

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2024

Roosa Koli

Laadunvalvontamenetelmän kehitys immunomäärityskuppeihin



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2024 | 52 sivua

Roosa Koli

Laadunvalvontamenetelmän kehitys immunomäärityskuppeihin

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää laadunvalvontamenetelmä, joka mahdollistaa immunomäärityskuppien vasta-ainepinnan homogeenisuuden arvioinnin jo ennen lopputuotteen valmistumista. Opinnäytetyön kohdeyrityksen nykyisissä laadunvalvontakäytännöissä homogeenisuus tarkastetaan vasta koko tuotantoerän valmistuttua, mikä voi viivästyttää mahdollisten poikkeamien havaitsemista. Kehitettävällä menetelmällä olisi mahdollista tunnistaa poikkeamat aiemmin tuotantoprosessissa, parantaen reagointikykyä ja tuotannon sujuvuutta.

Työssä keskityttiin menetelmän optimaalisten parametrien määrittämiseen, jotka mahdollistavat luotettavan arvioinnin vasta-ainepinnan tasalaatuisuudesta. Erilaisissa koeasetelmissa tarkasteltiin useiden muuttujien, kuten inkubointiolosuhteiden ja -aikojen, vaikutuksia. Tulokset osoittavat, että tilavuus, vasta-aineen pitoisuus, ravistelunopeus ja inkubointiaika vaikuttavat merkittävästi signaalin tasaisuuteen, joka on oleellista homogeenisuuden arvioinnissa.

Kehitettävä menetelmä voi tarjota tehokkaan tavan arvioida vasta-ainepinnan homogeenisuutta jo valmistusprosessin varhaisessa vaiheessa. Tämä voisi parantaa tuotannon laatua, varmistaen tuotteiden luotettavan toiminnan ja ennaltaehkäistä mahdollisia laatuongelmia myöhemmissä tuotantovaiheissa.

Asiasanat:

Immunomääritys, vasta-aine, laadunvalvonta, homogeenisuus, kuivakemia

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2024 | 52 pages

Roosa Koli

Development of a Quality Control Method for Immunoassay Cups

The aim of this thesis was to develop a quality control method for enabling the assessment of the homogeneity of the antibody coating in immunoassay cups before the completion of the final product. Currently, in the commissioner's quality control practices, the homogeneity of the cups is only verified after the entire production batch has been completed, which may delay the detection of deviations. The method being developed allows for earlier recognition of deviations in the production process, improving responsiveness and production efficiency.

This study focused on determining the optimal parameters necessary for the reliable assessment of the antibody coating. Various experimental setups were used to examine the effects of several variables, such as incubation conditions and times. The results demonstrate that volume, antibody concentration, shaking speed, and incubation time significantly influence the consistency of the signal, which is essential for assessing homogeneity.

The developed method could provide an effective means of assessing the homogeneity of the antibody coating at an early stage in the production process. This could enhance production quality, ensuring the reliable performance of the products and preventing potential quality issues in later stages of production.

Keywords:

Immunoassay, antibody, quality control, homogeneity, dry chemistry

Sisältö

1 Johdanto	7
2 Laadunvalvonta	9
2.1 Immunomäärityskuppien laadunvalvonta	10
3 Immunomääritys	11
3.1 Vasta-aine	12
3.1.1 Monoklonaalinen vasta-aine	13
3.2 Immunofluorometrinen määrittäminen	13
3.2.1 Europiumkelaatti	14
3.2.2 Aika-erotteinen fluoresenssi	14
3.2.3 Sandwich-tekniikka	15
4 Kuivakupit	17
4.1 Streptavidini	17
4.2 Biotinyloitu vasta-aine	17
4.3 Välikerros ja leima-annostelu	18
4.3.1 Kalibraatiokupit	19
5 Kokeellinen osuus	20
5.1 Menetelmä	20
5.2 Materiaalit	21
5.3 Koeasetelmat	21
6 Tulokset ja pohdinta	26
6.1 Vasta-ainepitoisuus, tilavuus ja ravistelutapa	26
6.2 Reaktiokinematiikka	39
6.3 Inkubointiaikojen vaikutus tulosten tasalaatuisuuteen	41
6.4 Ravistelunopeus	43
6.5 Kuppien esipesu	46
7 Johtopäätökset	48
7.1 Jatkokehitys	49

Kuvat

Kuva 1. Avain-lukkoperiaate (BNO Team, 2024. Muokattu.)	11
Kuva 2. Vasta-aineen rakenne (Koistinen & Stenman, 2014. Muokattu.).....	12
Kuva 3. Stokesin siirtymä (Haney, et al., 2015. Muokattu.).....	15
Kuva 4. Sandwich-tekniikka (Wild, 2013. Muokattu.)	16
Kuva 5. Valmiin testikupin rakenne (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali. Muokattu.).....	18
Kuva 6. Menetelmän prosessikaavio.	20
Kuva 7. Koeasetelma 1: Tasoravistelija (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.....	27
Kuva 8. Koeasetelma 1: Levyinkubaattori (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.....	28
Kuva 9. Koeasetelma 1: Tasoravistelija ja levyinkubaattori (300 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.....	29
Kuva 10. Koeasetelma 1: Tasoravistelija ja levyinkubaattori (150 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.	30
Kuva 11. Koeasetelma 2: 600 rpm (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.	32
Kuva 12. Koeasetelma 2: 0 rpm (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.	32
Kuva 13. Koeasetelma 2: 600 rpm ja 0 rpm (300 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.....	34
Kuva 14. Koeasetelma 2: 600 rpm ja 0 rpm (150 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.....	35
Kuva 15. Koeasetelma 3: Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (933 ng, 600 ng ja 400 ng).	38
Kuva 16. Koeasetelma 4: Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (60 min, 45 min, 30 min ja 10 min).....	40
Kuva 17. Koeasetelma 5: Levyn sisäinen hajonta (30 min).	42

Kuva 18. Koeasetelma 5: Levyn sisäinen hajonta (45 min).	42
Kuva 19. Koeasetelma 6: Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (0 rpm, 400 rpm ja 600 rpm).	44
Kuva 20. Naarmutetun kupin skannaus kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.	45
Kuva 21. Koeasetelma 7: Yksittäisten esipestyjen kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (400 ng ja 150 ng).	47

Kaaviot

Kaavio 1. Koeasetelma 1: Vasta-aineen määrän ja tilavuuden sekä ravistelutavan vaikutus.	26
Kaavio 2. Koeasetelma 2: Vasta-aineen määrän ja tilavuuden sekä ravistelun vaikutus.	31
Kaavio 3. Lämpötilan vaikutus.....	36
Kaavio 4. Koeasetelma 3: Korkeampi vasta-ainemäärä.	37
Kaavio 5. Koeasetelma 4: Reaktiokinematikka.	39
Kaavio 6. Koeasetelma 6: Ravistelunopeuden vaikutus.	43
Kaavio 7. Koeasetelma 7: Esipesun vaikutus.....	46

Taulukot

Taulukko 1. Koeasetelmien 1 ja 2 levyjen rakenne.	22
Taulukko 2. Koeasetelmien 1 ja 2 muuttujat.	23

1 Johdanto

Immunomääritykset ovat keskeisiä työkaluja lääketieteellisessä diagnostiikassa, sillä niiden avulla voidaan tarkasti analysoida erilaisia analyyteja potilaan verinäytteistä. Nämä testit tarjoavat terveydenhuollon ammattilaisille luotettavaa tietoa, joka tukee kriittisiä hoitopäätöksiä. Opinnäytetyön kohdeyritys on erikoistunut *in vitro* -diagnostiikkatuotteiden valmistukseen, ja sen keskeisenä tavoitteena on kehittää ja valmistaa immunomääritystestejä yrityksen omaan immunoanalyyttolaitteeseen. Tämä opinnäytetyö keskittyy uuden laadunvalvontamenetelmän kehittämiseen, jolla voidaan arvioida immunomäärityskuppien vasta-ainepintojen homogeenisuutta valmistusprosessin aikana.

