottogeenin. Agarosigeeliltä voidaan myös poimia oikein pilkkoutuneet DNA-fragmentit sekvensoitavaksi eli DNA geenijärjestyksen selvittämiseksi.

3.6.1 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)

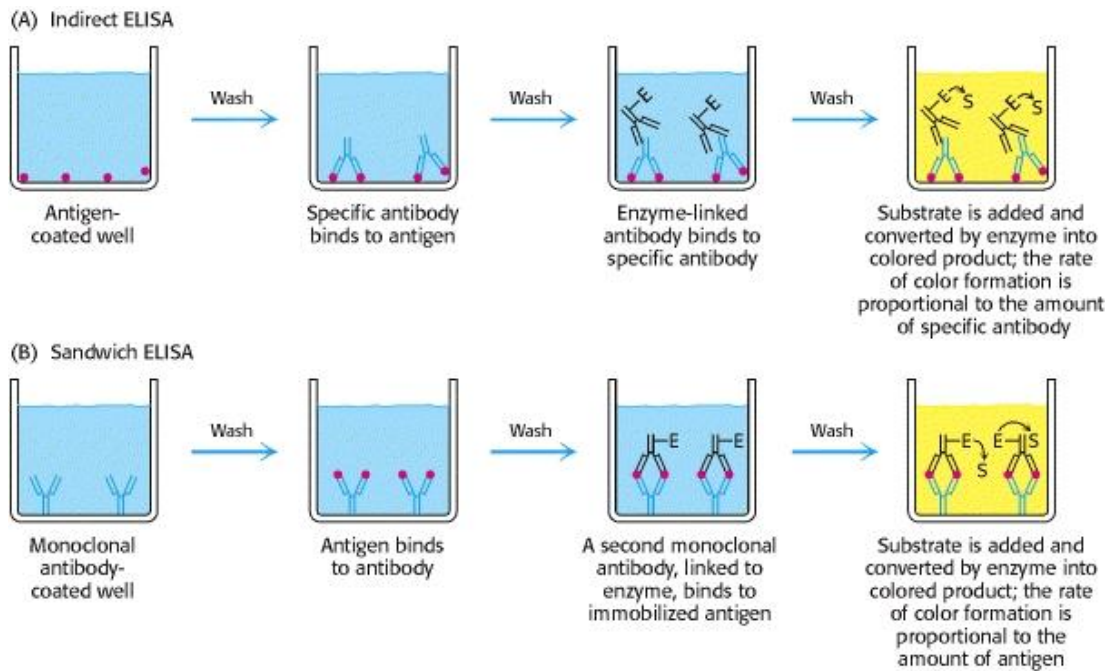
Vasta-aineita ja niiden tuottumista raakamediumiin voidaan testata ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys) -testien avulla. ELISA-testit perustuvat vasta-aineiden spesifisyyteen antigeenejään kohtaan. Ne voidaan jakaa kolmeen erilaiseen luokkaan: epäsuora-ELISA, suora-ELISA ja sandwich-ELISA. Suora ELISA-menetelmä on monipuolisin menetelmä, mutta sandwich-menetelmä on paras antigeenin määrän mittaamiseen näytteestä. Antigeenin tai vasta-aineen pitoisuuksien mittaamiseen käytetään yleisesti entsyymileimattuja reagensseja. ELISA-testeissä voidaan käyttää suoria ja

epäsuoria metodeja. Suorassa metodissa ensimmäinen vasta-aine on leimattu, ja se tarttuu antigeeniin. Epäsuorassa metodissa kakkosvasta-aine on leimattu ja tämä tarttuu antigeeniin tarttuneeseen ensimmäiseen vasta-aineeseen. (Overview of ELISA 2011; Harlow, Lane 1988, 555–557.)

Suorassa-ELISAssa antigeeni kiinnitetään kaivon pohjalle ja leimattu vasta-aine tarttuu antigeeniin. Tämän jälkeen kaivoon lisätään substraattia, joka saa leiman aktivoitumaan ja värikompleksin syntymään. Näytteet mitataan sopivalla aallonpituudella. Antigeenin pitoisuus on suoraan verrannollinen vasta-aineenpitoisuuteen. Suoralla-ELISAlla mitataan antigeenipitoisuuksia.

Epäsuora-ELISA on melkein samanlainen kuin suora-ELISA, mutta siinä käytetään kahta vasta-ainetta. Ensimmäinen vasta-aine tarttuu spesifisesti antigeeniin ja kakkos-vasta-aine, joka on leimattu, tarttuu ensimmäiseen vasta-aineeseen. Kakkos-vasta-aine on oltava aina sitä lajin vasta-ainetta vastaan, missä lajissa vasta-aine on alun perin muodostunut. Kun substraatti lisätään, syntyy värikompleksi, joka voidaan mitata sopivalla aallonpituudella. Kuva 4 A selventää epäsuoran-ELISAn periaatetta piirroksin. Epäsuoralla ELISAlla mitataan vasta-ainepitoisuuksia. (Harlow - Lane 1988, 561-563.)

Sandwich-ELISAssa on kaivojen pohjalle kiinnitetty vasta-ainetta. Kun kaivoon pipetoidaan antigeeni, se tarttuu vasta-aineeseen. Sitten kaivoon lisätään leimattu kakkosvasta-aine, joka tarttuu antigeeniin. Antigeeni jää niin sanotusti voileivän väliin. Siitä juontuu koko menetelmän englanninkielinen nimi, joka on sama suomen kielessäkin. Kun substraatti lisätään, saadaan värikompleksi mitattua. Kuvassa 4 B on esitetty sandwich-ELISA piirroksin. Sandwich-ELISA mittaa antigeenin pitoisuutta testissä. (Harlow - Lane 1988, 578-579.)



KUVA 4. ELISA-testin periaatekuvat suorasta ja sandwich-ELISA:sta (Chakravarth 2011).

ELISA-testien laaduntarkkailussa on testattava puhtaat kuoppalevyt, pinnoitetut kuoppalevyt, kiinnityksen onnistuminen, käytettävien puskureiden toimivuus, standardikuvaajien paikkaansa pitävyys ja kontrollien toimivuus sekä entsyymikonjugaattien ja vasta-aineiden toimivuus. Kaikki komponentit testataan ensin kukin erikseen, minkä jälkeen koko kokonaisuus testataan yhdessä. Kun uusi reagenssi tai standardi otetaan käyttöön, se testataan ensin vanhaa vasten ja määritetään viiteväli, jonka alueella tulokset saavat liikkua. Näytteinä käytetään tunnettuja potilasnäytteitä ja koko testiä testataan useampaan otteeseen. (Kumpulainen 2011.)

3.6.2 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)

DNA:ta analysoidaan yleensä agaroosigeelielektroforeesilla (AGE). Tämä elektroforeesimenetelmä on hyvä 0,1–50 kb:n kokoisille DNA-palasille. Erotusgeelinä käytetään agaroosia, joka on merilevästä eristetty polysakkaridi. Tämä liukenee veteen kuumennettaessa ja jäähtyessään muuttuu hyytelömäiseksi geeliksi. Valettu agaroosigeeli laitetaan ajolaitteeseen, jossa on

ajopuskurina samaa puskuria, jota on käytetty geelin valmistukseen. Näytteet ja kaupallinen molekyylikokontrolli pipetoidaan geeliin tehtyihin kaivoihin ja geelin lävitse johdetaan sähköä. Happamat ja negatiivisesti varautuneet nukleiinihapot kulkevat positiivista napaa eli anodia kohden. Agarosigeelin verkkorakenne hidastaa isompia DNA-palojen kulkua, jolloin pienemmät eli lyhyemmät DNA-palaset kulkevat nopeammin anodia kohden. Ajon aikana pilkotut DNA:n palaset eriytyvät omiksi vyöhykkeisiin. Kun markerin molekyylikoot tunnetaan, näytteiden DNA palasten molekyylikoot kiloemäksinä (kb) voidaan selvittää vertaamalla niitä kaupalliseen markkeriin. (Suominen - Ollikka 2004, 72.)

Geeliä tarkastellaan sinivalopöydällä tai UV-valolla, jolloin saadaan DNA-palat näkyviin. Koska DNA ei itsessään näy agarosigeelissä, on geeliin lisättävä valuvaiheessa esimerkiksi etidiumbromidia tai muuta kaupallista väriainetta. Etidiumbromidi tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin ja saa DNA-palakompleksin absorboimaan UV-säteitä, jolloin saatu energia siirtyy etidiumille, joka fluoresoi ne oranssinpunaisena näkyviin ihmissilmälle. Etidiumbromidia käsiteltäessä on muistettava pitää hanskoja, sillä se on karsinogeeninen. Nykyisin on saatavilla myös väriaineita, jotka eivät sisällä etidiumbromidia, kuten esimerkiksi SybrSafe (Invitrogen). Tällöin geelissä olevien DNA palasten tarkasteluun voidaan käyttää sinivalopöytää, joka on UV-valoa paljon turvallisempi. (Suominen - Ollikka 2004, 73.)

4 VASTA-AINEEN TUOTANTOPROSESSI

Tuotantoprosessi koostuu esiselvitys-, suunnittelu-, valmistelu-, tuotanto- ja loppuraportointivaiheista. Joka tuotantovaiheessa laatua tarkkaillaan. Laboratoriopäällikkö joko hyväksyy tai hylkää tuloksen ja perustelee päätöksensä. Ennen tuotantoprosessin käynnistämistä esiselvitysvaiheessa on laadittu tuotannon prosessisuunnitelma. Tällöin on selvitetty tuotteen kysyntä ja tarve sekä onko vastaavia tuotteita jo markkinoilla eli on tehty markkinatutkimus. Jokaisella tuotantoprosessilla on oma tuotantotiimi, joka on toimittanut suunnitelman johdon hyväksyttäväksi.

Valmisteluvaiheessa järjestetään tuotannossa tarvittavat tilat, laitteet ja tarvikkeet, kuten reagenssit ja erikoistyövälineet. Valmisteluvaiheessa on myös selvitetty työntekijöiden osaaminen ja jaettu vastuut eri työvaiheista sekä tehty alustava aikataulutus eli projektisuunnitelma. Seuraavissa kappaleissa kuvataan esimerkkinä joitakin prosessin tuotantovaiheita vasta-aineen tuotannossa virtuaalilaboratoriossa, sen jälkeen kun tuotantotiimin suunnitelma on oletettu hyväksytyksi. (Aittomäki ym. 2002, 332-333.)

4.1 Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto nisäkässoluissa

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan nisäkässoluviljelmissä niin sanotuisissa hybridomasoluissa, jotka on valmistettu laboratoriossa immunisoidun hiiren pernan soluista ja hiiren pernasyöpäsoluista. 1B10-vasta-aine on spesifinen antigeenille NTproBNP76:lle, eli se pystyy tarttumaan spesifisesti tämän 1B10-proteiinin rakenteisiin. Kohdehiiri immunisoidaan rokottamalla sitä halutulla antigeenillä. Kun hiiri alkaa tuottaa vasta-ainetta, sille annetaan antigeenitehoste useita kertoja tietyn väliajoin. Aina rokotteiden välillä hiirestä otetaan verinäytteitä noin viikon - 10 päivän kuluttua rokotteen annosta, jotta vasta-aineen muodostumista voidaan tarkkailla ja hiiren kuntoa seurata. Immunisointivaiheessa eläintenhoitajat tarkkailevat hiirten kuntoa päivittäin punnitsemalla hiirien painoa ja seuraamalla aktiivisuutta ja syömistä. Jokai-

nen punnitustulos sekä havainnot kirjataan ylös ja dokumentoidaan niille tarkoitettuihin kansioihin. Näin voidaan varmistaa laadukas työskentely sekä välttää turha hiiren rasitus. (Harlow – Lane 1988, 150.)

Immunosoinnin päättyessä lopetetulta hiireltä poistetaan perna, joka hajotetaan kudiskasvatusmediumiin. Vasta-ainetta tuottavat pernan B-solut ja myeloomasolut fuusioidaan PEG-liuoksen avulla, jolloin niistä muodostuu hybridoomasoluja. Myeloomasolut ovat syöpäsoluja, jotka voivat oikein hoidettuna ”elää” ikuisesti. Sopivat solut tilataan tarkoin valitusta ja tunnetusta solupalveluyrityksestä, esimerkiksi ATCC (American Type Cell Collection). Vain fuusioituneet hybridoomasolut voivat selviytyä kasvatusliuoksessa, jossa pelkät B-solut kuolevat. Kun kasvatusmediumiksi vaihdetaan esimerkiksi HAT-kasvatusliuosta myös pelkät myeloomasolut, kuolevat pois, sillä hybridoomasolut saavat B-soluita selviytymiseen tarvittavia entsyymejä. Tämän jälkeen hybridoomasolut, jotka ovat toistensa klooneja, erotellaan omiin kaivoihin kasvamaan, yksi solu kuhunkin. Muutaman viikon päästä kasvustot seulotaan halutun monoklonaalisen vasta-aineen suhteen. Haluttua monoklonaalista vasta-ainetta tuottavia hybridoomasoluja ruvetaan kasvattamaan isommassa mittakaavassa. Laadunvarmistamiseksi soluja kasvatetaan jatkuvasti antibioottien läsnä ollessa. Solujen hyvinvointia seurataan mikroskoipoimalla soluja päivittäin sekä testaamalla viljelymediumista mykoplasma, joka on soluviljelyn yleinen kontaminantti. Liitteenä 1 on ohjemallina hybridoomasolujen kasvatus, jonka avulla tämä tuotantoprosessin työsio voidaan suorittaa. (Producing Monoclonal Antibodies 2002.)

4.2 Vasta-aineen tuotto bakteerissa

Vasta-aineen tuotanto voidaan yleensä siirtää bakteerisoluihin, koska se on halvempi ja tehokkaampi tapa kuin vasta-aineen tuottaminen nisäkässoluissa. Nisäkässoluista eristetään DNA, jonka tarvittavat geenit monistetaan ja siirretään plasmidivektoriin sekvenssin tarkistusta varten. 1B10-vasta-aineen geenit liitetään proteiinintuottovektoriin, joka siirretään proteiinintuottobakteereihin.

4.2.1 Geeninsiirto bakteerisoluihin ja kloonien valinta

DNA:n siirtämistä kompetentteihin bakteerisoluihin kutsutaan transformaatioksi. Kemiallisesti kompetentit eli vastaanottavaiset solut on käsitelty kalsiumkloridilla, jolloin solut muuttuvat hetkellisesti vastaanottavemmiksi siirtämään DNA-vektorin sisäänsä. Tämä työosio on tehty liitteen 2 ohjeen mukaisesti. (Transformaatio 2006.)

Eristetty plasmidi, joka sisältää 1B10-vasta-aineen tuottogeenin, transformoidaan kompetentteihin RV308-bakteerisoluihin. Nämä solut on kehitetty nimenomaan proteiinintuottoa varten. Ne ovat *Escherichia coli* K12-tyyppisiä soluja, joka on luokiteltu turvalliseksi laboratorioskannaksi. Transformaatioon tulee muistaa käsitellä soluja hellästi ja pitää ne aina jäissä, jotta solut eivät pääsisi tuhoutumaan. Transformaatio tehdään pKK 1B10 Fab 2-1 ja 7-1 klooneille. Negatiivisena kontrollina transformoidaan steriiliä vettä, ja rinnakkaismaljauksessa nähdään, etteivät RV308-soluputket ole kontaminoituneet. RV308-soluja säilytetään syväjäädetyssä pakkasessa -80 C:ssa. Pakastimesta haettaessa varastoidut soluputket nostetaan heti jääastiaan. Syväpakastimen ovia auotaan vain tarpeellinen lyhyt aika, joten näytteiden haku tulee suunnitella valmiiksi: työntekijän tulee tietää, missä lokeroissa tarvittavat soluputket sijaitsevat, jolloin vältetään turhalta pakastimen ovien aukomiselta ja syväpakastimen lämmön nousulta.

Jokaista vasta-ainekloonin plasmidia siirretään omiin kompetenttien solujen putkiin. Transformaation tärkein vaihe on lämpöshokin antaminen. Jotta siitä tulisi mahdollisimman tehokas, kuitenkin soluja tai DNA:ta tuhoamatta, näyteputkia inkuboidaan jäissä ensin 15 minuutin ajan, minkä jälkeen putket siirretään 42 °C:seen 1,5 minuutiksi. Tämän jälkeen putket siirretään jälleen nopeasti kahdeksi minuutiksi jäihin. Lämpöshokki saa RV308-solut laajenemaan, jolloin plasmidi-DNA voi siirtyä solukalvon läpi solun sisälle. Soluputkien siirto jäihin saa solut sulkeutumaan, jolloin plasmidi-DNA jää solujen sisälle.