Laadunvalvonta on keskeinen osa tuotantoprosessia varmistaen tuotteiden tasalaatuisuuden ja turvallisuuden kuluttajille. Kohdeyrityksen nykyinen käytössä oleva laadunvalvontamenetelmä, jossa immunomääritystesteissä käytettävien testikuppien homogeenisuuden arvioiminen suoritetaan vasta koko valmistuserän valmistuttua, asettaa mahdollisia haasteita ja rajoituksia tuotannon tehokkuudelle ja laadunhallinnalle. Kehitettävä uusi laadunvalvontamenetelmä mahdollistaa biotinyloidun monoklonaalisen vasta-aine (bio-mAb) -pinnan homogeenisuuden arvioinnin aiemmassa vaiheessa, jo ennen leima-aineen annostelua. Uuden laadunhallintamenetelmän integrointi valmistusprosessiin varhaisemmassa vaiheessa parantaa reagoitokykyä ja tehokkuutta tuotantoerien laadunhallinnassa sekä voi ennaltaehkäistä mahdollisten laatuongelmien syntymistä myöhemmin tuotantoprosessissa.

Opinnäytetyössä pyrittiin tutkimaan erilaisten parametrien, kuten inkubointiajan, ravistelunopeuden ja leimatun vasta-ainepitoisuuden vaikutusta menetelmän tuloksiin. Näiden parametrien optimoinnilla pyritään kehittämään luotettavaa laadunvalvontamenetelmää. Menetelmän kokeissa käytettiin troponiini I (TnI) -pinnoitettuja irtokaivoja. Mittauksissa hyödynnettiin europium-leimattua sekundaarista vasta-ainetta.

Oikean menetelmän valinnassa oli huomioitava useita tekijöitä, kuten menetelmän tarkkuus ja luotettavuus, nopeus sekä yhteensopivuus bio-mAbin ominaisuuksiin. Tarkoituksena oli löytää menetelmä, joka mahdollistaa homogeenisuuden arvioinnin tarkasti ja luotettavasti sekä mahdollistaa erilaisten poikkeamien havaitsemisen ilman häiritseviä vaikutuksia bio-mAb -pintaan sekä tuottaa tarkat ja luotettavat tulokset.

2 Laadunvalvonta

Laadunvalvonta on keskeinen osa tuotantoprosessia, ja se on integroitu osaksi laadunhallintajärjestelmää, joka kattaa myös laadunvarmistuksen ja jatkuvan parantamisen. Tämä kokonaisvaltainen lähestymistapa varmistaa, että kaikki tuotantovaiheet, alkaen materiaaleista loppukäyttäjälle toimitettaviin tuotteisiin, täyttävät laatuvaatimukset ja -standardit. Laadunvalvonta sisältää järjestelmällistä seuranta, arviontia ja poikkeamien korjaamista. Tämän prosessin tehokkuuteen vaikuttavat tarkastukset, testaukset, prosessien seuranta ja korjaavat toimenpiteet. (Silvestrini & Burke, 2017.)

Laadunvalvonnalla varmistetaan, että tuotteet täyttävät asetetut vaatimukset ja mahdollistaa tuotantoprosessin ongelmien havaitsemisen sekä tarvittavien korjaustoimenpiteiden toteuttamisen.

Laadun ylläpitäminen ja parantaminen edellyttää useiden kansainvälisten ja kansallisten laatustandardien noudattamista, jotka helpottavat organisaatioiden järjestelmien kehittämistä ja yhdenmukaistamista. Vaikka näiden standardien käyttö ei ole pakollista, niiden noudattaminen voi olla ratkaisevaa viranomaisvaatimusten täyttämiseksi ja toiminnan laillisuuden ja turvallisuuden varmistamiseksi. ISO (International Organization for Standardization) kehittää kansainvälisesti tunnettuja ja käytettyjä laatustandardeja eri toimialoille. ISO 13485 on erityisesti lääketieteellisiin laitteisiin, kuten immunomäärityskuppeihin, suunniteltu laatu järjestelmästandardi. Se määrittelee vaatimuksia, jotka auttavat organisaatioita varmistamaan, että tuotteet täyttävät asiakas- ja sääntelyvaatimukset turvallisuuden ja tehokkuuden osalta. (International Organization for Standardization, 2016.)

Laadunvalvonnan tavoitteena on taata johdonmukainen laatu ja luotettavuus, mikä puolestaan parantaa asiakastytyväisyyttä. Se vähentää virheitä, poikkeamia ja kustannuksia, samalla kun se varmistaa sääntöjen ja standardien noudattamisen. Tasalaatuisuus on tärkeä osa laadunvalvontaa, erityisesti lääkinnällisten laitteiden valmistuksessa, jossa pienetkin poikkeamat voivat vaikuttaa tuotteen turvallisuuteen ja tehokkuuteen. (Silvestrini & Burke, 2017.)

Tasalaatuisten tuotteiden tulee täyttää määritellyt laatuvaatimukset ilman merkittäviä keskinäisiä eroja.

2.1 Immunomäärityskuppien laadunvalvonta

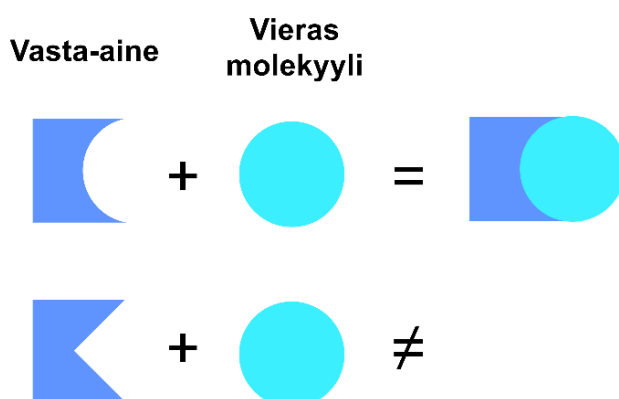
Immunomäärityskuppien valmistuksessa tuotteen homogeenisuus on erityisen tärkeää testitulosten tarkkuuden ja luotettavuuden varmistamiseksi.

Valmistettujen kuppien tulee olla tasalaatuisia, eli kaikkien komponenttien, kuten vasta-ainepinnan ja leima-aineen, koostumus ja jakautuminen ovat yhdenmukaisia kaikissa valmistetuissa yksiköissä. Tämä varmistaa, että testitulokset ovat tarkkoja ja toistettavia, mikä on elintärkeää potilaiden diagnosoinnin ja hoitopäätösten tukemisessa.

Kohdeyrityksen nykyiset laadunvalvontakäytännöt tarkastavat tuotteen homogeenisuuden vasta lopputuotteessa, kun kaikki komponentit, kuten bio-mAb ja leima-aine, ovat jo annosteltu kuppeihin. Tämä voi johtaa siihen, että mahdolliset poikkeamat havaitaan liian myöhään, mikä lisää materiaalihukkaa sekä viivästyksiä. Uuden laadunvalvontamenetelmän tavoitteena on auttaa tunnistamaan poikkeamat aikaisessa vaiheessa, mikä parantaa laadunvalvonnan tehokkuutta ja tuotannon sujuvuutta.