Jotta kloonit rupeaisivat tehokkaasti kasvamaan, soluputkiin lisätään lämmintä kasvatuslientä. Kasvatusliemi sisältää kaikki bakteerin kasvun vaati- mat ravintoaineet. Kasvatusliemi tehdään itse laadukkaista reagensseista, jotka on tilattu tunnetuilta toimittajilta. Soluja kasvatetaan 37 °C:ssa ravisteli- jassa puoli tuntia. Tämän jälkeen pieni määrä transformaatiokasvustoja siir- retään ja levitetään tasaisesti maljoille, jotka sisältävät kasvuun tarvittavia ravintoaineita, sokeria ja antibioottia, carbenisilliiniä. Negatiivisella kontrolli- maljalla ei pitäisi kasvaa mitään, sillä RV308-bakteerisolulla ei ole antibioot- tivastustuskykyä. Koska vasta-ainekloonien plasmidiDNA:t sisältävät 1B10- vasta-ainetuotto geenin lisäksi myös antibioottiresistenssigeenin carbenisil- liiniä vastaan, ne voivat kasvaa antibioottia sisältävillä maljoilla. Antibiootti- kasvatuksella varmistetaan myös laatu, sillä kontaminaatiot eivät myöskään pysty kasvamaan alustoilla.

Transformaation onnistumista selvitetään tarkastamalla klooneja, joiden täy- tyy olla yhdenmukaisia alkuperäisen vasta-ainegeenin kanssa. 1B10-vasta- aineen tuottogeenin omaavia soluklooneja kasvatetaan maljoilla, joista poi- mittuja yksittäisiä klooneja tarkastellaan. Yksi pesäke on aina yksi kloo- ni. Klooneista eristetään DNA, joka pilkotaan ja palat erotellaan aga- roosigeelillä. Geeliltä eristetään pilkotut DNA:t, joiden sekvenssi selvitetään. Kun alkuperäisen sekvenssi tiedetään, voidaan sitä verrata klooneihin ja tar- kastaa, ovatko kloonit säilyneet virheettöminä. Kloonien tarkastus ja niille tehdyt testidigestiot suoritetaan liitteen 3 mukaisesti. Kloonien DNA:t eristet- tiin kaupallisella Macherey Nagelin Miniprep NucleoSpin® Plasmid Kitin avulla, jonka ohje on liitteenä 4.

4.2.2 1B10-kloonien kasvatus

Yön yli kasvaneilta maljoilta valitaan klooneja, joita kasvatetaan DNA- eristystä ja analysointia varten. Jokaista kloonia tarkastellaan omina näyttei- nä. Maljoilta voidaan itse valita edustavimmat pesäkkeet. Maljalta on viisain- ta valita hieman erillään olevat pesäkkeet, jolloin kloonit ovat helppo poimia maljalta eivätkä ne sekoitu toisiinsa. Jokainen klooni siirretään omalla sterii-

lillä silmukalla 5-10 ml:aan kasvatusliuosta. DNA-emäsjärjestyksen selvittämiseen valitaan selkeimmät kloonikannat. pKK 1B10-jatkoklooneja (2-1 ja 7-1) tutkitaan kolmen uuden rinnakkaiskloonin perusteella. Rinnakkaiskloonikantojen tunnistamiseksi ne merkitään uusilla tunnuksilla pKK 1B10 2-1-1, 2-1-2, 2-1-3 ja pKK 1B10 7-1-1, 7-1-2 ja 7-1-3. Kloonikantoja kasvatetaan yön yli ravistajassa 37 °C:ssa, kuitenkin ylittämättä 17 tunnin kasvatusaikaa, jolloin kasvusto on jo stationäärivaiheessa ja solut alkaa kuolla ja hajota. Kloonien kasvustoista DNA eristetään kaupallisella DNA miniprep DNA Kitin avulla. (Aittomäki ym. 2002, 28.)

Yön yli kasvaneista klooneista tehdään varastokanta, niin sanotut glyserolistokit syväpakastimeen (-80 °C). Klooniputket merkitään sisällön ja päivämäärän mukaan. Steriiliä 50% (v/v) glyserolia ja kloonikantojen solukasvustoa sekoitetaan suhteessa 1:1 eli kumpaakin saman verran. Käytetty glyseroli estää solujen sisältämän veden jäätyvän ja jääkiteiden muodostumisen. Jäätyessään solujen sisältämä vesi jäätyisi kiteiksi, jotka rikkovat soluja. Glyseroli liukenee veteen ja lämpötilan laskiessa se estää jääkiteiden muodostumista estämällä vetysidosten syntyä. Jotta glyseroli sekoittuu tasaisesti solukasvustoon, täytyy sitä parin tunnin ajan seisottaa huoneenlämmössä, välillä hyvin sekoittaen vorteksilla. Varastosolut jäädytetään upottamalla ne ensin nestetyyppeen ja siirtämällä jäätyneet putket välittömästi syväpakastimeen. (Wikipedia 2011.)

4.2.3 DNA:n eristys 1B10-klooneista

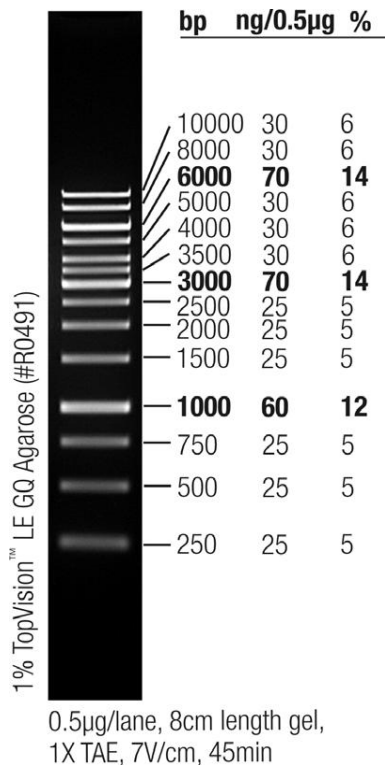
DNA eristetään kaupallisella reagenssipakkauksella, esimerkiksi Macherey-Nagelin NucleoSpin® Plasmid-kitillä valmistajan ohjeen mukaan (liite 4). Kloonikantojen loppukasvusto kerätään sentrifugoimalla solupelletiksi, minkä jälkeen pelletti lietetään pakkauksen puskuriin ja jatkokäsitellään valmistajan ohjeen mukaisesti. Eristetystä DNA:sta mitataan Nanodropilla DNA-pitoisuudet.

4.2.4 Testidigestio

pKK 1B10-kloonien DNA:sta tehdään testidigestio, jossa syntyvät tuotteet analysoidaan agarosigeelissä. Digestiossa DNA katkaistaan entsyymien avulla. Katkaisussa hyödynnetään bakteerien ominaisia restriktioentsyymejä, jotka tunnistavat DNA:n emäsjärjestyksen spesifisiä jaksoja. Entsyymien lisäksi tarvitaan entsyymeille sopivaa puskuria. pKK 1B10-kloonien DNA pilkotaan *NheI**HF ja *NotI**HF entsyymeillä, joihin käytetään entsyymien kanssa yhteensopivaa puskuria ja hieman naudan seerumin albumiinia (BSA:ta). Reaktioon lisätään hieman ylimäärin restriktioentsyymejä, jolloin varmistetaan, että kaikki DNA:n tunnistuskohdat katkeavat täydellisesti. Laatuksena voidaan käyttää kontrolliplasmidia, jonka tiedetään pilkkoutuvan käytettävillä entsyymeillä tietynkokoisiksi. Testidigestion kokonaistilavuus tulee olla 20 µl, joka sisältää reagenssien vakio-tilavuudet ja näytilavuuden. Digestiossa halutaan näytepitoisuuden olevan noin 0.5–1 µg. Näytteistä pipetoidaan tarvittava pitoisuus mikrosentrifugiputkiin ja lopputilavuus täytetään steriilillä vedellä. Koska pipetoitavat määrät ovat hyvin pieniä ja pipetointivirheet kasvavat yksittäisen pipetoitaessa pieniä tilavuuksia, on helpointa pipetoida seos, jossa on tarpeeksi tarvittavia reagensseja (paitsi näyte ja vesi) jokaista näytettä kohden. Tällöin pipetointikerrat vähenevät ja pipetointitilavuudet kasvavat vähentäen virheitä. Reaktiot tapahtuvat 37 °C:ssa ja ne lopetetaan pipetoimalla näyteputkiin lopetusreagenssia, XC-väriä. Tähän reagenssiin on lisätty jo valmiiksi väriaine agarosigeelijaon varten, mikä tekee näytteistä raskaampia ja helpottaa pipetointia (silloin se asettuu tasaisesti kaivon pohjalle). Väriaineen ansiosta ajon edistymistä on myös helpompi seurata. (Suominen – Ollikka 2004, 68, 73.)

Pilkotut DNA:t ajetaan agarosigeelille, jonka molekyylikokojen kontrollina eli markkerina käytetään kaupallista 1 kb DNA-ladderia (Fermentas), jonka sisältämien molekyylien koko kiloemäksinä (kb) tunnetaan. Markkeri on hyväksi ja luotettavaksi havaittu. Kuvassa 5 on käytetyn markkerin molekyylikoot. Näytteet, kontrolliplasmidi ja markkeri kannattaa pipetoida geelin kaivoihin niin, että markkeri tulisi keskimmäiseen kaivoon. Tällöin molekyyli-

kokojen vertaileminen on helpompaa. Geeliä ajetaan ajopuskurissa 30 minuutin ajan 80 voltin jännitteellä. Tämän jälkeen geeliä voidaan tarkastella sinivalopöydällä. DNA-vyöhykkeet näkyvät oranssipunaisina. Niitä vertailemalla tunnettuun markkeriin saadaan vyöhykkeiden eli DNA:n palasten molekyylikoot selville.



KUVA 5. Agarosigeelillä käytetyn markkerin 1kb DNA-ladderin molekyylikoot. (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific 2006)

4.2.5 Sekvensointi

Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA:n nukleotidien emäsjärjestystä eli sekvenssin selvittämistä kokeellisesti. pKK 1B10-vasta-aineen kloonien sekvensointireaktio tehdään PCR-laitteessa. Erityiseen PCR-putkeen sekoitetaan reaktioon tarvittavat komponentit: näyte-DNA, puskuri, DNA-polymeraasientsyymiä ja rakennuspalikoiksi deoksinukleotideja dA, dC, dG ja dT. Näiden lisäksi putkeen lisätään erivärisillä fluoresoivilla leimoilla merkattuja niin sanottuja terminaali-dideoksinukleotideja ddA, ddC, ddG ja ddT, joiden sitoutumisen jälkeen monistettavaa DNA-tuotetta ei voi enää jatkaa.

Sekvensointi voi olla maksullinen palvelu, jonka ulkopuolinen tekee. Käytävien sekvensointireaktioiden mukana on aina joitain kontrollireaktioita, jolla voidaan varmistaa sekvensoinnin laatu. Jos kontrollireaktio onnistuu, mutta asiakkaan näytteen reaktio ei, voidaan todeta, että menetelmä toimii, mutta asiakkaan näytteissä on jotain vikaa.

Sekvensointireaktio on kuin PCR-monistusreaktio, jossa käytetään yhtä aluetta kahden sijasta. Reaktio alkaa, kun PCR-koneen lämpötilaohjelma aloittaa kuumennusvaiheen nostamalla lämpötilan 95 °C:seen. Tällöin tapahtuu denaturointi, jolloin näytteen DNA:n juoste avautuu. Tämän jälkeen lämpötila laskee ja juosteen puolikkaaseen pariutuu sekvensointialuke. Ohjelma nostaa jälleen lämpötilaa polymeraasin optimilämmöksi (+72 °C), jolloin polymeraasi alkaa lisätä nukleotideja malliin sekvenssin mukaan, kunnes nukleotidin paikalle sitoutuu leimattu dideoksinukleotidi. Reaktiossa syntyy useampi yksijuosteinen monistustuote, jotka kaikki erotellaan kokonsa perusteella kapillaarielektroforeesilla ja erikokoiset molekyylit tunnistetaan leiman fluoresenssin perusteella ja laitetaan koon mukaiseen järjestykseen, joista muodostuu sekvenssi. (Veijola 2011.)

4.2.6 Vasta-aineen testituotto

Testituotto on samanlaista kuin varsinainen vasta-aineen tuottokin, mutta vain pienemmässä mittakaavassa. Laadunvalvonta ei poikkea testituotossa mitenkään varsinaisesta tuotosta. Reagenssien täytyy olla laadultaan ”pro analysis” tai vastaavaa tasoa ja käyttöpäivää jäljellä. Testituoton tulokset hyväksyy laboratoriopäällikkö.

pKK 1B10-kloonien 2 ja 7 jatkokloonit (esim. 2-1-4, 2-1-5, 2-1-6 ja 7-1-4, 7-1-5, 7-1-6) siirrostetaan 10 ml:aan kasvatusliuosta, joka sisältää ravintoaineita, sokeria ja antibioottia. Lisäksi kontrolliksi siirrostetaan Fab 32-1-1 varastokantaa, jonka ominaisuudet tunnetaan. Kasvustoja kasvatetaan yön yli 37 °C:ssa. Seuraavana päivän pienestä määrästä uusien jatkokloonien kasvustoja tehdään glyserolistokit ja loppukasvustosta siirretään 0,5 ml:aa 30 ml:aan glukoosia ja antibioottia sisältävään kasvatusliokseen 250 ml:n er-

lenmeyerastiassa. Näitä nuorennuskasvustoja kasvatetaan 37 °C:ssa kunnes OD600 on 0,8–1 välillä. Kasvuston solut kerätään pelletiksi huoneenlämpöisessä sentrifugissa 5 minuutin ajan 3000 rpm:ssä. Medium kaadetaan pois ja tilalle laitetaan 15 ml kasvatusliuosta, josta puuttuu glukoosi. Solut suspensoidaan hellästi liemeen kääntelemällä putkia ja kaadetaan sen jälkeen 100 ml:n erlenmeyeriin, johon lisätään loppupitoisuuteen 50 µM IPTG:tä indusoimaan proteiinin tuottoa. Kloonikasvustoja kasvatetaan 30 °C:ssa yön yli. Aamulla kloonikasvustoista otetaan kolme 2 ml:n näytettä steriileihin eppendorf-putkiin. Putket sentrifugoidaan 5 minuutin ajan 13 000 rpm:ssä (rotations per minute) ja mediumit kaadetaan omiin steriileihin putkiin, joihin merkataan M+, kloonin nimi ja pvm. Putkiin, joihin solunapit jäivät, merkataan S+, kloonin nimi ja pvm. M+ tarkoittaa mediumia IPTG-indusoinnin jälkeen ja S+ tarkoittaa soluja IPTG-indusoinnin jälkeen. Näyteputkia voi säilyttää tavallisessa – 20 °C pakastimessa.

4.2.7 Tuotteen tarkistus

Palveluita tuottavan laboratorion tuotteille tulee tehdä analyttisiä testejä tuotteen toimivuuden ja laadun varmistamiseksi. Tuotetulle vasta-aineelle tehdään Elisa-testejä ja western blot-analyysejä, joilla selvitetään, onko aiemmissa tuotantovaiheissa onnistuttu tuottamaan oikeaa vasta-ainetta.

4.2.8 ELISA-testit

Testituottojen tutkimiseen käytetään ELISA-kuoppalevyjä, jonka kaivoihin on kiinnitetty 50 ng X76-proteiinia tai TRX-proteiinia 0.1 M bikarbonaattipuskuriin laimennettuna. Pinnoitus eli kouttaus suoritetaan liitteen 5 mukaisesti. Koutatut levyt pestään 1xPBST-puskurilla ja blokataan blokkauspuskurilla, joka sisältää 0,2 prosenttia gelatiinia sekä 1 prosenttia BSA:ta 1xPBST-puskurissa.

ELISA-testin tarkoituksena on selvittää, onko testituottojen mediuimeihin tuottunut vasta-ainetta. Näytteinä ovat pKK 1B10:n 2 ja 7 kloonien testituotot

ja sekä negatiivisenä kontrollina M- 33 että positiivisena kontrollina Fab 32-1-1. M- 33 näyte on otettu vasta-ainetuotannossa ennen indusointia, joten siellä ei pitäisi olla X76-proteiiniin tarttuvaa molekyyliä, jolloin tuloksesta tulee negatiivinen. Fab 32-1-1 on testattu vasta-ainekanta ja sen tiedetään toimivan, jolloin sitä voidaan käyttää menetelmän positiivisena kontrollina. Koska voidaan olettaa näytteiden sisältävän jonkin verran vasta-ainetta, ne laimennetaan 1:10 ja 1:100 herkkää ELISA-testiä varten. Koska pipetoitavia näytteitä on monta, on aluksi syytä tehdä esimerkiksi Excelillä pipetointitaulukko, joka helpottaa työskentelyä. Näytteiden pipetointitaulukko voi olla vaikka taulukon 1 mukainen.

TAULUKKO 1. Medium-näytteiden pipetointitaulukko

	1	2	3	4	5	6	7	8	Näytteet
A	X76		TRX		X76		TRX		M-kontrolli
B									Fab 32-1-1
C									2-1-4
D									2-1-5
E									2-1-6
F									7-1-4
G									7-1-5
H									7-1-6
	1:10				1:1000				

Näytteiden pipetoinnin jälkeen levyä sekoitetaan yksi tunti huoneenlämmössä tasoravistajalla. Tämän jälkeen levy pestään kolme kertaa 1xPBST-puskurilla, minkä jälkeen kaivoihin lisätään 1:3000 laimennettua kakkosvasta-ainetta, antiMouseFabAFOS, 100 µl joka kaivoihin. Tätä sekoitetaan huo-

neenlämmössä tasoravistelijalla 45 minuutin ajan. Jälleen kaivot pestään 1xPBST:llä, minkä jälkeen kaivoihin lisätään 100 µl PNPP-substraattia. Levy suojataan valolta ja sekoitetaan tasoravistelijalla 30 minuutin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen värireaktio mitataan heti aallonpituudella 405 nm. Jos värireaktio syntyy eli mittaustulokset ovat suurempia kuin negatiivinen kontrolli, voidaan todeta, että 1B10-vasta-ainetta on tuottunut mediuimeihin ja kyseiset kloonit ovat onnistuneita. Parhaat tulokset eli suurimman luke-
man antavat näytteet voidaan ottaa jatkotutkimuksiin eli tehdä niistä varsi-
naisen tuoton.

4.2.9 Vasta-aineen Wester blot -analyysi

Vasta-aine tuotannon tarkistukseen sisältyy myös western blot -analyysi. Menetelmä perustuu siihen, että ensin vasta-ainemolekyylit erotetaan toisistaan molekyylipainonsa mukaan natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelillä (SDS-PAGE). Vasta-ainenäyte valmistellaan keittämällä se merkaptotanoliala ja natriumdodekyylisulfaattia (SDS) sisältävän näytekupurin kanssa, jotta rikkisillat pelkistyisivät ja SDS denaturoisi proteiiniin. SDS-PAGE:n ajogeeli on kaksiosainen, jossa on konsentroiva ja erotteleva geeniosat. Näytekupurin ansiosta vasta-ainemolekyylit ovat saaneet negatiivisen varauksen ja kulkevat geelissä positiivista napaa kohden sähkövirran avulla. Näin pienimmät osat kulkeutuvat nopeammin ja suurimmat hitaammin. Tämän jälkeen vasta-aineet siirretään elektroforeettisesti PVDF-membraanille, josta ne tunnistetaan käyttämällä niiden spesifisiä entsyymi-leimattuja kakkosvasta-aineita. Membraani käsitellään maitojauheesta tehdyllä blokkauksiliuoksella, jolloin vasta-aineen epäspesifiset sitoutumiskohdat peittyvät maitoproteiiniin. Kakkosvasta-aine, anti-mouse Fab-HRP on leimattu entsyymaattisella-leimalla, piparjuuren peroksidaasilla (HRP). Se reagoi substraattiliuoksen kanssa tuottaen valosignaalin (kemiluminesenssi), jolloin membraanikalvolta voidaan kuvantamislaitteen avulla havaita vasta-aineen sijainti ja suhteellinen määrä. (Kukkonen 2010, 14.)

4.3 Varsinainen vasta-aineen tuotto

1B10-vasta-aine tuottuu bakteerisolujen ulkopuolelle mediumiin, mutta on tärkeää ottaa tarkistusnäytteet myös solupelleteistä. Mediumista HIS-puhdistusosan sisältävä vasta-aine puhdistetaan metalli-affiniteettipylväällä. Varsinaisessa tuotossa bakteerikloonien avulla tuotetaan enemmän vasta-ainetta kuin testituotossa. Kun testituotossa on optimoitu tuottotapa, on varsinainen tuotto käytännössä samanlainen, mutta vain isommassa mittakavassa. Koska tuottoon tarvitaan suuria määriä reagensseja, on järkevää tuottaa vain parista parhaimmasta kloonista vasta-ainetta. Testituoton testauksissa on todettu pKK 1B10-kloonien 2-1-4 ja 7-1-6 tuottavan parhaiten vasta-ainetta. Näistä tehdään kasvatusymppe, jossa 20 ml SB-MOPS-carbenisilliin-glukoosi-kasvatusliuosta, johon siirrostetaan silmukallinen kloonien glyserolistokeista. Klooneja kasvatetaan yön yli 30 °C:ssa 220 rpm:ssä.

Nuorennuskasvatus tehdään yön yli kasvaneesta kasvustosta. 800 ml:aan SB-MOPS:ia lisätään 10 ml 40-prosenttista glukoosia ja 800 µl carbenisilliiniä. Tähän kasvatusliemeen lisätään yön yli kasvaneesta ympistä 10 ml kasvustoa. Tätä kasvatetaan 37 °C:ssa 230 rpm:ssä, kunnes OD600 on 0,8–1. Lopuista kasvustoista otetaan miinusmerkkiset medium (M)- ja solu (S)-näytteet. Miinusmerkki M:n ja S:n perässä tarkoittaa ennen indusointia. Näytteiden teko tapahtuu niin, että kasvustoa otetaan 1 ml steriiliin eppendorf-putkeen, joka sentrifugataan 5 minuutin ajan 13 000 rpm:ssä. Mediumliuos siirretään omaan eppendorf-putkeen, johon merkitään sisältö, tekijän nimikirjaimet ja päivämäärä. Esimerkiksi pKK 1B10 2-1-5 M- 30.9.11 UL. Soluputkiiin merkitään samanlaiset merkinnät. Putkia säilytetään -20C pakkasessa.

Klooneja kasvatetaan 800 ml mediuimerissä, niin kauan kunnes OD600 on lähellä 0,8. Tähän kuluu aikaa noin 3–4 tuntia. Tämän jälkeen kasvustot sentrifugoidaan 5 minuutin ajan 13 000 rpm:ssä huoneenlämmössä. Huoneenlämpö on tärkeä, että solut pysyvät aktiivisen kasvun vaiheessa. Kloonien solupelletit suspensoidaan 400 ml:aan SB-MOPS-kasvatuliuokseen, joka sisältää carbenisilliin antibioottia. Tässä on huomioitava, ettei enää kasvatusliuokseen laiteta sokeria. Klooneja kasvatetaan 15 minuutin ajan 37

C:ssa, jotta ne ehtivät tottua uuteen kasvatusliuokseen, koska niitä on konzentroitua edellisessä vaiheessa. Jotta solut tuottaisivat 1B10-vasta-ainetta mediumiin, pitää ne indusoida loppupitoisuudessa 50 μ M IPTG:llä. Indusoinnissa IPTG saa aikaan sen, että vasta-ainetta tuottava geeni aktivoituu tuottamaan 1B10. Kloonien annetaan kasvaa eli tuottaa mediumiin 1B10-vasta-ainetta 17 tunnin ajan huoneenlämpöisessä ravistajassa 220 rpm:ssä.

Seuraavana päivänä voidaan kloonien kasvustoille suorittaa tuotonkeräys. Ennen sentrifugointia tulee kuitenkin ottaa klooneista näytteet M+ ja S+. Lopuista 400 ml:n kasvustoista sentrifugoitiin medium talteen. Se siirretään säilytyspulloon ja se voidaan varastoida pakkaseen odottamaan puhdistusta. Otetut medium- ja solunäytteet tarvitaan ELISA-testejä varten.

5 JÄLKIKÄSITTELYVAIHEET

Ihmisessä vasta-aineita tuottuu solujen sisältä verenkiertoon, josta ne leviävät ympäri kehoa. Bakteerissa tuotetut vasta-aineet tuottuvat kasvatusmediumiin. Koska vasta-ainetta on pieniä pitoisuuksia tuottomediumissa, sitä yleensä konsentroidaan joko mekaanisesti tai erityisen konsentrintilaitteen avulla. Tällöin tuotteen puhdistaminen on helpompaa. Joissain tapauksissa myös mediumin happamuutta eli pH:ta joudutaan säätämään jälkikäsittelevaiheessa. Jälkikäsitteilyssä mediumista rikastetaan ja puhdistetaan haluttu tuote eli vasta-aine. Jälkikäsitteilyyn kuuluu myös puhdistetun tuotteen formulointi ja varastointi.

5.1 Vasta-aineen affiniteettipuhdistus

Affiniteettipuhdistus tehdään affiniteettikromatografiapylväällä. Tämä puhdistusmenetelmä perustuu vasta-ainemolekyylin spesifiseen tunnistukseen tai Fab-vasta-ainemolekyylin sisältämän histidiini-aminohappohännän sitoutumiseen hartsipylvääseen kiinnitettyyn ligandiin: antigeeniin tai kaksiarvoisen nikkeli- tai kobolttikelaattiin. Jokaiselle eri vasta-ainekloonille käytetään omaa hartsipylvästä, mutta hartsin ei ole pakko olla joka kerta uusi, kunhan se on hyvin puhdistettu ajojen jälkeen. Eri vasta-aineiden hartsipylväitä ei saa mennä sekoittamaan kontaminaatiovaaran takia. Affiniteettihartsina käytetään vain puhdasta hartsia. Jos käytetään vanhaa hartsia, työntekijä pesee varmuuden vuoksi itse hartsin ennen työn aloittamista ja myös tutkii, onko siihen jäänyt mitään jäänteitä edelliseltä puhdistuskerralta.

Affiniteettikromatografiassa vasta-aine puhdistetaan sitomalla se ligandiin, antigeeniin tai metallikelaattiin. Ensin ligandi kiinnitetään kiinteään kantaja-aineeseen niin sanottuun hartsiin, joka sitten pakataan pylvääseen. Kun puhdistettavan vasta-aineen raakaseos siirretään pylvääseen, tapahtuu spesifinen sitoutuminen ligandin ja vasta-aineen välillä. Epäpuhtaudet huuhtoutuvat pesupuskurin avulla pois. Vasta-aine saadaan irrotettua pylväästä elu-

oinnin avulla. Eluutio perustuu happamuuteen, ioninvaihtuvuuteen tai puskurikoostumuksen muuttumiseen eli olosuhteet pylväässä muuttuvat epäedulliseksi spesifisen sitoutumisen kannalta. Affiniteetikromatografiassa käytetään vain reagensseja, jotka ovat vähintään ”pro analyse”-laatua. Puhdistus tehdään liitteen 6 ohjeen mukaisesti. (Aittomäki ym. 2002, 194.)

5.2 Tuotteen formulointi ja varastointi

Koska vasta-aineet ovat pienimolekyyllisiä, hyvin herkkiä tuotteita, niiden käsittely vaatii huolellisuutta. Se myös edellyttää tuoteformulointia. Tuote konsentroidaan eli pitoisuutta lisätään tai tilavuutta vähennetään, jotta se säilyisi paremmin. Tuotteen konsentroidointi voidaan suorittaa ultrasuodatuksella liitteen 7 mukaan. Sama ohje käy myös puskurin vaihtoon. Varastoitaessa tuotteeseen voidaan lisätä myös stabiloivia aineita, kuten glyserolia 10–30 massaprosentin verran. Muita stabilointiaineita ovat sokerialkoholit, kuten ksylitoli, ja suolat kuten natriumkloridi. (Aittomäki ym. 2002, 201.)

Säilytystä (-20 °C) varten tuote voidaan annostella esimerkiksi 10 µg:n, 100 µg:n ja 1 mg:n annoksina eppendorf-putkiin. Tarvittaessa voidaan lisätä glyserolia tai joskus BSA 0,1 % verran loppupitoisuuteen. Kylmähuoneessa säilytettäviin tuotteisiin voidaan myös lisätä natriumatsidia loppupitoisuuteen 0,02%. Natriumatsidi on voimakas hapettaja, joka estää bakteerien kasvun. Myös varastoinnissa käytettyjen reagenssien tulee olla proAnalyse-laatua, jotka on tilattu tunnetuilta ja tarkoin valituilta toimittajilta. Itse tehdyt liuokset valmistetaan hyviä laboratorio käytäntöjä noudattaen. Lopullinen tuote voidaan karakterisoida esimerkiksi määrittämällä sen pitoisuus Nanodropilla ja ELISA-testien avulla.

6 PUHTAAN VASTA-AINEEN LEIMAUS JA TESTAUS

1B10-vasta-aineet testataan ELISA-testien avulla. Antigeeninä testeissä käytetään X76-proteiinia, joka on rekombinantti ihmisen NTproBNP₁₋₇₆-proteiini fuusioituna histidiinihännän sisältävään tioredoksiiniin. Analyytti eli tuotettu vasta-aine on affiniteettipuhdistettu metalli-affiniteettikromatografialla (IMAC) Co²⁺-hartsilla ja tuotteen puskuri on vaihdettu 1xPBS puskuriin.

6.1 HRP-leimatun 1B10:n testaus

1B10-vasta-aine leimataan HRP:llä Peroxidase Labeling Kit-NH₂:n avulla (Dojindo). Leimaus tapahtuu valmistajan ohjeen mukaan (liite 8) Leimatulle vasta-aineelle tehdään ELISA-testi sen toimivuuden selvittämiseksi.

6.1.1 HRP-Leimaus

Testipakkauksen mukana tulleeseen pylväseppendorf-putkeen lisätään 100 µl Washing Bufferia ja 1B10-vasta-aine-näyteliuosta 200 ng. Putkea sentrifugoidaan 10 minuutin ajan 8000 g:ssä, minkä jälkeen pylväaseen lisätään 100 µl Washing Bufferia ja sentrifugoidaan uudelleen samoilla lukemilla. Reagenssia NH₂-Reactive Peroxidaseen lisätään 10 µl:aa Reaction bufferia. Nämä liuotetaan yhteen ja sentrifugoidaan pohjaan. Saatua liuosta lisätään kokonaisuudessaan näyteputkeen ja sekoitetaan. Putki laitetaan inkuboitumaan 37 °C:seen kahdeksi tunniksi. Tämän jälkeen putkeen lisätään 100 µl:aa Washing bufferia ja sentrifugoidaan samoilla lukemilla kuin aikaisemmin. Alaputken liuos poistetaan ja yläputkeen pipetoidaan kahdesti 100 µl Storage Bufferia pipetillä puskuttaen. Liuos pipetoidaan yläputkesta uuteen steriiliin eppendorf-putkeen. Tähän lisätään saman tilavuuden verran 99-prosenttista glyserolia. HRP-leimattu 1B10 säilytetään pakkasessa.

6.1.2 ELISA-testi HRP-leimatulle 1B10:lle

HRP-leimattua 1B10-vasta-ainetta testataan ELISA:lla. Tässä testissä käytetään 8-kaivon liuskoja eli niin sanottuja strippejä, joihin on kiinnitetty sarjana eri nanogrammapitoisuuksia X76-proteiinia. Stripeilla pitoisuudet ovat 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 ja 100 ng alhaalta ylöspäin luettuna. Stripeilla testataan leimatun 1B10-HRP:n leiman toimivuutta. Kontrollina käytetään testistä keväällä valmistettua 15HC-HRP-leimaa. Stripeille tehdään tavalliset pesut ja blokkaukset, minkä jälkeen leimoista tehdään 1:3000 laimennokset (0,7 µl leimaa + 2 ml blokkauksuspuskuria). Kaivoihin pipetoidaan sarakkeisiin 1-2 100 µl laimennettua 1B10-HRP:tä ja sarakkeisiin 3-4 laimennettua 15HC-HRP:tä. Stripit laitetaan inkuboitumaan huoneenlämpöön ravistajaan 1 - 2 tunniksi. Tämän jälkeen tehdään tavalliset pesut ja kaivoihin pipetoidaan 100 µl ABTS-sitruunahappo-30% H_2O_2 -liuosta. Stripit suojataan välittömästi valolta foliolla ja annetaan inkuboitua huoneenlämmössä tasoravistelijassa 30 minuutin ajan. Tulokset mitataan heti ajan päätyttyä aallonpituudella 405 nm. Taulukossa 2 on tulokset mittauksesta.

TAULUKKO 2. HRP-leimatun 1B10:n testimittauksen tulokset


(ng)	1	2	3	4
A (100)	2,192	2,197	0,060	0,060
B (50)	2,243	2,285	0,062	0,060
C (20)	0,609	0,602	0,047	0,050
D (10)	0,340	0,322	0,045	0,045
E (5)	0,151	0,157	0,044	0,050
F (2)	0,063	0,063	0,045	0,046
G (1)	0,039	0,051	0,048	0,045
H (0)	0,062	0,060	0,046	0,046

Nuolen osoittamat sarakkeet (1 ja 2) on leimattu 1B10-HRP:llä. Tuloksista voidaan huomata, että 1B10-HRP- leima toimii hyvin, mutta 15HC-HRP:n tulokset (3 ja 4) eivät poikkea toisistaan lainkaan. Tämä johtunee siitä, että 15HC-vasta-aine oli jo leimattu keväällä, joten se oli todennäköisesti ehtinyt jo hajota.