3 Immunomääritys

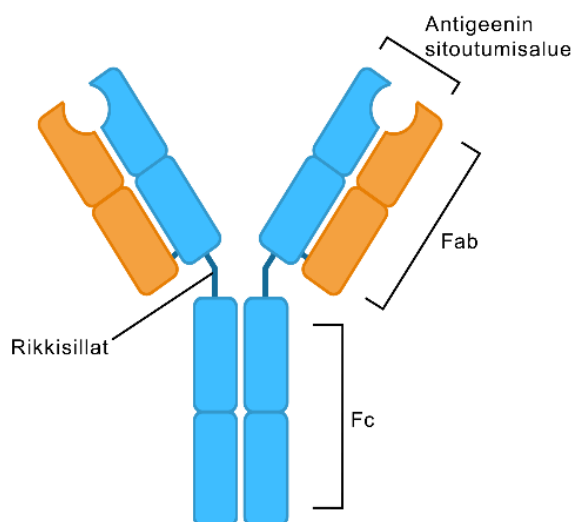
Immunomääritys on biokemiallinen analyysimenetelmä, joka hyödyntää vasta-aineiden kykyä sitoa haluttua analyyttiä kuten antigeeniä näytteestä. Antigeeni on vieras molekyyli, kuten proteiini tai bakteerin osa, joka laukaisee immuunivasteen elimistössä. Esimerkiksi sydänspesifinen troponiini I (TnI) on proteiini, joka toimii määrittämissä antigeeninä ja jota elimistö tuottaa sydänlihassolujen sisällä. TnI:n vapautuminen vereen tapahtuu, kun sydänlihassolut vaurioituvat, kuten sydäninfarktin aikana. Tämä tekee siitä tärkeän merkkiaineen eli biomarkkerin sydänsairauksien diagnosoinnissa. TnI:n korkean sydänspesifisyyden ansiosta sen mittaaminen on yksi tärkeimmistä ja luotettavimmista menetelmistä sydäninfarktin diagnosoinnissa immunomääritysmenetelmillä. Vasta-aineet, eli immunoglobiinit, ovat elimistön tuottamia proteiineja, jotka reagoivat vieraiden molekyylien kanssa immuunijärjestelmässä. Elimistössä niiden tarkoitus on suojata vierailta yhdisteiltä, kuten antigeeneiltä. Vasta-aineet ovat erittäin selektiivisiä, eli ne sitoutuvat vain tarkasti määriteltyihin antigeeneihin. Kun antigeeni sitoutuu vasta-aineessa olevaan sitoutumiskohtaan, jonka se tunnistaa, syntyy spesifinen kompleksi, joka muodostaa analyysin perustan. (Wild, 2013) Vasta-aineiden kykyä muodostaa tämä kompleksi, voidaan kuvata avain-lukko-periaatteella (kuva 1).



Kuva 1. Avain-lukkoperiaate (BNO Team, 2024. Muokattu.).

3.1 Vasta-aine

Vasta-aineiden spesifisyys johtuu niiden rakenteellisista ominaisuuksista. Vasta-ainemolekyylit koostuvat kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta polypeptidiketjusta, jotka ovat kovalenttisesti yhdistyneet rikkisilloilla. Nämä ketjut muodostavat Y-kirjaimen muotoisen rakenteen. Rakenteen alaosa on Fc-alue ja yläosat ovat Fab-alueet. (Kuva 2.) Fab-alueet sisältävät vasta-ainekohtaiset osat, jotka tunnistavat ja sitoutuvat spesifisiin epitoppeihin eli antigeenin tunnistettaviin osiin. (Koistinen & Stenman, 2014.) Alueet vaihtelevat aminohappojen sekvenssistä riippuen, mikä antaa jokaiselle vasta-aineelle ainutlaatuisen sitoutumisprofiilin. Vasta-aineilla on viisi päätyyppiä: IgG, IgD, IgM, IgA ja IgE. IgG on yleisimmin käytetty vasta-ainetyyppi immunodiagnostiikassa sen korkean sitoutumisaffiniteetin ja stabiiliuden vuoksi puhdistusprosessien aikana. (Sztefko, 2011.)



Kuva 2. Vasta-aineen rakenne (Koistinen & Stenman, 2014. Muokattu.).

3.1.1 Monoklonaalinen vasta-aine

Monoklonaaliset vasta-aineet (mAb) ovat kaupallisesti tuotettuja vasta-aineita, jotka pystyvät sitoutumaan tiettyyn antigeeniin. Ne ovat identtisiä keskenään ja tarjoavat korkean spesifisyyden ja affiniteetin immunomäärityksiin. (Sztefko, 2011.) Nämä vasta-aineet tuotetaan hybridoomasoluista, jotka saadaan yhdistämällä haluttua vasta-ainetta tuottavat B-lymfosyytit, jotka ovat eristetty immunoisoidusta koe-eläimestä, myeloomasolujen kanssa. (Rezaei, 2021.)

Monoklonaaliset vasta-aineet eroavat polyklonaalisista vasta-aineista siten, että ne ovat peräisin yhdestä B-lymfosyytistä ja sitoutuvat tarkasti yhteen tiettyyn epitooppiin antigeenissä. Polyklonaaliset vasta-aineet puolestaan muodostuvat useiden eri B-lymfosyyttien tuottamista vasta-aineista, jotka sitoutuvat useisiin eri epitooppeihin samassa antigeenissä. Tämä antaa polyklonaalisille vasta-aineille laajemman peiton eri antigeenimuunnoksille, mutta samalla niiden tuotanto on haastavaa. Koska jokainen polyklonaalinen erä valmistetaan eri immunoisoidusta eläimestä, niiden koostumus vaihtelee, eikä saman erän valmistaminen ole mahdollista. Monoklonaaliset vasta-aineet taas erottuvat erityisesti korkealla tasalaatuisuudellaan ja spesifisyydellään, mikä tekee niistä ihanteellisia kvantitatiivisiin analyyseihin ja prosesseihin, joissa tarvitaan toistettavia tuloksia. (Dornell, 2023.)

3.2 Immunofluorometrinen määrittäminen

Immunomäärityksessä mitataan potilaan verinäytteessä olevan antigeenin sitoutumista testissä käytettävään spesifiseen vasta-aineeseen, mikä mahdollistaa antigeenin määrän tai esiintymisen arvioimisen. Tämä sitoutuminen ei kuitenkaan itsessään tuota suoraan mitattavaa signaalia. Fluoresenssiin perustuvassa immunomäärityksessä käytetään aikaerotteista fluoresenssia, jossa hyödynnetään fluoresoivaa ainetta. (Chiu & Christopoulos, 2021.)

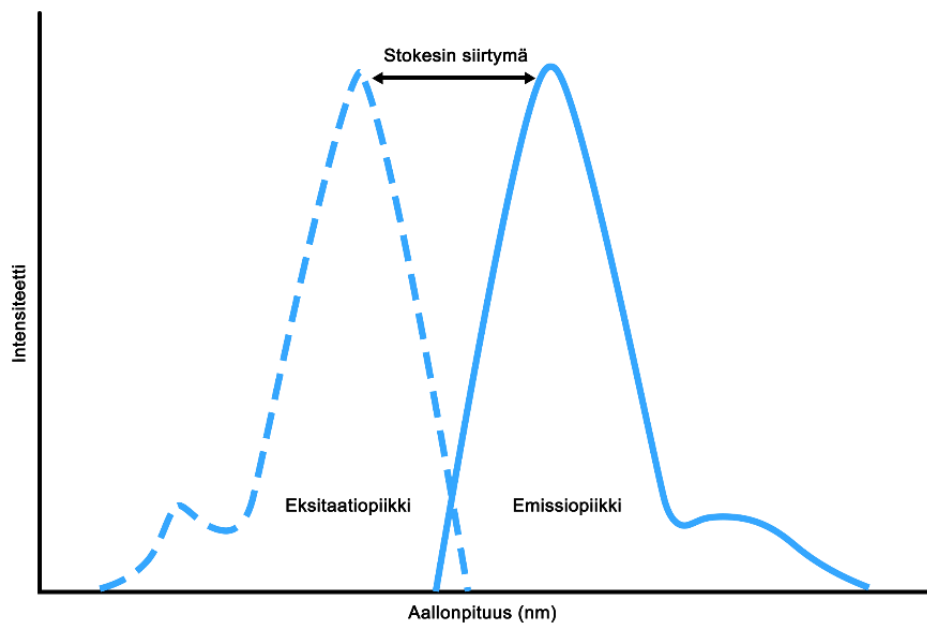
3.2.1 Europiumkelaatti

Lantanoidi-ionit, kuten europium, ovat tunnettuja voimakkaasta ja pitkäkestoisesta fluoresenssisignaalistaan, kun ne yhdistetään kelaattiin. Kun fluorofori, kuten europiumkelaatti, altistuu eksitaatiovalolle, se absorboi energiaa ja emittoi sen takaisin fluoresenssina. Europiumkelaattia käytetään usein leimauksessa immunomäärityksissä sen erinomaisen fluoresenssisignaalin ansiosta, erityisesti yhdistettynä aikaerotteiseen fluoresenssimittaukseen. (Seveus, et al., 1992) (Matsumoto, 2020.)

3.2.2 Aika-erotteinen fluoresenssi

Aikaerotteisella fluoresenssimittauksella tarkoitetaan menetelmää, jossa fluoresenssin emittoitumista mitataan tietyn viiveajan kuluttua eksitaatiosta. Tämä mittaustapa auttaa erottamaan fluoroivan signaalin taustasta ja parantamaan määrityksen herkkyyttä. (Dickson, et al., 1995.)

Europiumin suuri Stokesin siirtymä on merkittävä etu immunomäärityksissä. Stokesin siirtymä tarkoittaa eroa eksitaatio- ja emissioaallojen välillä (kuva 3). Kohdeyrityksen käyttämät laitteet altistavat europiumkelaatin 340 nm aallonpituudelle, jolloin europiumin elektronit virittyvät korkeammalle energiatasolle. Palatessaan perustilaansa ne vapauttavat osan energiasta, jolloin emissioaallonpituus on pienempi kuin eksitaatioaallonpituus. Emissio mitataan 616 nm aallonpituudella, jolloin mitattava signaali erottuu selkeästi eksitaatioalueen valosta. (Kohdeyritys perehdytysmateriaali.)



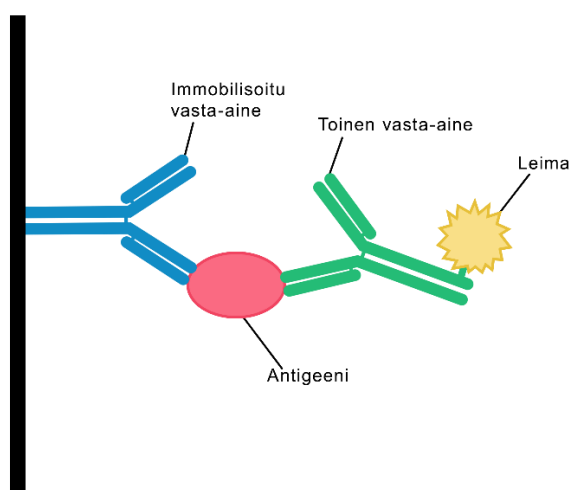
Kuva 3. Stokesin siirtymä (Haney, et al., 2015. Muokattu.).

Tämä siirtymä pidempiin aallonpituuksiin johtuu siitä, että virityksessä absorboitu energia on suurempi kuin purkautumisessa vapautuva energia. Europiumin pitkä fluoresenssin elinikä ja suuri ero eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien välillä tekevät siitä erityisen herkän ja taustasta selvästi erottuvan merkkiaineen, mikä parantaa määrittelyn tarkkuutta ja luotettavuutta. (Haney, et al., 2015.)

3.2.3 Sandwich-tekniikka

Immunomääritykset voidaan yleisesti jakaa kilpaileviin ja ei-kilpaileviin tekniikoihin, joista kohdeyritys hyödyntää jälkimmäistä. Ei-kilpailevassa määrittelyssä voidaan käyttää *sandwich*-tekniikkaa (kuva 4). Tässä tekniikassa käytetään kahta eri vasta-ainetta, jotka molemmat sitoutuvat mitattavaan antigeeniin. Ensimmäinen vasta-aine, eli sitojavasta-aine (engl. *capture antibody*), immobilisoidaan kiinteään pintaan, kun taas toiseen vasta-aineeseen (engl. *detection antibody*) on liitetty fluorofori, jolloin vasta-aineesta tulee leimattu ja se toimii leima-aineena tuottaen signaalia. Leimattu vasta-aine

sitoutuu saman antigeenin eri epitooppeihin kuin ensimmäinen vasta-aine. Näin muodostuu sandwich-asetelma, jossa potilaan verinäytteessä oleva antigeenin määrä on suoraan verrannollinen leima-aineen määrään. (Wild, 2013) (Cox, et al., 2012.)



Kuva 4. Sandwich-tekniikka (Wild, 2013. Muokattu.).

4 Kuivakupit

Kohdeyrityksen käyttämä immunoanalysaattori hyödyntää kuivakuppeja, joiden avulla laite mittaa näytteestä spesifin analyytin pitoisuuden. Kuivakupeissa olevat reagenssit ovat kuivattu kupin pintaan. Valmiita kuppeja, joita käytetään immunomäärityksissä, kutsutaan testikupeiksi.

4.1 Streptavidini

Testikuppien valmistus aloitetaan annostelemalla streptavidiniä sisältävää liuosta 96-irtokaivolevyihin, luoden sen kuppien pohjaan pinnoitteen. Streptavidini (SA) on proteiini, joka on eristetty *Streptomyces avidiini* -bakteerista. Streptavidiinilla on korkea sitoutumisaffiniteetti ja spesifisyys biotiinia kohtaan, ja se on erittäin stabiili. Streptavidini-biotiini-kompleksia hyödynnetään laajasti immunomäärityksissä, sillä biotiini on helppo liittää monenlaisiin molekyyliin. Tämä kompleksi on erityisen stabiili ja vahva, mikä tekee siitä ihanteellisen vasta-aineiden immobilisoinnissa. Kompleksia voidaan käyttää immobilisoimaan halutut molekyylit, kuten vasta-aineet, kiinteään pintaan. Perinteisessä sandwich-tekniikassa vasta-aineen immobilisointi on keskeistä. (Luong & Vashist, 2020) (Ylikotila, 2009.)

Liuoksen annetaan inkuboitua irtokaivolevyissä, jotta SA ehtii sitoutua kuppien sisäpintoihin. Inkubointiajan päätyttyä kupit pestään pesuliuksella ja niihin annostellaan vielä kyllästysliuos, joka estää epäspesifistä sitoutumista. (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.)

4.2 Biotinyloitu vasta-aine

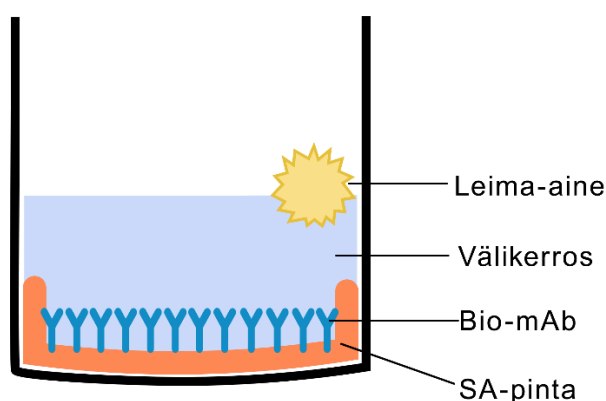
Biotiinin kiinnittymistä molekyyliin, kuten vasta-aineeseen, kutsutaan biotinyloinniksi. Kun vasta-aineeseen on kiinnitetty biotiini, joka kiinnittyy streptavidiniin, saadaan se immobilisoitua kupin pintaan. Biotinyloitua vasta-ainetta (bio-mAb) annostellaan kuppeihin, jossa se sitoutuu SA-pintaan. Bio-

mAbin annetaan inkuboitua tietty ajanjakso, jotta se ehtii sitoutua SA:n kanssa. Inkuboinnin jälkeen kupit pestään pesuliuksella, jotta sitoutumaton ylimääräinen vasta-aine saadaan poistettua ennen välikerroksen lisäystä. (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.)