6.2 1B10-vasta-aineen ELISA-esitesti

1B10-vasta-aineen toimivuutta testataan kaksoisvasta-aineen kanssa. Testiin valitaan X76-proteiinilla koutattuja strippejä, joissa ylhäältä alaspäin pitoisuuksina on 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 ja 0 ng. Testissä käytetään kontrollina 15C4 vasta-ainetta. Stripeille tehdään liitteiden 9 ja 10 mukaiset pesut ja blokkaukset. Tämän jälkeen 100 µg:n pitoisesta 1B10-vasta-aineesta tehdään laimennos 1:100. 5,2 mg/ml pitoisesta 15C4 vasta-aineesta tehdään laimennos 1:5200. Laimennoksia pipetoidaan 100 µl kuoppiin niin, että kahdelle ensimmäiselle sarakkeeseen tulee 1B10:tä ja kahdelle seuraavalle 15C4:ta. Stripit laitetaan inkuboitumaan tasoravistelijaan huoneenlämpöön 1-2 tunnin ajaksi. Stripit pestään, minkä jälkeen kaikkiin kaivoihin pipetoidaan 100 µl 1:3000 antiMouseFab-HRP-kaksoisvasta-aine-leimaa. Inkubointi suoritetaan huoneenlämmössä 45 minuutin ajan ravistajassa. Tämän jälkeen stripeille tehdään jälleen pesut. Kaivoihin pipetoidaan 100 µl sitruunahappo-ABTS-H₂O₂-reagenssia ja suojataan valolta foliolla inkubointin ajaksi. 30 minuutin jälkeen suoritetaan mittaus aallonpituudella 405 nm. Tulokset näkyvät taulukossa 3.

TAULUKKO 3. 1B10-vasta-aineen ELISA-testin tulokset



(ng)	1	2	3	4
A (100)	2,157	2,185	2,357	2,382
B (50)	2,226	2,186	2,303	2,259
C (20)	0,807	0,814	0,468	0,473
D (10)	0,437	0,464	0,280	0,260
E (5)	0,238	0,247	0,137	0,135
F (2)	0,107	0,110	0,071	0,071
G (1)	0,076	0,077	0,053	0,054
H (0)	0,086	0,081	0,062	0,075

Nuolella merkityissä kohdissa (rivit 1 ja 2) on 1B10-vasta-aine laimennosta. Tulosten perusteella voidaan todeta, että 1B10-vasta-aine toimii ja se tunnistaa tarttumalla analyyttiproteiineihin.

6.3 Vasta-aineen 1B10:n herkkyystesti ELISA-testillä

Otetaan valmiiksi X76-proteiinilla koutattuja strippejä, joissa on eri pitoisuuksia X76-proteiinia. Nanogramma pitoisuudet testissä ovat 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0 ng:aa X76-proteiinia. Pikogrammapitoisuudet ovat 500, 250, 125, 75, 50, 25, 10 ja 5 pg:aa X76-proteiinia. Näytteinä käytetään pKK 1B10-kloonien 2-1-5 ja 7-1-6 medium + -näytteitä. Koutatut stripit pestään ja blokataan tavalliseen tapaan. Näytteet sentrifugoidaan viiden minuutin ajan 13 000 rpm:ssä, jonka jälkeen niistä tehdään laimennokset 1:1000 blokkauspuskuriin. Näytteitä pipetoidaan 100 µl stripeille niin, että jokaisesta on rinnakkaiset eri X76-proteiinin pitoisuuksilla. Stripit laitetaan inkuboitumaan huoneenlämpöön parin tunnin ajaksi tasoravistajaan. Tämän jälkeen stripeille suoritetaan jälleen normaalia runsaammat pesut, minkä jälkeen kaivoihin pi-

petoidaan 100 µl toisen vasta-aineen, antiMouseFabAFOS:ksen, 1:3000 laimennosta. Strippejä inkuboidaan jälleen 45 minuutin ajan huoneenlämmössä tasoravistajassa. Tämän jälkeen stripeille tehdään jälleen runsaat pesut, jonka jälkeen kaivoihin pipetoidaan 100 µl PNPP-substraattia. Ensimmäinen inkubointijakso suoritetaan valolta suojattuna 30 minuutin ajan, jonka jälkeen tulokset mitataan heti aallonpituudella 405 nm. Taulukossa 4 on puolen tunnin jälkeen tehdyt mittaustulokset. Rivit 1–4 on Fab kloonin 2-1–5 tulokset ja rivit 5-8 ovat Fab kloonin 7-1-6 tulokset. Harmaalla taustalla on koutattuna X76-proteiinin nanogrammapitoisuudet, niin että suurin pitoisuus on rivillä A ja pienin pitoisuus rivillä H. Valkoisella taustalla koutattuna on X76-proteiinia pikogrammapitoisuuksina.

TAULUKKO 4. 1B10:n herkkyystesti ELISA-testillä.



	Fab 2-1-5				Fab 7-1-6				neg.kont	
	ng		pg		ng		pg			
(ng)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	(pg)
A	0,55		0,08	0,08						(500)
(100)	2	0,590	0	3	2,326	2,137	0,079	0,078	0,094	
B	0,33		0,07	0,07						(250)
(50)	9	0,267	6	5	1,505	1,566	0,079	0,090	0,077	
C	0,09		0,07	0,08						(125)
(20)	1	0,089	7	2	0,116	0,109	0,082	0,080	0,089	
D	0,09		0,07	0,07						(75)
(10)	2	0,082	7	6	0,100	0,095	0,097	0,080	0,079	
E (5)	0,08		0,09	0,07						(50)
	8	0,097	1	6	0,086	0,082	0,080	0,086	0,085	
F (2)	0,09		0,08	0,08						(25)
	3	0,085	5	0	0,087	0,090	0,083	0,077	0,088	
G (1)	0,08		0,07	0,07						(10)
	7	0,079	9	9	0,084	0,090	0,085	0,078	0,087	
H (0)	0,08		0,07	0,08						(5)
	4	0,085	8	4	0,081	0,080	0,083	0,075	0,082	

Taulukon 8 tuloksista voidaan päätellä, että 1B10:n kloonit Fab 7-1-6 on hieman herkempi (nuolella osoitettu), sillä se tunnistaa 5-10 ng antigeenipitoisuuksia (rivit D ja E). Pikogrammapiitoisuudet ovat lähellä taustaa, eikä niistä voida tulkita juuri mitään. Inkubointia jatketaan vielä puolen toista tunnin ajan mittaustulosten selventämiseksi, jonka jälkeen suoritetaan mittaus.

Taulukon 9 havaitaan mittaustulokset, jolloin voidaan sanoa, että herkkyys on hieman parantunut, sillä jo 2 ng pitoisuudet poikkeavat taustasta.

TAULUKKO 5. 1B10:n herkkyystesti ELISA:lla kahden tunnin mittaus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	2,101	2,242	0,098	0,125	3,111	3,103	0,100	0,091	0,155
B	1,253	0,915	0,090	0,087	3,111	3,095	0,095	0,146	0,091
C	0,137	0,132	0,087	0,101	0,261	0,240	0,117	0,094	0,122
D	0,142	0,108	0,087	0,086	0,176	0,171	0,150	0,101	0,092
E	0,128	0,178	0,148	0,085	0,113	0,108	0,099	0,125	0,106
F	0,143	0,123	0,124	0,090	0,119	0,113	0,108	0,094	0,111
G	0,116	0,091	0,095	0,104	0,107	0,130	0,104	0,093	0,125
H	0,101	0,107	0,089	0,102	0,095	0,099	0,103	0,084	0,109

Inkubointia jatketaan vielä yön yli, jolloin viimeinen mittaus tehdään ja taulukko 6 esittää seuraavan aamun mittaustuloksia. Tällöin ei voitu enää havaita poikkeavuuksia aiemmista mittaustuloksista.

TAULUKKO 6. 1B10:n herkkyystesti ELISA:lla seuraavan aamun mittaus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	3,225	3,230	0,181	0,376	3,122	3,121	0,315	0,145	0,421
B	3,198	3,025	0,157	0,152	3,130	3,110	0,198	0,581	0,129
C	0,333	0,626	0,218	0,227	1,111	0,791	0,395	0,147	0,179
D	0,346	0,203	0,128	0,158	0,516	0,781	0,345	0,211	0,119
E	0,305	0,578	0,588	0,187	0,218	0,231	0,231	0,316	0,172
F	0,426	0,277	0,479	0,262	0,519	0,229	0,211	0,163	0,185
G	0,447	0,136	0,316	0,432	0,257	0,308	0,177	0,194	0,272
H	0,171	0,193	0,142	0,182	0,142	0,251	0,190	0,116	0,193

pKK 1B10 Fab kloonit 2-1-5 ja 7-1-6 pystyvät kummatkin tunnistamaan 2 ng verran X76-proteiinia. Tiedetään, että X76-proteiinin molekyylipaino on 26160 fg/fmol, joka on sama kuin 26 pg/fmol. Tämä on sama kuin 260 pg eli 10 fmol. Tästä saadaan, että 2,6 ng on noin 100 fmol, jolloin 2 ng on noin 77 fmol. Tulosten perusteella arvioitiin, että pKK 1B10:n herkkyys antigeenillensä on 77 fmol.

6.4 Luminesenssin ja ALEXA-FLUORin esitestit

pKK 1B10:lle tehdään ELISA:lla luminesenssin ja ALEXA-FLUORin leimoille esikokeet, joilla halutaan selvittää sen reagoimista testissä käytettyihin reagensseihin. Testeissä käytetään valmiiksi 1B10-vasta-aineella koutattuja strippejä, joissa 1B10-pitoisuudet ovat 100, 50, 10 ja 0 ng. Neljälle ensimmäiselle stripille testataan luminesenssia eri substraattien kanssa ja kahdelle viimeiselle stripille testataan ALEXA-FLUOR:in kahden eri kakkosvasta-aineen kanssa. Luminesenssissa käytetään toisena vasta-aineena aMouse HRP:n 1:10 000 ja 1:100 000 laimennoksia. Kuva 5 todentaa pipetointi järjestyksen.

HRP				PUNAVÄRI		1B1	
1	2	3	4	5	6	0	
						pit.	
						ng	
A	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	0
B	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	0
C	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	10
D	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	10
E	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	50
F	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	50
G	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	100
H	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	aMouse HRP 1:10 000	1:100 000	Dylight 550 1:250	ALEXAFLUOR 546 1:250	100
Subst	Pherm Signal	Super	GE Health Western ECL	Wes-			

KUVA 5. Luminesenssin ja ALEXA-FLUOR:in esikokeen pipetointijärjestystaulukko

1B10-stripeille tehdään tavalliset pesut ja blokkaukset, minkä jälkeen riveille 1–4 pipetoidaan kuvan 5 mukaisesti aMouseFabAFOS-vasta-aineen laimennokset. Näytteiden annetaan inkuboitua tunnin verran huoneenlämmössä, minkä jälkeen suoritetaan tavalliset pesut. Substraattireagenssit, jotka ovat valolle herkkiä, valmistetaan pimeässä, niin että Pherm Super Signal:ia tehdään kahdesta reagenssista 1:1 ja GE health ECL:ä tehdään kahdesta reagenssista 40:1. Pimiössä lisätään kaavion mukaisesti reagenssit oikeisiin kaivoihin 100 µl kuhunkin. Annetaan inkuboitua vain yhden minuutin verran, jonka jälkeen mittaus suoritetaan heti luminesenssi-ohjelmalla Victor3:lla. Tulokset voidaan havainnoida taulukossa 7.

Taulukko 7. Luminesenssi-esikokeen tulokset

1B10 ng	1	2	3	4
A (0)	344	263	6733	7702
B (0)	119	228	6761	7180
C (10)	126	134	6797	7304
D (10)	153	192	6685	7055
E (50)	232	187	7417	8365
F (50)	236	205	7696	8579
G (100)	162	259	8138	9402
H (100)	174	207	9216	10493

Riveille 5–6 testataan ALEXA FLUOR-punaväriä ja kummastakin kakkosvas-
ta-aineesta (DyLight 550 ja AlexaFluor 546) tehdään laimennokset 1:250.
Nämä pipetoidaan taulukon 8 mukaisesti 100 µl kuhunkin kaivoon. Näytteitä
inkuboidaan 1 tunnin ajan, jonka jälkeen suoritetaan normaalit pesut. Pesu-
jen jälkeen kaivoista täytyy tarkistaa, onko sinne jäänyt ilmakuplia, ja mah-
dollisesti puhkoa ne myös. Stripit mitataan aallonpituudella 546 nm. Taulu-
kossa 8 on saadut tulokset punavärin esikokeesta.

Taulukko 8. ALEXA FLUOR-värin esikokeen tulokset

	DyLight 550	AlexaFluor 546
1B10 ng	1	2
A (0)	4108	4621
B (0)	4146	3713
C (10)	4443	3357
D (10)	3466	3770
E (50)	4147	3956
F (50)	4381	3587
G (100)	5181	4780
H (100)	5326	4847

Kummankin, luminesenssin ja punavärin, taustat ovat liian suuret herkkyys-
mittaukseen, joten ne testit hylätään. Testien optimoimiseen kuluisi aikaa jo-
pa 3 viikkoa, johon valitettavasti ei tämän työn osalta aika riittänyt.

6.5 Syrjäytymiskoe

Syrjäytymiskoe vasta-aineen antigeeniin sitoutumisen spesifisyyden selvit-
tämiseksi tehdään valmiiksi 50 ng X76-proteiinilla koutatuille levyillä. Näyttei-

nä käytetään pKK 1B10:n klooneja 2-1-5 ja 7-1-6. Levy pestään ja blokataan tavalliseen tapaan. Syrjäyttäjinä käytetään peptidejä 12-28 ja 1-22, joista tehdään laimennokset niin, että kaivoihin saadaan pipetoitua näytettä 50 µl eri pitoisuuksina. Halutut peptidipitoisuudet ovat 200, 50, 10, 5, 1, 0,5 ja 0,1 ng. Taulukossa 9 on pipetoimiskaavio.

Taulukko 9. Syrjäytymiskokeen pipetointitaulukko

Peptidi pitoisuus	2-1-5						7-1-6					
0 ng												
200 ng												
50 ng												
10 ng												
5 ng												
1 ng												
0,5 ng												
0,1 ng												
	12-28			1-22			12-28			1-22		

pKK 1B10-kloonien 2-1-5 ja 7-1-6 mediuemeista tehdään 1:2000 laimennokset ja niitä pipetoidaan kaivoihin 50 µl kaavion mukaisesti, joten loppupitoisuus on 1:4000 alkuperäisestä. Näytteitä inkuboidaan 1-2 tunnin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen levy pestään runsain pesuiin. Toisena vastaaineena käytetään AFOS leimattua aMouseFab vasta-aineen 1:3000 laimennosta. Tätä pipetoidaan kaivoihin 100 µl ja inkuboidaan huoneenlämmössä 45 minuutin ajan, minkä jälkeen levy pestään jälleen kerran runsain pesuiin. PNPP-substraattia pipetoidaan kaivoihin 100 µl, minkä jälkeen levy suojataan valolta foliolla. 30 minuutin inkuboinnin jälkeen suoritetaan mittaus aallonpituudella 405 nm.

TAULUKKO 10. Syrjäytymiskokeen tulokset.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,418	0,45 4	0,42 4	0,45 9	0,60 1	0,43 3	0,65 0	0,69 5	0,71 1	0,71 1	0,62 5	0,48 9
B	0,079	0,08 8	0,17 0	0,47 6	0,47 6	0,42 0	0,08 5	0,08 7	0,08 2	0,69 9	0,61 9	0,38 9
C	0,103	0,11 4	0,16 3	0,40 9	0,47 5	0,43 2	0,10 9	0,10 1	0,13 2	0,61 2	0,55 2	0,37 4
D	0,225	0,43 9	0,25 3	0,45 2	0,46 1	0,42 9	0,23 3	0,24 2	0,26 2	0,50 1	0,51 8	0,76 1
E	0,263	0,29 2	0,54 3	0,46 0	0,49 5	0,44 6	0,34 0	0,31 0	0,49 7	0,67 6	0,60 5	0,42 8
F	0,725	0,41 6	0,39 0	0,51 0	0,53 2	0,47 8	0,58 3	0,58 1	0,68 7	0,74 8	0,47 7	0,37 8
G	0,525	0,41 7	0,42 6	0,55 5	0,52 3	0,45 3	0,67 4	0,62 5	0,68 2	0,65 7	0,54 8	0,53 1
H	0,451	0,48 0	0,49 4	0,48 9	0,52 7	0,49 2	0,72 3	0,64 5	0,64 7	0,61 3	0,59 3	0,43 6

Kuten taulukosta 10 voidaan havaita, A-rivillä on tapahtunut 100 % sitoutuminen kloonien osalta, koska niissä kaivoissa ei ole peptidejä. Tätä pidetään nollatasona. Rivillä B kaikki vasta-aine on syrjäytetty peptidien osalta ja rivillä G ja H syrjäytymistä ei ole juurikaan tapahtunut, koska peptidien pitoisuus on liian alhainen. Tuloksista voidaan myös havaita se, että klooni 7-1-6 on hieman herkempi syrjäytymiselle kuin klooni 2-1-5.

7 TUOTTEEN KUVAUS

Jokaisen palveluita tarjoavan laboratorion, kuten myös virtuaalilaboratorion, täytyy antaa asiakkailensa laadukkaan tuotteen lisäksi tuoteseloste, josta tuotteen ominaisuudet käyvät ilmi. Tuoteselosteen laatii laboratoriopäällikkö saatujen tulosten perusteella. Tuoteselosteen hyväksyy tuotantopäällikkö. Kummallakin päälliköllä tulee olla kopiot kaikista dokumenteista liittyen tuotteeseen tai palveluun arkistointijärjestyksessä esimerkiksi omassa työhuoneessaan. Tuoteseloste voi olla esimerkiksi liitteen 11 mukainen.

7.1 Tuotteen pääpiirteet

Virtuaalilaboratorion päätuote on 1B10-G3 vasta-aine, joka on spesifinen antigeenille NTproBNP. Vasta-aine 1B10 on monoklonaalinen Fab-muotoinen vasta-aine, jota on lopullisesti tuotettu RV308-soluissa. Vasta-aineita tuottuu ihmisen elimistöön vieraiden molekyylien (antigeenien) takia ja vasta-aineet neutralisoivat niitä.

7.2 Tuotteen soveltuvuus

Vasta-ainetta 1B10 käytetään diagnostiikassa molekyylin NTproBNP:n tunnistamiseen. Tämän molekyylin esiastetta proBNP:tä muodostuu elimistöön sydäninfarktin aikana ja sitä voidaan todeta parin tunnin sisällä sydäninfarktista. Hormoni proBNP hajoaa NTproBNP₁₋₇₆ verenkiertoon joutuessaan. Fab vasta-aine 1B10 tunnistaa ja tarttuu spesifisesti NTproBNP₁₋₇₆:n peptidiketjun aminohappoihin 22–28. ELISA-testeissä käytetään kuoppalevyjen kouttaukseen proteiinia X76, joka on kehitetty antigeenistä. X tarkoittaa tioredoksiinia ja 76 on aminohappojen määrä samassa järjestyksessä kuin alkuperäisessä antigeenissä.

Vasta-ainetta 1B10 voidaan käyttää lääke diagnostiikassa ELISA-testeissä antigeeninsä tunnistamiseen. Muita sovellutuksia vasta-aineen käytössä on antigeeninsä puhdistus ja standardikuvaajan teko.

7.3 Tuotteen varastointi ja säilyvyys

Vasta-ainetta 1B10-G3 varastoidaan eppendorf-putkissa 10 µg:n ja 100 µg:n annoksissa pakkasessa. Liuosmuodossa oleva avaamaton tuote voi säilyä pitkänkin aikaa, mutta avattu tuote olisi syytä käyttää nopeasti. Kun tuoteputkesta otetaan tuotetta, eppendorf-putken kanteen merkitään punainen raksi, jotta muutkin työntekijät tietävät, että putki on sulatettu ja käytetty.

8 TUOTTEEN HALLINNOINTI

Jokaisella laboratoriollla, kuten myös tässä opinnäytetyössä käytetyllä virtuaalilaboratoriollla, on oltava tuotemappi eli dokumentit tuotteen ominaisuuksista ja käytettävyydestä. Laboratorioilla on oltava olemassa menetelmäohjeet, jotka sisältävät työssä käytetyt ohjeet ja viitemateriaalit, esimerkiksi käytetyt kansainväliset standardit. Menetelmäohjeet sisältävät tuotannossa käytetyt työohjeet sekä kaikki tuotannossa tarvittavat laitteet. Jokainen seuranta- ja mittaustulos raportoidaan erilliseen dokumenttimappiin. Työohjeiden lisäksi laboratoriolta tulee löytyä menetelmäohje tuotteen pakkauksesta ja pakkausmerkintöjen suorittamisesta. Nämä löytyvät tuotemapista. Jokaisesta tuotetusta erästä on olemassa dokumentit, joiden avulla voidaan jäljitellä ja yksilöidä tuotteen määrä, laatu ja jakelu.

Palveluja tuottavan laboratorio-organisaation tulee seurata aktiivisesti tuotantoprosessia jonkin toimivan menetelmän tai mittauksen kautta. Tuotannolle asetetaan dokumentoitavat seurantapistet ja mittaukset, joiden avulla voidaan tarkkailla tuotantoprosessin laatua. Tarvittaessa selkeistä dokumenteista käy ilmi tuotantoprosessin virheet, jolloin lopullisen tuotteen laatua voidaan parantaa.

Virtuaalilaboratorio on määrittänyt vasta-aineen 1B10-G3 ominaisuuksia eli spesifikaatiot. Tuotteelle on ennalta tehdyn suunnitelman mukaisesti määriteltä ominaisuudet, jotka sen tulee täyttää tuotantoprosessin sopivassa vaiheessa keskeneräisenä tuotteena, tuotteen eri komponentteina ja lopuksi valmiina kokonaisena tuotteena. Kaikkien testien hyväksymiskriteereiden täyttymisestä kirjataan dokumentit, joista selviää kuka on hyväksynyt tuotteelle jatko/myyntiluvan. Tuotetta ei voida luovuttaa asiakkaille ennen, kuin kaikki toimenpiteet on hyväksytysti suoritettu.

Tuotteen mukana asiakkaille toimitetaan liitteen 11 mukainen tuotedokumentti, josta käy ilmi kaikki 1B10-G3 ominaisuudet.

9 POHDINTA

Vasta-aineen tuotanto on pitkä ja monimutkainen prosessi, joka vaatii aikaa ja resursseja. Tuotantoon kuuluu monia eri vaiheita ja menetelmiä, joita osaa testattiin tässä opinnäytetyössä. Työmenetelmät, joita opinnäytetyössä käytettiin, olivat monipuolisia, mutta osa aikaa vieviä. Yhden vasta-aineen tuotanto alusta alkaen on todella pitkä prosessi, johon yhden opinnäytetyön aika ei riitä. Tässä opinnäytetyössä siis käsiteltiin osaa työosioista ja yritettiin keskittyä niihin, joissa korostuu huolellinen työskentely ja toiminnan laatu.

Laboratorio-organisaatioissa laadunvalvonta on tärkeää hyvän tuotteen saavuttamiseksi. Laatujärjestelmän avulla pyritään laadukkaan tuotteen ohella pitämään asiakaskunta tyytyväisenä ja yrityksen maine moitteettomana. Myös mahdolliset virheet on helppo jäljittää laatujärjestelmän avulla, jolloin mahdollisista korvausvelvollisuuksistakin päästään yhteissopuun. Eri laboratorio-organisaatiot eivät tarvitse kaikkia laatujärjestelmiä taatakseen tuotteidensa laadun. Tavallisissa tutkimuslaboratorioissa riittää GLP, hyvät laboratoriokäytännöt, mutta kun tuotetaan palveluita/tuotteita, kuten esimerkiksi virtuaalilaboratorio tuottaa vasta-ainetta 1B10, täytyy myös organisaation omaksua hyvät tuotantokäytännöt. Näiden kaikkien lisäksi EU varmistaa omien direktiiviensä kautta organisaatioille omat määräykset.

Kun yritys validoi tuotantomenetelmänsä, tuotteen laatu pitäisi parantua, mutta joskus yritykset sertifioivat vain osan yrityksen toiminnasta esimerkiksi ainoastaan asiakashallinnan ja käyttävät silti sertifikaattia yrityksen kaiken toiminnan markkinoinnissa. Asiakkaille ei kerrota koko totuutta sertifikaatista, sillä sertifikaattimerkintä yrityksen perässä ei aina takaa validoitua tuotantopuolta saatikka koko toimintaa. Vaikka laatujärjestelmä on kehitetty yhdenmukaistamaan työskentelyä eli aina tehdään samalla tavalla, voi se monimutkaisuudessaan olla myös rasite. Isoissa laboratorio-organisaatioissa on usein monta johtoporrasta, jonka täytyy hyväksyä käytettävät metodit ja reagenssit. Se voi omalta osaltaan hidastaa työskentelyä, kun joudutaan odotte-

lemaan lupia tai resursseja toiminnan jatkamiseen. Vaikka yritys olisi investoinutkin laatujärjestelmään, jos se ei ole iskostunut jokaiseen työntekijää, ei ole takuita, että työn jälki olisi laadukasta.

Isolla yrityksellä on varaa ostaa ulkopuoliselta auditoijalta laatujärjestelmä ja saada silloin sertifikaattimerkki, joka itsessään nostaa yrityksen mainetta. Se lisää luotettavuutta isoa yritystä kohtaa, jolloin pienemmät yritykset kärsivät. Heidänkin työnsä voi olla laadukasta ja asiakaskuntaa saattaa riittää, jolloin kalliin auditoinnin, joka maksaa 3000–4000 € kerralta ja on tehtävä joka toinen vuosi, ostaminen ei välttämättä kannata. Tällöin varmasti laadukkaat ja hyvät tuotteet puhuvat puolestaan pikku yrityksen eduksi. Nykyajan trendinähän on suosia pieniä yrityksiä.

Tämän opinnäytetyön aiheena oli laatujärjestelmän näkökulmasta tarkkailla vasta-aineen tuotantoa ja sen käyttöä palvelun tarjoavana laboratoriona. Opinnäytetyössä käsiteltiin osaa tuotantomenetelmistä sekä tuotteen testausta ELISA:lla. Testeissä vasta-aineelle 1B10 saatiin tunnistusherkkyydeksi 77 fmol. Kun syrjäyttävän peptidin pitoisuus kasvaa 1 ng:sta aina 200 ng:aan, on syrjäytymistä tapahtunut osittain tai kokonaan. Tästä voidaan päätellä 1B10:n olevan herkkä syrjäytymiselle.

ELISA-testeissä positiivisena kontrollina käytettiin Fab32-vasta-ainetta, joka on samankaltainen kuin 1B10:kin. Fab32-vasta-aine on aiemmin testattu vasta-aine, jonka sitoutumisominaisuudet antigeeniin NTproBNP ovat parhaimmat. Fab32 on herkkä, joka tunnistaa jo 5 fmol:n antigeenipitoisuuksia. ELISA-testeillä saatiin vasta-aineen 1B10 tunnistusherkkyydeksi 77 fmol, joka on paljon huonompi kuin Fab32:n tulos.

Opiskelijana on hieman vaikeaa ajatella kuin laboratoriopäällikkö, jonka työnä on varmistaa laadun toteutuminen kaikissa osa-alueissa, niin suunnittelussa kuin työskentelyssäkin loppuraportointiin saakka. Laatujärjestelmän ylläpito laboratoriossa on iso työ, josta paperityöt eivät lopu kesken.

LÄHTEET

Aittomäki, Esa - Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki - Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas 2002, Bioprosessitekniikka. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Ala-Kopsala, Minna 2006. Circulating N-terminal fragment of A- and B-type natriurtic peptides: molecular heterogeneity, measurement and clinical applicaton. Oulu: Oulu University Press.

Bertsch, T. – Dikkeschei, B. – Gurr, E. – Haven, W. – Jørgensen, B. – Lotz, J. - Müller-Bardorff, M. - Ordóñez-Llanos, J. – Schulz, I. – Spinke, J. – Thiele, M. – Zerback, R. 2007. New point of care test for the determination of NTproBNP in whole blood. ClinLab.2007;53(7-8):423-31.

Chakravarthy, Ankur 2011. ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Saatavilla: <http://exploreable.wordpress.com/2011/05/25/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>. Hakupäivä: 24.11.11.

Glyseroli. 2011. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/Glyseroli>. Hakupäivä 2.11.11.

Harlow, Ed – Lane, David 1988. Antibodies a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

Histologia. 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/b-solut/2/>. Hakupäivä 8.11.2011.

Kukkonen, M. 2010 TRPA1-proteiinin tuotto ja karakterisointi western blot-menetelmällä. Tampereen ammattikorkeakoulu. Solu- ja molekyylibiologian erikoistumisopinnot. Kehittämistehtävä.

Kumpulainen, Elsa 2011. Elisa Kitin laaduntarkkailu, Yleisohje. Oulun seudun ammattikorkeakoulu, Oulu.

Lommi, Jyri 2003. Pääkirjoitus: B-tyypin natriureettinen peptidi ja sydämen vajaatoiminta. Duodecim 2003;119:1301–2.

Natriuretic Peptides 2011. Siemens. Saatavissa: http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/PSGenericDisplay~q_catalogId~e_-101~a_langId~e_-101~a_pageId~e_111728~a_storeId~e_10001.htm. Hakupäivä 17.11.2011.

Overview of ELISA, Thermo Scientific, 2011. Saatavissa: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>. Hakupäivä 18.10.2011.

Producing Monoclonal Antibodies, 2002. Saatavilla: <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/monoclonalantibodies.html>. Hakupäivä 20.10.2011.

Riistana, Jarmo - Rantanen, Ville. MIT-4070/MIT-4076 Biosensors. Saatavissa: <http://www.mit.tut.fi/MIT-4070/Laskuharjoitukset.html>. Hakupäivä 18.10.2011.

Räisänen, Jouni 2007. GLP. Saatavissa: http://www.sttv.fi/kemo/kemikaali_glp.htm. Hakupäivä 19.12.2011.

Soppi, Esa 1992. Kliininen immunologia. Oy Medical Interscience Talents M.I.T. Consulting Ltd. Lahti: Kirjapaino Markprint Oy.

Thermo Scientific 2006. GeneRuler 1kb DNA Ladder. Saatavilla: http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1113. Hakupäivä 20.12.2011.

Transformaatio, 2006. Solunetti. Saatavilla:
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transformaatio/2/>. Hakupäivä:
20.10.2011.

TurkuCRC, 2011. Hyvän kliinisen tutkimustavan periaatteet. Saatavilla:
<http://www.turkucrc.fi/index.phtml?s=43>. Hakupäivä 14.12.2011.

Turpeenoja, Leena 2005. Biokemiaa. 4-2. painos. Vantaa: Dark Oy.

Validant 2010. GMP Good Manufacturing Practice. Saatavilla:
http://www.validoi.com/gmp_good_manufacturing_practice. Hakupäivä
14.12.2011.

Vasta-aineet. 2006. Solunetti. Saatavissa:
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>. Hakupäivä 18.10.2011.

Veijola, Johanna 2011. Työnohjaaja, Oulun yliopisto, Fysiologianlaitos.
Keskustelu 8.12.2011.

Vesanen, Marko 2001. Sisätaudit. Pernan fysiologiaa. Saatavissa:
<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/011011.htm>. Hakupäivä 8.11.2011.

LIITTEET

- Liite 1. Hybridoomasolujen kasvatus
- Liite 2. Plasmidin transformaatio RV308 soluihin
- Liite 3. Kloonien tarkistus
- Liite 4. NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit
- Liite 5. Kuoppalevyjen kouttaaminen
- Liite 6. Vasta-aineen puhdistus IMAC-puhdistuksella
- Liite 7. Vasta-aineen konsentroidi
- Liite 8. Peroxidase Labeling Kit – NH₂
- Liite 9. ELISA kuoppalevyjen pesu
- Liite 10. Kuoppalevyjen blokkaminen
- Liite 11. 1B10-G3 tuoteseloste
- Liite 12. Virtuaalilaboratorion laiteluettelo

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011
Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.1

HYBRIDOOMASOLUJEN KASVATUS

TYÖN TAUSTAA

Solujen kasvatus

Soluviljelyllä tarkoitetaan solujen kasvatusta ja hoitoa kasvatusliuoksessa, ja sen avulla tutkitaan solun sisäisiä toimintoja kuten esimerkiksi proteiinisynteesiä. Soluviljely vaatii aseptiset työskentelytavat ja steriilit liuokset ja työhön tarkoitettut steriloidut työvälineet. Tärkeimmät välineet ovat CO₂-inkubaattori, käänteismikroskooppi ja laminaarivirtauskaappi, joiden tulisi sijaita omassa laboratoriohuoneessa, jossa kaikki työskentely tapahtuu. Kaikki pinnat, välineet ja hanskat puhdistetaan 70-prosenttisella etanolilla kontaminaatioiden vähentämiseksi. Kasvatusliuos eli medium sisältää yleisesti erilaisia kasvutekijöitä, kuten aminohappoja ja suoloja sekä seerumia.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- CO₂-inkubaattori
- Laminaarikaappi
- Käänteisfaasimikroskooppi
- Mäntäpipetti
- Pipetboy
- Pipettejä (5 ml, 10 ml...)
- Pipetinkärkiä
- Soluviljelypullot

LIUOKSET JA REAGENSIT

- Solut
 - o Ampullissa n 7,2x10⁶ /ml (viability 61%): eläviä soluja 4,4x10⁶ solua /ml
- 70% etanoli
- 0,1 M TRIS
- Na-atsidi
- 1xPBS (Valmiina annospulloissa), OneMed BCHRL1815 tai SIGMA.
- 1xTrypsiini-EDTA (Valmiina annospulloissa), SIGMA T3924. Säilytetään -20 °C.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.1

Kantaliuokset

- Kasvatusmedium; 1xRPMI (Sigma R0883)
- o Sisältää Na-bikarbonaattia
- 1 M HEPES-puskuri pH 7,2–7,6 (Valmiina annospulloissa), VWR BCHRL1613. Säilytetään huoneenlämmössä valolta suojattuna.
- 7,5 % Na-bikarbonaatti (Valmiina annospulloissa), SIGMA S8761. Säilytetään jääkaapissa.
- 200 mM L-Glutamine (Valmiina annospulloissa), SIGMA G7513. Säilytetään -20C.
- 100 mM Na-pyruvate (Valmiina annospulloissa), SIGMA S8636. Säilytetään jääkaapissa.
- 20% glukoosi (Valmiina annospulloissa), SIGMA/ Fluka 49163. Laimennetaan työliuokseen 1/80 eli pitoisuuteen 2,5g/L. Lopullinen pitoisuus 4,5g/L. Säilytetään jääkaapissa.
- 10kU/ml Penicillin-10 mg/ml streptomycin. (Valmiina annospulloissa), SIGMA P0781. Laimennetaan työliuokseen 1/100 eli pitoisuuteen 100U/ml P ja 0,1 mg/ml S. Säilytetään -20C.
- FBS, naudan sikiön seerumi (Valmiina annospulloissa), VWR BCHRS0115. Inaktivoidaan inkuboimalla liuosta 56C asteessa 1h. Laimennetaan työliuokseen 1/10 eli pitoisuuteen 10 FBS.