4.3 Välikerros ja leima-annostelu

Välikerros on liuos, joka suojaa bio-mAbia erottamalla sen leima-aineesta, jotta ne eivät reagoi keskenään ennen varsinaista määrittystä. Välikerroksen koostumus, joka sisältää analyttispesifejä komponentteja, kuten proteiineja ja sokereita, parantaa immunomäärityksen tarkkuutta ja luotettavuutta ja mm. estää potilaan veressä olevia vasta-aineita sitoutumasta testissä käytettäviin vasta-aineisiin, mikä vähentää heterofiilisen interferenssin riskiä. Välikerros myös suojaa bio-mAbia kuivaukselta. (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.)

Kuivauksen jälkeen kuppeihin annostellaan europiumkelaatilla leimattua vasta-ainetta. Leima-ainetta annostellaan tippa kupin reunaan, jotta välikerroksen pinta ei rikkoudu ja jotta testikuppi toimii oikein määrittäksessä. Leima-aine myös kuivataan kuppiin. (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.) Kuvassa 5 on kuvattu valmiin testikupin komponentit.



Kuva 5. Valmiin testikupin rakenne (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali. Muokattu.).

4.3.1 Kalibraatiokupit

Testikuppien lisäksi erän yhteydessä valmistetaan aina myös kalibraatiokupit, joilla varmistetaan analyysituloksien tarkkuus. Koska jokaisen erän ominaisuudet ja asiakkaan käyttämän immunoanalyyttorin fluoresenssisignaalin taso voi vaihdella, voivat erot johtaa vaihtelemaan pitoisuustuloksiin ilman eräkohtaista kalibrointia. Jokaiselle erälle on määritetty kalibraatiokäyrä, jonka asiakas saa viivakoodimuodossa, ja jonka avulla laite voidaan kalibroida. Kalibraatiokuppeja käytetään laitekohtaiseen signaalitason säätöön. Kupissa on tunnettu antigeenipitoisuus, jonka avulla laite sovittaa signaalitason määritettyyn kalibraatiokäyrään. (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.)

Kalibraatiokupit valmistetaan samalla tavalla kuin testikupit välikerrosannosteluun asti. Tavallisen välikerroksen sijaan, kalibraatiokuppeihin annostellaan välikerrosta, jossa on analytikohtaista antigeenia mukana. Kalibraatiokupit kuivataan ja leima-annostellaan samalla tavalla kuin testikupit. (Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.)

5 Kokeellinen osuus

Työssä käytetty menetelmä perustuu leimatun sekundaarisen vasta-aineen käyttöön, joka sitoutuu kupin bio-mAb-pintaan, mikä mahdollistaa signaalin lukemisen. Kehitettävä menetelmä pohjautuu kohdeyhteyksen nykyiseen laadunvalvontamenetelmään, jossa lopputuotteen homogeenisuustestiin käytettävä liuos sisältää analyttikohtaista antigeenia. Kehitettävän menetelmän prosessi on kuvattu kuvassa 6.



Kuva 6. Menetelmän prosessikaavio.

5.1 Menetelmä

Leimattua sekundaarista vasta-ainetta annosteltiin kuppeihin eri tilavuuksissa ja pitoisuuksissa, mikä mahdollisti eri vasta-ainemäärien vaikutuksen tarkastelun. Inkubaatiovaihe oli keskeinen osa menetelmää, jossa testattiin erilaisia parametreja, kuten lämpötilaa, ravistelunopeutta ja inkubointiaikaa. Näiden parametrien vaikutusta vasta-aineen sitoutumiseen ja signaalin voimakkuuteen selvitettiin. Inkuboinnin aikana vasta-aineet saivat sitoutua kuppien vasta-ainepintaan, ja eri muuttujien avulla pyrittiin optimoimaan prosessi siten, että saataisiin mahdollisimman luotettavia tuloksia bio-mAb-pinnan homogeenisuudesta.

Inkuboinnin jälkeen kupit pestiin levypesurilla ylimääräisen leimatun vasta-aineen poistamiseksi, jonka jälkeen ne kuivattiin levykuivaajalla. Kuivauksen jälkeen kuppien annettiin jäähtyä ennen analysointia levylukijoilla, jotka mittasivat saadut signaalit. Sekä pesu- ja kuivausprosessin asetukset pidettiin vakiona kaikissa kokeissa, samoin kuin jäähtymisaika. Tämä mahdollisti sen,

että pesun, kuivauksen ja jäähtymisen vaikutukset eivät aiheuttaisi variaatiota tuloksiin.

Menetelmässä käytettiin kahta eri levylukijaa signaalitason ja signaalijakauman analysoimiseksi kuppien pohjasta. Ensimmäinen lukija mittaisi kuppien signaalin, joilloin saatiin yleiskuva signaalien mahdollisista eroista. Mitattujen kuppien signaalien keskiarvoista laadittiin kaaviot hahmottamaan signaalien mahdollista vaihtelua ja eroja. Toinen levylukija skannasi kupin pohjan signaalijakauman. Tämä lukija mittasi 15 x 15 ruudukon skannattujen kuppien pohjasta. Yksittäisten kuppien skannauksien signaalidatan perusteella muodostettiin kuvaajat, joilla tarkasteltiin signaalijakauman muotoa.

5.2 Materiaalit

Työssä käytettiin TnI-testikuppeja, joihin oli annosteltu bio-mAb sekä välikerros, jonka jälkeen ne olivat kuivattu. Käytettyjen TnI-kuppien välikerroksesta puuttui tiettyjä proteiineja, joiden tehtävänä olisi estää muun kuin antigeenin sitoutuminen, jotta immunomääritys toimisi oikein. Kaikissa koeasetelmissa ei käytetty levyn kaikkia 96 kuppia, jotta materiaalihävikkiä voitiin vähentää.

Antigeenin sijaan bio-mAb-pintaan sitoutui sekundaarinen vasta-aine, joka mahdollisti bio-mAb-pinnan homogeenisuuden tarkastamisen. Sekundaarinen vasta-aine on suunniteltu sitoutumaan spesifisti sitojavasta-aineeseen, eli bio-mAbissa käytettävän vasta-aineeseen. Se on valmistettu eri eläinlajista kuin sitojavasta-aine, ja sen avulla voidaan tunnistaa ja kvantifioida sitojavasta-aineen sitoutumista kupin pintaan. (Hermanson, 2013.) Työssä käytettävä sekundaarinen vasta-aine oli leimattu europiumkelaateilla, jotta sitouduttuaan bio-mAb-pintaan, voitiin tuloksia arvioida aikaerotteisen fluoresenssin avulla.

5.3 Koeasetelmat

Kokeellinen osuus koostui useista koeasetelmista, jotka suunniteltiin tukemaan menetelmän kehitystyötä. Koeasetelmat suunniteltiin siten, että niiden avulla

voitiin arvioida paitsi yksittäisten parametrien vaikutusta, myös näiden parametrien yhteisvaikutuksia homogeenisuuden tarkastelussa.

Vertailtaviksi tilavuuksiksi valittiin 30 μl ja 70 μl . Tilavuus 30 μl riittäisi peittämään testikupin pohjan, kun taas 70 μl mahdollistaisi liuostason ulottumisen paremmin kupin reunoille, jos reunoihin sitoutunut bio-mAb vaikuttaisi tuloksiin. Vertailuasetelmia varten valmistettiin yhteensä neljä samanlaista levyä, jossa oli käytössä levyn kaksi ylimmäistä riviä eli 24 kuppia. Levyjen kupit jaettiin puoliksi siten, että ensimmäisessä rivissä käytettiin 30 μl tilavuutta ja toisessa 70 μl . Kumpikin rivi jaettiin vielä kolmeen osaan eri vasta-ainemäärillä, jolloin voitiin tutkia sekä tilavuuden että sekundaarisen vasta-ainemäärän vaikutuksia. Yhden levyn sisässä suoritettava vertailu säästi aikaa ja materiaaleja samalla varmistaen täysin yhtenäiset olosuhteet kupeille. Eri vasta-ainemääräksi valittiin 400 ng, 300 ng ja 150 ng. Kyseisiä levyjä käytettiin koeasetelmissa 1 ja 2. Levyjen rakenne on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. Koeasetelmien 1 ja 2 levyjen rakenne.