Kasvatusmedium RPMI1640 tehdään useasta eri kantaliuoksesta. RPMI1640 mediumin pitoisuudet työliuoksessa ovat 102 ml:aan 1xRPMI:tä pitää lisätä:

- 10% (v/v) FBS (12 ml)
- 10,0 mM HEPES (1,2 ml)
- 2,0 mM L-glutamine (1,2 ml)
- 1,0 mM Na-pyruvaatti (1,2 ml)
- 100 U/ml Penisilliini- 100µg/ml streptomysiini (1,2 ml)
- 4,5 g/L glukoosi (1,5 ml)

1. Tee kasvatusmedium lisäämällä 102 ml:aan 1xRPMI:tä 12 ml FBS, 1,2 ml valmista 1M HEPES-puskuria, 1,2 ml L-glutaminea, 1,2 ml Na-pyruvaattia, 1,2ml PS-seosta ja 1,5 ml 20 % glukoosia.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011
Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.1

TYÖVAIHEET

Aloituis

1. Sulata solut nopeasti ravistaen 37 °C vesihauteessa maksimissaan 2 tunnin ajan.
2. Dekontaminoi solut kastamalla tai suihkuttamalla pinta 70-prosenttisella etanolilla.
3. Siirrä solut "tasapainotetutta" mediumilla 10–20 ml kasvatuspulloon, ja täytä tilavuus 20 ml:ksi tasapainotetulla mediumilla. (Tasapainotus tapahtuu pitämällä mediumia vähintään 15 min ajan CO₂-kaapissa)
4. Kasvata soluja 37 °C ja 5 % CO₂ ilmanpaineessa.
 - Seuraa kasvua faasi-kontrastimikroskoopilla
 - Tarkkaile kontaminaatiota

Kasvuston ylläpito

5. Vaihda tuore medium joka toinen tai kolmas päivä, riippuen kasvuston tiheydestä ja kasvuvauhdista.
6. Pidä solujen määrä välillä 100 000–1 000 000 solua per ml. Jaa joka 2–3 päivän välein 1:5 esimerkiksi ma, ke ja pe.
7. Muista kerätä medium talteen, sillä se sisältää tärkeitä solujen tuottamia proteiineja.
8. Kerätty medium puskuroidaan säätämällä sen pH = 7.4 0,1 M TRIS:llä
9. Steriilisuodata medium 0,02 µm suodattimella imun avulla. Lisää sitten Na-atsidia loppupitoisuuteen 0,02 %.

Solujen jakaminen

Solut kasvavat myös suspensiona ja ovat vain löyhästi kiinni pohjassa. Näin ollen pelkkä "läimäyttely" saattaa riittää irrottamaan solut pohjasta. Jos haluat voit trypsinoida seuraavalaaisesti:

10. Pese solut kahdesti 5 ml:lla huoneenlämpöisellä 1xPBS:llä.
11. Kaada medium steriiliin dekanteriin ja laita talteen kylmään.
12. Pipetoi pulloon steriilisti 5 ml huoneenlämpöistä 1xPBS ja kallistele pulloa.
13. Poista liuos joko kaatamalla, imemällä tai pipetillä. Toista pesu.
14. Lisää kasvatuspulloon huoneenlämpöistä 1xTR-EDTA liuosta 1 ml tai niin paljon että pohja peittyy kallistellen.
15. Inkuboi huoneenlämmössä tai 37 °C maksimissaan 5 minuutin ajan, välillä koputellen pulloa. Tarkastele soluja mikroskoopilla, milloin ovat irronneet.
16. Merkitse inkuboinnin ajan 4 uutta pulloa, ja jaa niihin 10 ml tuoretta mediumia. Pulloihin tulee tiedot solulinjasta, jakokerrasta ja pvm:stä.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö

Oulun Yliopisto

Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.1

17. Laimenna trypsiinikäsittely lisäämällä solupulloon 20 ml tuoretta mediumia ja suspensoi hellävaraisesti kallistellen. HUOM! Trypsiinikäsittelyä ei tarvitse tehdä, jos solut irtoavat itseltään.

18. Siirrä suspensiota uusiin pulloihin 4ml:n verran kuhunkin.

19. Lisää vanhaan pulloon 10 ml tuoretta mediumia.

20. Sulje korkit, suihkauta pullot ja CO₂-inkubaattorin kaapin ovi viinalla. Nosta pullot tarjottimella kaappiin.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011
Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.2

PLASMIDIN TRANSFORMAATIO RV308-SOLUIHIN

TYÖN TAUSTAA

Plasmidi-DNA on rengasmaisen DNA-molekyylin, joka sijaitsee kromosomin ulkopuolella solulimassa. Plasmidissa on ainakin yksi ORI-alue (origin of replication) ja MCS-alue (multiple cloning site). ORI-alue mahdollistaa DNA:n itsenäisen kahdentumisen ja MCS-alueeseen voidaan lisätä pilkottuja ja eristettyjä DNA-pätkiä. Tällöin plasmidi muuttuu vektoriksi, jolloin se on helppo viedä solun sisään.

Transformaatiolla tarkoitetaan plasmidi-DNA:n viemistä kompetenttien bakteerisolujen sisään. Kemiallisesti kompetentteja soluja voidaan tehdä CaCl_2 -käsittelyllä. Tällöin solut saadaan tilaan, jossa ne ovat kykeneviä hetkellisesti vastaanottamaan DNA:n sisäänsä. RV308-solut ovat proteiintuottosoluja.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- Laminaarikaappi
- Lämpökaappi
- Ravistelija
- Lämpöblokki
- Jääastia
- Mäntäpipettejä
- Filtrierikärkiä
- 70% etanolilla täytetty suihkepullo
- Steriilejä silmukoita

LIUOKSET JA REAGENSIT

- Kompetentit solut: RV308 (Porraskäytävän syväpakastin, laatikko 20, Biobox 27)
- SOC-liemi
- LB-50 ug/ml carb—1 % gluk.-kasvatusmaljoja
 -
- 1xPBS-liuos
 - Laimenna valmista 10xPBS-liuosta 1:10 steriiliin veteen.
- Steriili vesi

NÄYTE

Eristetty plasmidi.

TYÖVAIHEET

Transformaatio

1. Pakkasesta haetaan jäihin tarvittava määrä RV308-soluputkia (yhtä monta kuin on eri plasmidia (näytettä) on + yksi kontrolliksi).
2. Siirrä filtrierikärjellä n. 10–20 µl plasmidilaimennosta kompetentteihin soluihin eppendorf-putkessa jäissä.
3. Kontrolliputkeen pipetoidaan steriiliä vettä saman verran.
4. Inkuboi jäissä 15–20 min, välillä napsauttaen hellästi.
5. Anna lämpöshokki 1,5 min 42 °C:ssa.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.2

6. Seisota jäissä 2 min.
7. Lisää 0,5 ml SOC-lientä ja kasvata ravistelijassa 30 min 37 °C.
8. Maljaa laminaarikaapissa LB-carb-gluk.-maljoille näytteet kahdelle eri pitoisuudelle
 - a. Laita pisara 1xPBS-liuosta maljalle ja pipetoi 10 µl näytettä. Levitä silmukalla tasaisesti koko maljalle.
 - b. Laita pisara 1xPBS-liuosta maljalle ja pipetoi 50 µl näytettä. Levitä silmukalla tasaisesti koko maljalle.
 - c. Kontrollista eli siis siitä pöpöputkesta, jossa vain vettä pipetoidaan 50 µl maljalle. Levitys silmukalla tasaisesti.
9. Anna näytteiden hetken seisoa kansi raollaan oikein päin laminaarissa. Sulje kannet, käännä ylösalaisin (pohja ylös) ja laita kasvamaan lämpökaappiin 37 °C yön yli.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011
Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.3

KLOONIEN TARKISTUS

TYÖN TAUSTAA

Klooneja tarkistetaan eristämällä niistä DNA ja ajamalla ne agarosigeelille. Geeli erottelee digestiossa pilkkoutuneet DNA-palat kokonsa mukaan sähkövirran avulla. Geeliä tarkastellessa sinivalopöydällä, voidaan erottaa pilkkoutuneet palat ja vertaamalla niitä tunnetun markkerin vyöhykkeisiin saadaan niiden molekyylikoko tietoon.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- Vortex
- Sentrifuugi
- Eppendorf-putkia
- Nanodrop
- 250 ml Erlenmeyer
- Agarosigeelin ajokelkka ja -allas ja ajolaite
- Sinivalopöytä

LIUKSET JA REAGENSIT

- 50% steriloitu glyseroli 500 µl annoksissa
- Nestetyppi
- Miniprep. DNA:n eristämiseen tarvittavat liuokset
 - Puskuri A1
 - Puskuri A2
 - Puskuri A3
 - Pesupuskuri AW
 - Puskuri A4
 - Steriili H₂O
- 10xNEB n.4
- BSA
- Nhe1*HF
- Not1*HF
- lopetusreagenssi XC-väri
- Multipurpose Agar
- 1xTAE-puskuri
- Markkeri 1 kb DNA-ladder

NÄYTE

Yön yli kasvanut kasvusto.

TYÖVAIHEET

Yön yli kasvaneesta kloonikasvustosta tehdään glyserolistokit varastoon.

Glyserolistokit

1. Ota 500 µl:n 50% glyseroliannos ja lisää niihin 500 µl haluttua klooniasetta, joka on kasvanut yön yli. Toista jokaiselle klooninäytteelle.
2. Vorteksoidut putket ja seisota kahden tunnin ajan huoneenlämmössä. Sekoita putkia välillä muutamaan otteeseen.
3. Pikapakasta putket nestetyypellä ja varastoi -80 °C.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö

Työohje 1.1.3

Oulun Yliopisto

20.9.2011

Laatinut: Ulla Lahtinen

Tarkastanut: Johanna Veijola

Miniprep. DNA:n eristys

1. Sentrifugoi loput kasvustosta solupelletiksi 3000 rpm x 10 min. Kaada liemi pois ja eristä solunapista DNA Mini prep. KIT ohjeen mukaan seuraavanlaisesti:
2. Lisää putkeen 250 µl puskuria A1.
3. Kääntele putkia ja liuota solunappi. Pipetoi saatu liuos 1,5 ml eppendorf-putkiin.
4. Lisää puskuria 250 µl puskuria A2.
5. Sekoita eppendorf-putkia kääntelemällä 6–7 kertaa ylösalaisin ja seisota putkia maksimissaan neljän minuutin ajan. (Kolmen minuutin kohdalla voi ruveta valmistelemaan seuraavaa vaihetta, aukaisemalla putkien kansia.)
6. Lisää neutralisointipuskuria A3 ja sentrifugoi 10 min x 11 000g.
7. Pipetoi kirkas neste pylväseppendorf-putkeen ja sentrifugoi 1 min x 11 000g.
8. Kaada alaputken jäte pois ja pipetoi yläputkeen 500 µl pesupuskuria AW. Sentrifugoi 1 min x 11 000g.
9. Kaada jälleen alaputken jäte pois ja pipetoi yläputkeen 600 µl puskuria A4. Sentrifugoi 1 min x 11 000g.
10. Kaada jälleen alaputken jäte pois ja fuugaa uudestaan 2 min x 11 000g.
11. Siirrä yläputki steriiliin 1,5 ml:n eppendorf-putkeen ja pipetoi 30 µl steriiliä vettä. Anna putkien seisoa huoneenlämmössä yhden minuutin verran. Sentrifugoi 1 min x 11 000g.
12. Ota yläputket pois ja sulje eppendorf-putket.
13. Mittaa DNA-pitoisuus Nanodropilla.

Testidigestio

Jokaisesta näytteestä valmistetaan digestioreaktio lisäämällä näytettä sopivan verran pitoisuutensa nähden valmistettuun mix-seokseen. Näytteen pitoisuus digestiossa tulisi olla 250–300 ng välillä. Koska muiden tarvittavien reagenssien pipetoitavat tilavuudet ovat hyvin pieniä, on järkevintä pipetoida niin sanottu Mix-seos, jossa on tarvittava määrä kaikkia reagensseja jokaista näytettä kohden. Kokonaistilavuus näytteen ja seoksen kanssa tulisi olla 20 µl. Lopputilavuus täytetään steriilillä vedellä.

Yhtä näytettä varten tarvitaan:

- | | |
|-------------------------|----------------|
| 1. 10xNEB | n.42 µl |
| 2. BSA | 0,2 µl |
| 3. Nhe1*HF | 0,5 µl |
| 4. Not1*HF | 0,5 µl |
| 5. St. H ₂ O | ? |
| 6. Näyte | ? (250–300 ng) |
| | 20 µl |

Laske tarvittava määrä mixiä.

1. Pipetoi mixiä ja näytettä tarvittava määrä eppendorf-putkiin.
2. Laita epparit 37 °C 45 minuutiksi.
3. Pipetoi reaktion 2,5 µl lopetusreagenssia, XC-väriä, eppareihin.
4. Jos et aja vielä saman päivän aikana näytteet agarosigeelille, voit pakastaa ne.

Agarosigeelin valu

1. Punnitse 250 millilitran erlenmeyeriin 1 g multipurpose agaria
2. Lisää 100 ml 1xTAE-puskuria
3. Sulata aagari mikrossa. Varo räiskymistä ja vahdi mikroa.
4. Jäähdyneeseen (kun voi koskea käden sisäpinnalla lasiin, mutta tuntuu vielä lämpimältä, muttei polta) aagariin lisätään 10 µl / 100 ml geeliä SYBR safe DNA gel stain- väriainetta.
5. Vala geeli ajokelkkaan ja laita kammot paikoilleen.
6. Anna geelin jähmettyä 20–30 min.
7. Ota kampa pois geeliltä.
8. Jos et käytä geeliä saman päivän aikana, voi sitä säilyttää jääkaapissa tiivisti pussiin käärittynä.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö

Oulun Yliopisto

Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011









































Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.3

Näytteiden ajo

1. Laita kelkka, jossa geeli, ajolaitteen altaaseen.
2. Täytä allas 1xTAE-puskurilla.
3. Pipetoi näytteet kokonaisuudessaan kaivoon.
4. Jätä yksi kaivo tyhjäksi näytteistä ja pipetoi sinne 5 µl markkeria (1kb DNA-ladder)
5. Laita johdot paikoillee; punainen punaiseen ja musta mustaan.
6. Kytke virta päälle ja aja 80 V:lla noin 20–30 min.
7. Tarkkaile ajon aikana sinisen rintaman kulkua. Kun se saavuttaa pohjan, on ajo valmis.
8. Kytke virta pois päältä ja ota geeli pois ajoaltaasta.
9. Katso geeliä sinivalopöydällä ja vertaa tunnetun markkerin vyöhykkeisiin, ovatko kloonit onnistuneet.