Tilavuus (μl)	Vasta-aineen määrä (ng)
30	400
	300
	150
70	400
	300
	150

Koeasetelmissa tutkittiin myös inkubointilämpötilan ja ravistelunopeuden vaikutusta vasta-ainepitoisuuden ja tilavuuden lisäksi. Koeasetelmassa 1 haluttiin tutkia eri ravistelulaitteiden ja -nopeuksien vaikutusta menetelmän tuloksiin. Ravistelussa käytettiin kahta erilaista laitetta: tasoravistelijaa, joka toimii huoneenlämpötilassa ilman lämpötilan säätömahdollisuutta, sekä

levyinkubaattoria, jossa oli säädettävä inkubointilämpötila ja orbitaalinen ravistelutapa. Tasoravistelu tuottaa edestakaista liikettä, kun taas orbitaalinen ravistelu luo ympyrämäistä liikettä, mikä voi vaikuttaa nesteiden sekoittumiseen ja kupin pintojen altistumiseen eri tavoin. Vertailuasetelmassa käytettiin kahta levyä: Ensimmäistä levyä inkuboitiin tasoravistelijalla *LOW*-nopeudella ja toista levyä levyinkubaattorissa 23 °C:ssa 600 rpm nopeudella. Tasoravistelijan *LOW*-nopeus koettiin vastaavan 600 rpm nopeutta. Kumpaakin levyä inkuboitiin 30 minuuttia.

Koeasetelmassa 2 tutkittiin ravistelun vaikutusta. Vertailuasetelmassa käytettiin kahta levyä, joita kumpaakin inkuboitiin levyinkubaattorissa 30 minuuttia 36 °C:ssa. Ensimmäisen levyn ravistelunopeudeksi valittiin 600 rpm ja toisen levyn ravistelunopeudeksi 0 rpm. Vertailemalla koeasetelmaa 1 ja 2 voitiin myös tutkia lämpötilan vaikutusta eri ravistelunopeuksien ja -tapojen lisäksi. Koeasetelmien 1 ja 2 muuttujat on kuvattu taulukossa 2.

Taulukko 2. Koeasetelmien 1 ja 2 muuttujat.

Koeasetelma 1	Lämpötila (°C)	Ravistelutapa	Ravistelunopeus
Levy 1	Huoneenlämpö	Tasoravistelijä	<i>LOW</i>
Levy 2	23	Orbitaalinen ravistelu	600 rpm
Koeasetelma 2	Lämpötila (°C)	Ravistelutapa	Ravistelunopeus
Levy 1	36	Orbitaalinen ravistelu	600 rpm
Levy 2	36	Orbitaalinen ravistelu	0 rpm

Koeasetelmassa 3 haluttiin tutkia vasta-ainemäärän vaikutusta enemmän. Valmistettiin levy, jonka kaksi riviä, eli 24 kuppia, jaettiin kolmeen osaan, joihin annosteltiin eri pitoisuuksia vasta-ainetta. Vasta-aineen määrät kupeissa oli 400 ng, 600 ng ja 933 ng. Liuostilavuus oli kaikissa 70 µl. 933 ng valikoitui suoraan aiemmissa koeasetelmissä käytetyn lähtökonsentraation (400 ng/30 µl) skaalaamisesta 70 µl:n kokonaistilavuuteen, jolloin välttyttiin ylimääräisiltä

laimennusvaiheilta. Levy inkubointiin levyinkubaattorissa, jonka ravistelunopeus ja lämpötila olivat 600 rpm ja 36 °C. Inkubointiaika oli 30 minuuttia.

Koeasetelmassa 4 tutkittiin inkubointiajan vaikutusta reaktiokinematiikkaan, eli reaktion tehokkuuden muutoksia eri inkubointiaikojen aikana. Inkubointiaikoja testattiin neljällä eri ajalla: 10, 30, 45 ja 60 minuuttia. Vertailuasetelmaa varten valmistettiin jokaiselle ajalle levy, jossa oli kaksi riviä kuppeja ja joihin oli annosteltu sama määrä vasta-ainetta. Vasta-aineen tilavuus oli 30 µl ja määrä kupeissa oli 400 ng. Kaikki levyt inkubointiin käyttäen levyinkubaattoria, ja ravistelunopeus sekä inkubointilämpötila pidettiin vakiona, eli 600 rpm ja 36 °C.

Koeasetelmassa 5 tutkittiin menetelmän johdonmukaisuutta ja inkubointiajan vaikutusta tulosten tasalaatuisuuteen. Valmistettiin kaksi levyä, jonka kaikkiin kuppeihin annosteltiin 30 µl vasta-ainetta ja jokaisen kupin vasta-ainepitoisuus oli 400 ng. Kumpaakin levyä inkubointiin levyinkubaattorissa 36 °C:ssa ja 600 rpm ravistelunopeudella. Toista levyä inkubointiin 30 minuuttia ja toista 45 minuuttia. Tavoitteena oli arvioida, miten inkubointiaika vaikuttaa kuppien välisten signaalierojen suuruuteen, ja voiko pidempi inkubaatioaika vaikuttaa levyn sisäiseen hajontaan.

Kuppien tuottamat signaalit luettiin kummallakin levylukijalla, jotta varmistettiin mittaustulosten toistettavuus ja tarkkuus. Kummankin levylukijan käyttö mahdollisti myös laitekohtaiset vertailut, jolloin voitiin arvioida, onko toisen levylukijan käyttö tarpeen menetelmän vakauden ja johdonmukaisuuden varmistamiseksi tulevaisuudessa. Mikäli yksi levylukija pystyy luotettavasti lukemaan signaalit ja skannaamaan kupit, sen käyttö yksinkertaistaisi menetelmää.

Koeasetelmassa 6 tutkittiin ravistelunopeuden vaikutusta tuloksiin enemmän, kun inkubointiaikaa oli pidennetty. Valmistettiin kolme levyä, joiden 24 kuppiin annosteltiin 30 µl vasta-ainetta, ja kaikkien kuppien pitoisuus oli 400 ng. Levyt inkubointiin levyinkubaattorissa 45 minuuttia 36°C:ssa. Levyille valittiin eri ravistelunopeudet: 0 rpm, 400 rpm ja 600 rpm. Samassa asetelmassa tutkittiin

menetelmän luotettavuutta tekemällä yhteen kuppiin, jota ei ravisteltu (0 rpm), naamu puhtaalla pipetinkärjellä ennen vasta-aineen annostelua.

Koeasetelmassa 7 käytetyt kupit esipestiin ennen annostelua. Esipesun tavoitteena oli liuottaa kupin välikerrosta pois ennen vasta-aineen annostelua. Välikerroksen poistaminen voisi mahdollistaa vasta-aineen paremman sitoutumisen bio-mAbiin, mikäli esipesu ei häiritse tai vaurioita bio-mAb-pintaa. Mikäli esipesu onnistuu, tulevaisuudessa voitaisiin käyttää testikuppeja, joissa on tavallinen välikerros, joka normaalisti voisi haitata määrittystä, jossa hyödynnetään sekundaarista vasta-ainetta.

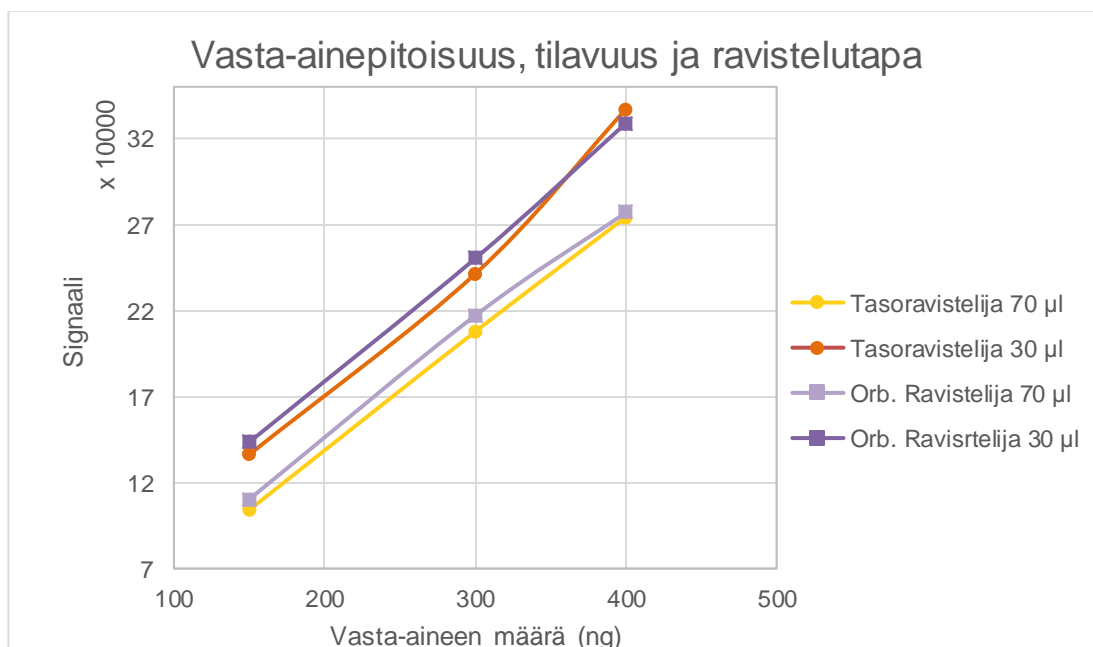
Esipesu suoritettiin annostelemalla 50 µl homogeenisuustesteissä käytettävää AS (assay solution) -liuosta levyn kahteen ensimmäiseen riviin. Levy asetettiin tasoravistelijalle *LOW*-nopeudelle inkuboitumaan noin minuutiksi. Levy pestiin levypesurilla, minkä jälkeen esipesu oli valmis. Asetelmassa käytettiin vain yhtä esipestyä levyä. Levyn kupit jaettiin puoliksi siten, että ensimmäiseen riviin annosteltiin 150 ng ja toiseen riviin 400 ng vasta-ainetta per kuppi. Käytetty tilavuus kaikissa kupeissa oli 30 µl. Levyä inkuboitiin levyinkubaattorissa 45 minuuttia 36°C:ssa ravistelunopeudella 600 rpm.

6 Tulokset ja pohdinta

Opinnäytetyössä tutkittiin koeasetelmien tuloksissa eri tekijöiden, kuten vasta-aineen tilavuuden ja ravistelunopeuden, vaikutusta menetelmän toimivuuteen. Kunkin kokeen tuloksista analysoitiin kuppien signaaleja sekä yksittäisten kuppien signaalijakaumia, ja verrattiin eri parametreja optimaalisimpien tulosten saavuttamiseksi.

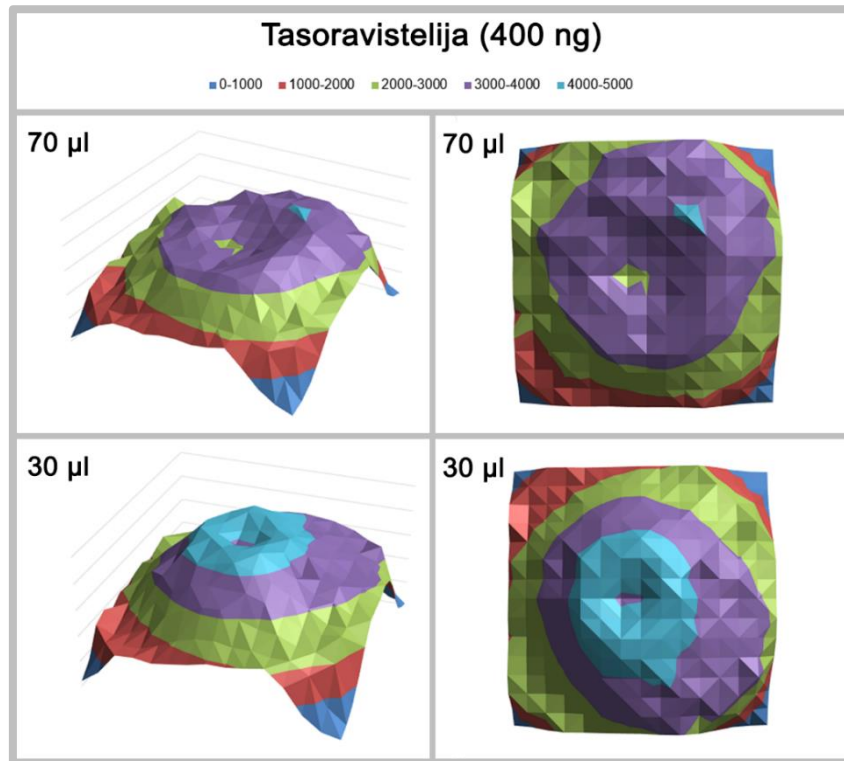
6.1 Vasta-ainepitoisuus, tilavuus ja ravistelutapa

Koeasetelmassa 1 tutkittiin eri vasta-ainemäärien ja tilavuuden sekä tasoravistelijan ja levyinkubaattorin orbitaalisen ravistelun vaikutusta tuloksiin. Levylukijoilla saadut tulokset on kuvattuna kaaviossa 1 ja skannauksista laaditut kuvaajat ovat koottu yhteen kuviin 7-10.

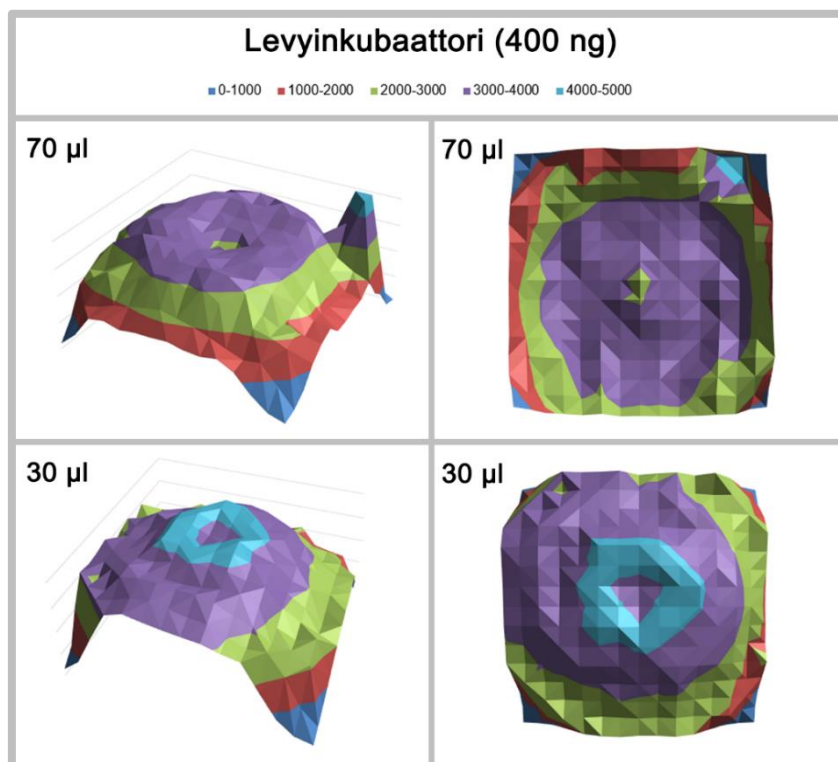


Kaavio 1. Koeasetelma 1: Vasta-aineen määrän ja tilavuuden sekä ravistelutavan vaikutus.