Plasmid DNA Purification Protocol-at-a-glance (Rev.07)

	NucleoSpin® Plasmid	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)		NucleoSpin® Plasmid QuickPure
1 Cultivate and harvest bacterial cells	 	 	11,000 x g 30 s	 
2 Cell lysis	 	 	250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, 5 min 300 µL Buffer A3	 
3 Clarification of the lysate	 	 	11,000 x g 5 – 10 min	 
4 Bind DNA	 	 	Load supernatant 11,000 x g 1 min	 
5 Wash silica membrane	 	 	(Optional: 500 µL Buffer AW) 600 µL Buffer A4 11,000 x g 1 min	 
6 Dry silica membrane	 	 	11,000 x g 2 min	Drying is performed during centrifugation of the single washing step
7 Elute DNA	 	 	50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g 1 min	 

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.5

LEVYJEN PINNOITTAMINEN

TYÖN TAUSTAA

Kuoppalevyt pinnoitetaan koutattavalla analyytin eri pitoisuuksilla. Analyytinä käytettiin X76-proteiinia, joka on rekombinantti ihmisen NTproBNP₁₋₇₆ proteiini fuusioituna histidiini-hännän sisältävään tioredoksiiniin. Analyytti on affiniteettipuhdistettu IMAC:illa Co²⁺-hartsilla, ja puskuri on vaihdettu 1xPBS puskuriin. Nämä tarttuvat kuopan pinnalle tiukasti kiinni. Analyyttiin tarttuu sitten vasta-aine. Kuoppalevyjen tulee olla immunotestauksiin tarkoitettuja kuoppalevyjä, kuten esimerkiksi Nuncin Maxisorb Immunolevyt. Kuoppalevyssä on 96 kaivoa. Ne on merkitty vasemmalta oikealla numeroin 1–12 ja ylhäältä alas kirjaimin A–B.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- Mustia ja läpinäkyviä kuoppalevyjä (3 + 3 = 6 kpl)
- Mäntäpipetti
- Monikanavapipetti
- Kärkiä
- Tasoravistaja
- Kuoppalevytarroja

LIUOKSET JA REAGENSIT

- Koplausepuskuri, 0,1 M bikarbonaattipuskuri pH 9.6
- Koutattava analyytti: X76 (2mg/ml)

TYÖN VAIHEET

1. Ota mustia ja valkoisia levyjä. Jokaista pitoisuutta (nano-, femto- ja pikogramma) kohti tulee yksi musta ja yksi läpinäkyvä levy. Koko levy koutataan.
2. Seuraavalla sivulla on ohjeet laimennoksien tekoon. Taulukosta näkee mitä mihinkin kaivoon on pipetoitu.
3. Jokaiseen kaivoon tulee siis 100 µl yhteensä näytelaimennosta ja koplausepuskuria.
4. Laske tarvittavien laimennosten määrät (tilavuudet).
5. Pipetoi näytteet.
6. Liimaa tarra päälle.
7. Laita levyt huoneenlämpöiseen ravistajaan 10 minuutiksi.
8. Vie levyt kylmiöön ravistajaan yön yli.
9. Aamulla levyt voidaan käyttää tai siirtää pakastimeen.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.6

VASTA-AINEEN PUHDISTUS IMAC-PUHDISTUKSELLA

TYÖN TAUSTAA

IMAC-puhdistus perustuu affiniteettikromatografiaan, jossa vasta-aineet tunnistavat ja sitoutuvat spesifisesti antigeeniinsä. Pylvääseen pakataan kantaja-aine, johon on sidottu antigeeni. Kun pylvään läpi ajetaan vasta-ainetta sisältävää mediumia, vasta-aine sitoutuu antigeeniinsä. Vasta-aine saadaan eluoitua ulos vaihtamalla ajopuskurin happamuutta, ionivahvuutta tai puskurikoostumusta.

LIUOKSET JA REAGENSIT

- **2xBinding puskuri, pH 7,4**
 - 20 mM HEPES-0,4M NaCl-2mM Imidazole-20% glyseroli, pH 7,4
 - Valmista steriileistä kantaliuoksista seuraavasti (1 litraa kohti):

deion. H ₂ O	500 ml
1 M HEPES	20 ml
4M NaCl	100 ml
500 mM imidazole	4 ml
87 % glyseroli	230 ml

 Tarkista ja säädä pH 7,4 ja täytä tilavuus litraksi deion. vedellä.
- **2xPeruspuskuri, pH 7,4**
 - 20 mM HEPES-2M NaCl-20% glyseroli, pH 7,4
 - Valmista steriileistä kantaliuoksista ja jauheista seuraavasti (1 litraa kohti)

deion. vesi	500 ml
1M HEPES	20 ml
NaCl	100 ml
87 % glyseroli	230 ml

 Tarkista ja säädä pH 7,4. Täytä tilavuus litraksi deion. vedellä.
- **Pesupuskurit: pesu 1, pesu 10 ja pesu 20, pH 7,4**
 - Laimenna 2xperuspuskurista ja 500mM imidazolesta deion. vedellä.
 - **Pesu 1:** 1 litra
 - 10 mM HEPES-1M NaCl-10% glyseroli-1,25 mM imidazole, pH 7,4

deion. vesi	500 ml
2xperuspuskuria	500 ml
500 mM imidazolea	2,5 ml
 - **Pesu 10:** 250 ml
 - 10 mM HEPES-1M NaCl-10% glyseroli-10mM imidazole, pH 7,4

deion. vesi	120 ml
2xperuspuskuria	125 ml
500 mM imidazolea	5 ml
 - **Pesu20:** 250 ml
 - 10 mM HEPES- 1M NaCl-10% glyseroli- 20 mM imidazole, pH 7,4

deion. vesi	115 ml
2xperuspuskuria	125 ml
500 mM imidazolea	10 ml
- **Eluointipuskurit E50, E75, E100, E200 ja E500, kutakin 50 ml**
 - 10mM HEPES-1M NaCl-10% glyseroli-imidazolea(50mM-500mM), pH 7,4
 - Valmista 2xperuspuskurista ja 500mM imidazolesta tai jauheesta deion. vedellä.
 - **E50**

2xPeruspuskuria	25 ml
500mM imidazolea	5 ml
deion. vesi	20 ml
 - **E75**

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö

Työohje 1.1.6

Oulun Yliopisto

20.9.2011

Laatinut: Ulla Lahtinen

Tarkastanut: Johanna Veijola

- 2xPeruspuskuria 25 ml
- 500mM imidazolea 7,5 ml
- deion. vesi 17,5 ml
- **E100**
 - 2xPeruspuskuria 25 ml
 - 500mM imidazolea 10 ml
 - deion. vesi 15 ml
- **E200**
 - 2xPeruspuskuria 25 ml
 - 500mM imidazolea 20 ml
 - deion. vesi 5 ml
- **E500**
 - 2xPeruspuskuria 25 ml
 - deion. vesi 20 ml
 - + 1,7 g imidazolea joka liuotetaan 50 ml deion. vettä
- SB- tai TB-mediumia
- RV308-soluja
- SOC-liemi
- carbenisilliini 50 mg/ml
- 40 % glukoosi
- betainejauhe
- arginiinijauhe
- 1 M IPTG
- SDS-PAGE-näytepuskuri
- STET-puskuri
- 1xTAE-puskuri

TYÖN VAIHEET

Fab proteiinin tuotto pKK-vektorilla RV308-soluissa SB- tai TB-carb-mediumissa.

Tarvitset: SB- tai TB-mediumia yhteensä 800 ml per tuotettava proteiini

Herätekasvusto

1. Transformoi kompetentteihin RV308-soluihin haluamallasi pKK Fab plasmidilla 14 ml:n putkessa
2. Lisää 1 ml SOC-lientä ja kasvata ensin 1 tunti 37 °C:ssa ravistajassa.
3. Lisää 3 ml SB- tai TB-20 µg/ml carbenisilliini-1%glukoosi -lientä ja kasvata 1 tunti ravistajassa 37 °C:ssa.
4. Siirrä kasvusto 100 ml:n erlenmeyeriin, jossa 20 ml SB- tai TB-50µg/ml carb-2 %glukoosi -lientä ja kasvata yön yli 30 °C:ssa ravistaen.

Nuorennuskasvusto

5. Laimenna y/y kasvustoa siirtämällä koko kasvusto 2 litran erlenmeyeriin, johon lisätään 400 ml tuoretta SB- tai TB-50µg/ml carb-2 %glukoosi-mediumia.
6. Kasvata 3–4 h kunnes A600= noin 4.
7. Fuugaa solut pohjaan huoneenlämmössä 5 minuutin ajan 3000 rpm:ssä.
8. Pidä solut huoneenlämpöisenä.
9. Kaada suppi biojäteastiaan, johon lisää 10 ml 1 % virkon-liuosta.
10. Vaihda soluille uusi medium ILMAN GLUKOOSIA.

Tuottokasvatus

11. Suspensoi solut 300 ml:aan puhtaaseen SB- tai TB-50µg/ml carbenisilliini-liuokseen
12. Lisää 400 mg betaine-jauhetta sekä arginiinijauhe 14 ml:an falconputkesta pulloon.
13. Kasvata 30 °C:ssa tunnin ajan. Kytke sitten lämmitys pois päältä.
14. Lisää 300 µl 1M IPTG pulloon ja kasvata y/y ravistaen 25–26 °C:ssa. Tuottokasvatus saa jatkaa 17–20 tunnin ajan.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.6

Mediumin ja solujen käsittelyt

15. Mittaa seuraavana päivänä kasvusto A600 (tee 1:10 laimennos mediumiin ja käytä mediumia nollana)
16. Ota kasvustosta 2x20 µl:n sekä 2x1 ml:n näytteet eppendorf-putkiin.
17. Lisää 20 µl:n näytteeseen 20 µl 2xSDS-PAGE näytekuskuria ja kuumenna HETI 95 °C:ssa 3 minuutin ajan.
18. Fuugaa 1 ml:n näytteistä solut erilleen (1 min X 13000 rpm). Pakasta solut (S+) ja medium (M+) omiin putkiin -20 °C.
19. Kerää loput solut sentrifugoimalla 10 minuutin ajan 5000 rpm:ssä kylmässä.
20. Ota suppi = **TUOTTOMEDIUM** talteen. Pakasta (-20 °C) se esim. 2x10 ml ja loput pulloon- annoksina ellet jatka suoraan puhdistuksella.
21. Suspensoi solut 30 ml:aan kylmään STET-puskuriin. Inkuboi jäissä 30 minuutin ajan välillä sekoittaen.
22. Fuugaa kylmässä 10 min 6000 rpm.
23. Heitä pesusuppi pois.
24. Suspensoi solut jääkylmään 30 % 1xTAE-puskuriin ja sekoita jäissä 15 min.
25. Fuugaa kylmässä 10 min 6000 rpm.
26. Ota talteen **PERIPLASMINEN PROTEIINIEKSTRAKTI** (n.30–40 ml)
27. Dialysoi 50 mM TRIS-1M NaCl-10mM imidatzolea vastaan, pH 7,0 (MWCO<10 000)
28. Dialyysiletku pitää ennen käyttöä puhdistaa deion. vedessä keittämällä.
29. Jatka IMAC puhdistuksella.

IMAC puhdistus

Pidä proteiininäytteet ja puskurit aina kylmässä. Fuugaa aina pakastetut näytteet 10 min 6000 rpm ennen puhdistuksen aloittamista, koska pakasteessa monet proteiinit saattavat saostua.

DNA:n hajotus:

30. Lisää suppiin (mediumiin tai periplasmiseen ekstraktiin) aina 100 ml kohden 100 µl 1 M MgSO₄ + 0,4 mg DNAasea.
31. Inkuboi 30 min ajan 37 °C:ssa.

Näytteen laimennos:

32. Mittaa näytteen tilavuus ja lisää saman tilavuuden verran 2xPeruspuskuria. Tarkista, että pH on 7,4. Sekoita.
33. Suodata laimennettu näyte lasikuitusuodattimella partikkelien poistamiseksi.
34. Lisää 3 ml PESU1-puskurilla tasapainotettua NI-hartsia per 500 ml näytelaimennosta ja sekoita y/y kylmähuoneessa, esim. muovidekassa magneetilla.

Sitoutuminen ja pesut

35. Siirrä seuraavana päivänä hartsinäytteen avulla pylvääseen.
36. Kerää läpikulunut "sitoutumaton näyte"
 - ➔ Ota 2x20 µl:n näytteet, lisää 20 µl 2xSDS-PAGE-puskuria ja keitä 95 °C:ssa 3 min.
37. Pese pylvästä:
 - Kerää pesufraktiot omaan putkeen ja tee niistä 2x20 µl:n näytteet proteiinigeeliä varten.
 - 80 ml PESU1-puskurilla
 - 10 ml PESU 10-puskurilla
 - 10 ml PESU 20-puskurilla
 - Mittaa pesupuskurista lopuksi A280 käyttämätöntä pesupuskuria vastaan (=nollataan laite). Lukeman pitäisi olla alle 0,02. Muuten jatka pesua vielä 20 ml:lla tai kunnes A280 on alle 0,02.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö

Työohje 1.1.6

Oulun Yliopisto

20.9.2011

Laatinut: Ulla Lahtinen

Tarkastanut: Johanna Veijola

Eluointi

38. Sulje pylväs ja lisää pylvääseen vaiheittain 5 ml:n annoksina eri eluointipuskureita (E50-500) seuraavanlaisesti:
5 ml E50, inkuboi 5 min. Kerää omaan putkeen koko fraktio. Tee 2x20 µl:n PAGE-näytteet.
5 ml E75, inkuboi 5 min. Kerää omaan putkeen koko fraktio. Tee 2x20 µl:n PAGE-näytteet.
5 ml E100, inkuboi 5 min. Kerää omaan putkeen koko fraktio. Tee 2x20 µl:n PAGE-näytteet.
5 ml E200, inkuboi 5 min. Kerää omaan putkeen koko fraktio. Tee 2x20 µl:n PAGE-näytteet.
5 ml E500, inkuboi 5 min. Kerää omaan putkeen koko fraktio. Tee 2x20 µl:n PAGE-näytteet.
Muista pitää eluoidut proteiini fraktiot ja muut näytteet (pesufraktiot) kylmässä.
39. Lisää proteiinifraktioihin AEBSF inhibiittoria suhteessa 1:100 ja sekoita hyvin.
40. Aja fraktioista geeli ja poolaa yhteen parhaimmat fraktiot.
Esim. pesu 10 ja pesu 20 fraktiot= REUNA fraktiot
Sekä eluointifraktiot= huippu

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.7

VASTA-AINEEN KONSENTOINTI

TYÖN TAUSTAA

Tuote eli vasta-aine voidaan jälkikäsitellyssä konsentroida paremman säilyvyyden vuoksi. Konsentroidussa vasta-aineen pitoisuutta nostetaan pienentämällä tilavuutta. Tämä ohje on yksinkertainen, jossa tarvitaan 500K-ultrasuodatuseppendorf-putkia.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- Pylväseppendorf-putkia
- Tavallisia steriloituja eppendorf-putkia
- Sentrifuugi
- Mäntäpipetti
- Kärkiä
- Nanodrop

LIUOKSET JA REAGENSIT

- 1xPBS-AEBSF-puskuri
 - 13 ml:aan 1xPBS lisätään 135 µl AEBSF
- Deion. vesi

TYÖN OSUUS

1. Ota ultrasuodatusseppendorf-putkia ja merkitse niiden kylkeen/ kanteen tiedot näytteistä.
2. Pipetoi yläputkeen suodattimeen noin 100 µl deion. vettä, jotta suodatin kastuu.
3. Sentrifuugaa vesi pois.
4. Jaa näyte 350 µl:n erissä niin moneen putkeen kuin tarvitsee.
5. Fuugaa putkia 5–6 minuutin ajan 13 000 rpm:ssä ja poista saatu liuos omiin puhtaisiin eppareihin talteen.
6. Lisää jokaiseen putkeen 250 µl 1xPBS-AEBSF-puskuria. Fuugaa samoilla lukemilla ja kaada alaputkesta liuos jäteastiaan.
7. Toista 4 kertaa.
8. Lopuksi siirrä samat näytteet yhteen eppendorf-putkeen.
9. Mittaa nanodropilla onko näyte konsentroitunut.

Huomio, että joskus konsentroitava näyte voi olla liian suuri kooltaan ja näin ollen tukkia pylväsepparin suodattimen. Tällöin vaiheet pitää toistaa useammin ja usealla eri pylväällä. Konsentroidut/puskurivaihdetut näytteet voidaan siirtää pakkaseen säilytykseen.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.8

Peroxidase Labeling Kit - NH₂ (LK11-10)

Technical Manual

Peroxidase Labeling Kit-NH₂ is for simple and rapid preparation of peroxidase-labeled IgG in enzyme immunoassays (EIA) and immunoblotting/immunostaining. It can also be used for the preparation of peroxidase-labeled antigen in competitive EIA. NH₂-reactive peroxidase (a component of this kit) has activated ester groups, and can easily make a covalent bond with an amino group of the target molecule without any activation process. If the target is a small molecule, the conjugate can be purified with the filtration tube included in this kit. The filtration tube is also used for sample IgG in removing small molecules such as sodium azide, Tris buffer, and amine compounds that interfere with the assay or labeling reaction. This kit contains all of the necessary reagents for peroxidase labeling, including the storage buffer for conjugates.

- NH₂-reactive peroxidase 100 µg x 3 tubes
- Reaction buffer..... 200 µl x 1 tube
- Filtration tube 3 tubes
- Washing buffer..... 4 ml x 1 bottle
- Storage buffer 4 ml x 1 bottle

Three sample labeling

Sample requirements protein: molecular weight > 50,000; amount: 50-200 µg as IgG
small molecule: molecular weight < 5,000

Store at 0-5 °C. This kit is stable for 6 months at 0-5 °C with protection from moisture.

- 10 µl and 200 µl adjustable pipettes
- Microcentrifuge
- 0.5 ml microtubes
- Incubator (37 °C)



1 Add 100 µl Washing buffer and the sample solution containing 50-200 µg IgG to a Filtration tube.^{a)}



2 Centrifuge at 8,000-10,000 g for 10 min. Add 100 µl Washing buffer and centrifuge once more.^{b)}



3 Add 10 µl Reaction buffer to NH₂-reactive peroxidase and dissolve with pipetting.



4 Transfer the solution containing NH₂-reactive peroxidase onto the membrane of the filtration tube where IgG is concentrated.



5 Rinse the entire surface of the membrane with the solution by pipetting and incubate the tube at 37 °C for 2 hrs.



6 Add 100 µl Washing buffer to the tube. If the volume of the filtrate is 300 µl or more, discard the filtrate prior to go to Step 7.



7 Centrifuge at 8,000-10,000 g for 10 min.^{b)}



8 Add 200 µl Storage buffer and pipette 10 to 15 times to recover the conjugate.^{c)} Transfer the solution to a 0.5 ml tube and store the solution at 0-5 °C.^{d)}

Precaution

IgG or peroxidase-conjugated IgG is always on the filter membrane of the filtration tube during the labeling process. If the IgG solution contains other proteins with molecular weight larger than 10,000, such as BSA or gelatin, purify the IgG solution prior to label peroxidase with this kit. IgG solution can be purified by IgG Purification Kits (not included in this kit). If the IgG solution contains small insoluble materials, centrifuge the solution and use the supernatant for the labeling.

- a) The recommended amount of IgG is 100 µg. The volume of sample solution should be 100 µl or less. If the antibody concentration is lower than 0.5 mg/ml, repeat step 1 and 2 until the total IgG accumulation becomes 50-200 µg. If the volume of the filtrate becomes 400 µl or more during the accumulation process, discard the filtrate prior to going to the next centrifuge step.
- b) If the solution still remains on the membrane after the centrifugation, spin another 5 min or increase the centrifuge speed.
- c) The concentration of the conjugate is 0.5-1.3 mg/ml. Dilute the peroxidase-labeled IgG to prepare a solution with an appropriate concentration prior to using it for enzyme immunoassay, immunoblotting, or immunostaining. One to three molecules of peroxidase should be introduced onto one IgG molecule. Unconjugated peroxidase should not interfere with normal immunoassays. If purification is necessary, use a gel permeation column or an affinity column for IgG.
- d) Generally, the peroxidase-labeled IgG in Storage buffer is stable for at least 2 months at 0-5 °C. For longer storage, add glycerol (final concentration: 50%), aliquot, and store at -20 °C. However, it is important to note that the stability will depend on the sample itself.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.9

ELISA-KUOPPALEVYJEN PESU

TYÖN TAUSTAA

ELISA-kuoppalevyiltä pestään edelliset liuokset pois sekä löyhästi tarttuneet analyytit. On tärkeää varmistaa ennen mittausta että pestyissä kuopissa ei ole ilmakuplia, sillä nämä voivat vääristää tuloksia.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- Mäntäpipetti
- Kärkiä
- Kuoppalevypesuri Biotek ELx50

LIUOKSET JA REAGENSIT

- 10xPBST
- Tween20
- Deion. H₂O

TYÖN VAIHEET

Liuokset

1. Tee 1xPBST pesupuskuria lisäämällä 10XPBST:n 2,5ml Tween20. Ravistele hyvin ja varmista että kaikki Tween20 liuennut. Kaada liuos 5 000 ml:n mittapulloon. Täytä merkkiin asti vedellä. Huomio vaahtoaminen!

Työvaiheet

- Käsinpesu
 1. Poista kuoppalevyistä edellinen liuos pois, joko pipetoimalla tai kaatamalla (jos kaikissa kuopissa samaa)
 2. Pipetoi kuoppiin 250 µl 1xPBST pesupuskuria. Kaada pois.
 3. Toista edellinen vaihe uudestaan kahdesti.
- Pesu Biotek-kuoppalevypesurin pikaohjeella
 1. Tarkista, että
 - a. jätepullo on tyhjä ja korkki tiukasti kiinni,
 - b. pesupuskuria on riittävästi (1xPBST) ja että letku on kiinni oikeassa pullossa.
 2. Käynnistä laite
 3. Poista ensin ilmakuplat/ vaihda letkuihin pesupuskuri ajamalla esihuuhteluohjelma, esim esipesu.
RUN -> PRIME -> ESIPESU (ohjelma 8) ENTER ja START
 4. Elisa levyjen/strippien pesu
 - a. Aseta levy siten, että kaivo A1 on oikealla takana.
 - b. Valitse ohjelma ja paina ENTER
RUN -> WASH -> TH PESU (nro 11, pesee 6 kertaa)

-> TH PESE 2x (nro 12, pesee 2 kertaa)
 - c. Laite kysyy ensin miltä riviltä pesu aloitetaan
 - d. Sen jälkeen pestävien rivien/strippien määrä
 5. Lopuksi:
 - a. Vaihda letku pulloon, jossa dH₂O ja huuhtelee letkut vedellä esim.
RUN -> PRIME -> DAY_RINSE (nro 3)
RUN -> PRIME -> RINSE_AND_SOAK (nro 6)
(Liottaa annosteluharavan vedessä 5 min)
 - b. Tyhjennä ja huuhtelee jätepullo.
 - c. Sammuta laite.

Biolääketieteenlaitos, fysiologian yksikkö
Oulun Yliopisto
Laatinut: Ulla Lahtinen

20.9.2011

Tarkastanut: Johanna Veijola

Työohje 1.1.10

KUOPPALEVYJEN BLOKKAAMINEN

TYÖN TAUSTAA

ELISA-kuoppalevyt ovat ELISA-testeissä käytettyjä testialustoja, joihin tartutetaan tutkittava analyytti, vasta-aine tai sen antigeeni. Ensin levyille koutataan analyytti, minkä jälkeen kuoppien tyhjät paikat blokataan eli suljetaan, jottei diagnostiikassa käytettyjä vasta-aineita/ näytteet tarttuisivat pohjaan vaan analyyttiin.

VÄLINEET JA TARVIKKEET

- Mäntäpipetti
- Kärkiä
- Kuoppalevypesuri Biotek ELx50
- Elisa-lukulaite, Victor3
- Jäteastia

LIUOKSET JA REAGENSIT

- Koplauspuskuri, 0,1 M Bikarbonaattipuskuri
- 1xPBST pesupuskuri
- Blokkauuspuskuri, 1% BSA- 0,2% gelatiini- 0,05% Tween20- 1xPBS
- Tween20
- deion. H₂O

TYÖN OSUUS

Liuokset

1. Tee 1xPBST pesupuskuri pipetoimalla 500 ml:aan 10xPBS 2,5 ml Tween20. Ravista hyvin, jotta kaikki tween liukenisi. Siirrä liuos 5000 ml:an mittapulloon ja täytä deion. vedellä. Huomio vaahtoaminen.
2. Tee blokkauuspuskuri punnitsemalla 2 g gelatiinia autoklaavin kestävään astiaan. Lisää juuri ennen autoklavointia 100 ml 10xPBS ja täytä litraksi vedellä. Autoklavoi. Muista jättää noin ¼ pullon tilavuudesta vajaaksi kiehumisen ja laajenemisen varalta ja korkki löysästi kiinni. Lisää 10 g BSA:ta jäähtyneeseen liuokseen. Steriilisuodata liuos 0,22 µm filtterillä. Lisää lopuksi 500 µl Tween20. Säilytä blokkauuspuskuria + 4°C.

Työvaiheet

1. Poista liuos koutatuista levystä joko käsin pipetoimalla tai kaatamalla liuos levystä (jos kuopissa samaa liuosta).
2. Pese levyt pipetoimalla kuoppiin 250 µl 1xPBST pesupuskuria. Kaada pois. Toista.
3. Blokkau kuoppalevyt pipetoimalla kuoppiin 200µl blokkauuspuskuria ja inkuboi levyjä huoneenlämmössä ravistajassa noin 20 minuuttia.
4. Pese levyt kahdesti 250µl 1xPBST pesupuskurilla.

Levyt ovat valmiita näytteitä varten.

Tuotenumero: 100UL1

VirtuaaliLaboratorio

TUOTETIETOJA

Nimi:	1B10
Pitoisuus:	
Koko:	150 kd
Luokka:	Monoklonaalinen
Tyyppi:	Vasta-aine, IgG1
Klooni:	1B10-G3
Tuottoisäntä:	Hybridooma solulinja (Balb/c hiiri, hiiren lymfoomasolut)
Varastointi:	-20 °C
Koostumus:	1XPBS-50%glyseroli
Puhtaus:	Affiniteettipuhdistus (Protein A-sepharose)

SPESIFISYYS

Vasta-aine 1B10-G3 on spesifinen molekyylille NTproBNP, jota tuottuu elimistöön sydäninfarktin aikana. 1B10.G3 sitoutuu antigeeninsä peptidiketjun aminohappoihin 22-28.

SOVELLUTUKSET

Westernblot 3 µg/ 1ml

Elisa 1:10 000

HERKKYYS

Tuotteen herkkyys antigeenillensä on 77 fmol. (Testattu käyttäen X76-proteiinia, joka on rekombinantti ihmisen NTproBNP₁₋₇₆-proteiini fuusioituna histidiinihännän sisältävään tio-redoksiiniin.)

VIRTUAALILABORATORION LAITELUETTELO

Huone nro F225				
Laite	Toimittaja	Sarjanumero	kom-erä	Hankittu
Elisa-lukulaite, Victor 3-laitteisto (1420 multilabel counter)	Perkin Elmer	427055	91066-1	10.7.2006
Kuoppalevypesuri, Biotek ELx50		217661	44477	
PCR-laite Biometra TPersonal Combi	Biofellows	2910117	93259-1	12.10.2007
PCR-laite N8010177	Perkin Elmer	P17006	24506-1	1.1.1994
Ravistelija, HeildolphTitramax 1000	VWR	110711788	94021-1	8.2.2008
Eppendorf-sentrifugi, Galaxy 16 DH	VWR	R612275	93454-1	13.11.2007
Magneettisekoittaja, CIMARE C2 THERMO SP	Oriola oy	775960584273	35946-1	1.1.1996
Magneettisekoittaja, CIMARE C2 THERMO SP	Oriola oy	775960584255	35945-1	1.1.1996
Lämpöblokki, Analog healtblock	VWR	071025015		
Vortex, malli G-560 E	VWR	2-77894		
Vortex, malli G-560 E	VWR	2-37992		
Pyöröravistelija, Dade, SMI Vortexer S-8215-1X	Oriola oy	762	43971	27.2.1998
Jääkaappi, Rosenlew		numero 42		
Pakastin, arkku, Gram		numero 21		
Pakastin, pysty, Siemens		numero 41		
Pakastin, pysty, Siemens		numero 40		
Konsentrintilaite, Masterflex Cole-Parmer Instrument Company		M10001949		1.9.2011
Monikanavamäntäpipetti, FINNPIPETTE, 5-50 µl	Thermo Scientific			
Monikanavamäntäpipetti, FINNPIPETTE, 30-300 µl	Thermo Electron corporation			
Mäntäpipetti, FINNPIPETTE, 30-300 µl	Thermo Scientific			

Mäntäpipetti, FINNPIPETTE, 5-50 µl Thermo Electron corporation
 Mäntäpipetti, finnpipette, 0,5-10 µl ThermoLabsystems N91335/4500
 Mäntäpipetti, finnpipette, 100-1000 µl ThermoLabsystems S29517/4500

Huone nro F226

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Vaaka, Sartorius handy H51	-	133233	24254	1.1.1994
Vaaka, Sartorius 1212 MP		2705013		

Huone nro F224

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Nestetuikelaskuri, Clinigamma 1272	LKB Wallac	2721435	2508-1	1.1.1992
Nestetuikelaskuri, Multigamma 1260	LKB Wallac	600419	24205-1	1.1.1982

Huone nro F222

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Sentrifugi, Sorvall RC 3B plus		9500826		
Jääkaappi, Rosenlew, Fysiol 92.2		numero 34		

Huone nro F221

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Lämpöravistelijä, IKA RS 4000	IKA	07.139533		
Lämpöravistelijä, Ecotron	Berner	109099	90441	21.4.2006
Lämpökaappi, Termaks B80250	Oriola Oy	990225	56820	29.2.2000
Eppendorf-sentrifugi, Galaxy 16DH		R905087		

Mikrosentrifugi		027461		
Vortex Genie	Scientific industries	10534		
Pystypakastin, Miele	Expert	numero 43	95246-1	14.11.2008
Jääkaappi-pakastin, Rosenlew		numero 22		
Pakastin, arkku, Arctiko ULTF		20111490813		
Mäntäpipetti, BIOHIT Proline 1-5 ml		6040485		
Mäntäpipetti, BIOHIT Proline 5-50 µl		AM36692		
Mäntäpipetti, BIOHIT Proline 0,5-10 µl		AM36253		
Mäntäpipetti, BIOHIT Proline 200-1000 µl		AQ35330		
Mäntäpipetti, BIOHIT Proline 50-200 µl		AM55495		
Mäntäpipetti, BIOHIT Proline 1-5 ml		AM39242		

Huone nro F219

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
		56102657 JN		
Fraktionkerääjä, RediFrac Pharmacia Biotech		007348		
Putkisekoittaja, S/P Multi-Tube Vortexer, Baxter	Oriola Oy	93805	24416	1.1.1991
Sentrifugi, Heraeus Christ Biofuge A		129543		
Vortex, G-560E	VWR	2-40809		
Vortex, G-560E	VWR	2-40899		
Jääkaappi, AEG, fysio laitos 91.13		numero 17		
Pakastin, AEG, fysio laitos 91.12		numero 18		

Huone nro F229 (soluviljely)

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Inkubaattori, Heto Cell House 170 Hi				

Sentrifugi, Heraeus Labofuge 400 E Thermo Scientific

Mikrosentrifugi, Costar

Vesihaude, Julabo U3

Vortex Genie 2, VWR

Jääkaappi-pakastin, Rosenlew

10 MVSS-04628

8022003

13519

1.1.1980

Prolab

2-62608

2524

1.1.1994

numero 26

Huone nro F230 (soluviljely)

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
		090-131.001		
Faasikontrastimikroskooppi, Leica	Leica Nilomark	520802	35958	1.1.1996
Inkubaattori, Forma Scientific, CO2 incubator				
Pumppu, Divac 0,6 L				
Laminaarikaappi				
Magneettisekoittaja, 2Mag magnetic motion, bioMIXdrive 4		H36007		

Huone nro F218 (pimiö)

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Sinivalopöytä, Safe imager, DNA-kvantamislaitte, Lamag Reprostar 2	Finnzymes oy	537102	94401	15.5.2008
Geelikamera, AlphaDigiDocPro	Finnzymes oy	4826201516	94382	13.5.2008

kuuluvat yh-
teen

Huone nro F209B

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Sentrifugi, Sorvall Super Speed RC 2-B	-	72235	2501	1.1.1972
Sentrifugi, Thermo Scientific SL 40 R	Thermo Fisher Scientific oy	40969119	96249	1.6.2009

Jäähilekone, Simag SPR 165	SoloTop	OB 2103 4	87265	9.2.2005
Puhdasvesijärjestelmä SG, Ultra clear TWF UV plus TM	Hyxo oy	095485-01	92025	22.12.2006

Huone nro F209C

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
Spektrofotometri, Gene Quanr, Amersham	Amersham Biosciences	89251	84850	9.1.2004
Spektrofotometri, Nanodrop 2000 Thermo Scientific	Finzymes	2543	97109	24.11.2009
Sentrifugi, Biofuge pico, Heraeus	Instrumed/ Suomi	75003280	35954	1.1.1996
Sekoitin, Sucoagitator				
Hybaid mini 10				

Huone nro F207

Laite	Toimittaja	Sarjanumero	KOM-koodi	Hankittu
pH-mittari, Consort P600, Scientific Instrument	Teopal Oy	49287	67011	13.12.2000
Virtalähde, Biorad Power Pac 300		311BR3583		
Virtalähde, Biorad Power Pac 300		283BR09328		
Virtalähde, Biorad Power Pac basic	Biorad Laboratories	041BR09328	87483	22.2.2005
Agarose ajolaite, Biorad		711BR04154		
SDS-ajolaite, Biorad		36E/0004		
Trans-Blot SD, Semidry transfer cell, Biorad		221BR 40871		
Sekoittaja, Heidolph rotamax 120	VWR	080906486	96988	5.11.2009
Vaaka, Sartorius BP 310 P	Oriola oy	40604715	34864	1.1.1996
Vaaka, Ohaus CS 2000		9-12VDC		