Kaavion 1 perusteella voidaan todeta, että vasta-aineen määrän kasvaessa signaali myös kasvaa melko lineaarisesti. Tasoravistelun ja orbitaalisen ravistelun tuottamat erot ovat hyvin pieniä. Tilavuudella kuitenkin ilmenee vaikuttavampi merkitys. Tilavuudella 30 μl saadaan parempaa signaalia kuin 70 μl tilavuudella kummallakin levyllä.



Kuva 7. Koeasetelma 1: Tasoravistelija (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.



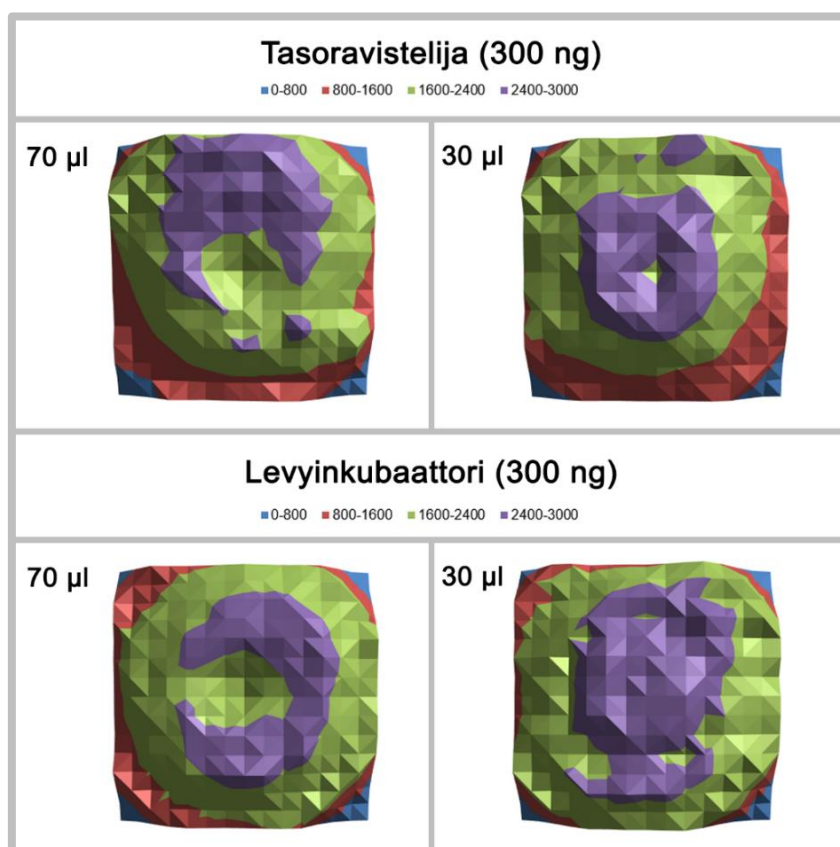
Kuva 8. Koeasetelma 1: Levyinkubaattori (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.

Kuvissa 7 ja 8 kuppien skannauksien perusteella, voidaan vahvistaa että tilavuus 30 µl vaikuttaa signaalin vahvuuteen positiivisesti. Myös kuvissa 9 ja 10 kuvatut kupit, joihin oli annosteltu pienempi pitoisuus vasta-ainetta puoltavat tätä väitettä. Sen lisäksi, että signaali on korkeampi tilaavuuksilla 30 µl, vaikuttaa kuppien signaalijakauman olevan tasaisempi kaikilla pitoisuuksilla. Tasoravistelijan ja levyinkubaattorin orbitaalisen ravistelijan erot ovat skannauksissakin melko pienet, mutta levyinkubaattorilla ravistettujen kuppien skannauksissa ilmenee hieman tasaisempaa signaalia kupin keskellä.

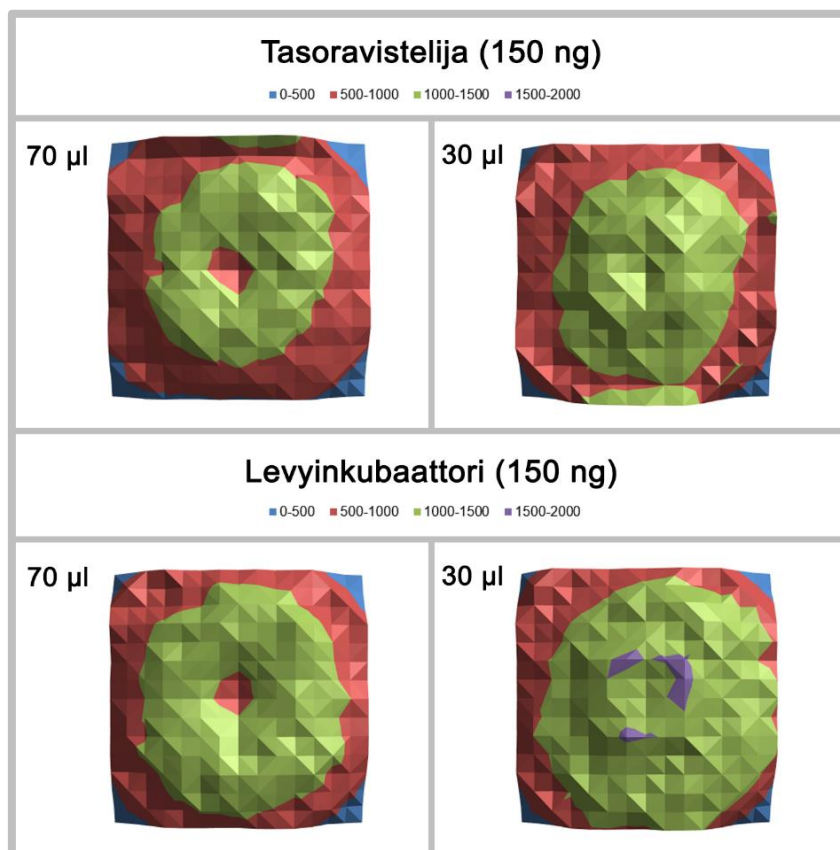
Kokeessa tutkittiin, vaikuttaako liuostason parempi ulottuminen kupin reunoille positiivisesti tuloksiin, kun liuos pääsi kattamaan suuremman pinta-alan kupissa. Suurempi tilavuus kuitenkin heikensi tuloksia, mikä viittaa siihen, että liuoksen korkeampi taso ei vaikuta saadun signaalin määrään. Sen sijaan suurempi tilavuus laimensi reaktiokomponentteja, mikä heikensi sitoutumista ja signaalin intensiteettiä. Suurempi signaalitaso pienemmällä tilavuudella, kuten

30 μ l, johtuu konsentroidummasta vasta-aineen pitoisuudesta. Vasta-ainetta on tilavuuteen nähden enemmän, joten se pääsee paremmin sitoutumaan pohjan bio-mAbin kanssa.

Levyinkubaattorin tuottama hieman tasaisempi tulos skannauksissa voi johtua levyinkubaattorin ominaisuudesta olla lämmitettynä. Levyinkubaattoriin asetettu 23 °C oli hieman lämpimämpi kuin huoneenlämpö, mikä saattoi edesauttaa sitoutumisen tasaisempaa jakautumista. Tasainen lämmittäminen voi myös ennaltaehkäistä liuoksen epätasaista haihtumista vähentämällä paikallista lämpötilanvaihtelua. Pienen eron tuloksissa voi myös aiheuttaa ravistelutapa. Orbitaalinen ravistelu saattaa sekoittaa liuosta tasaisemmin, mikä varmistaa että vasta-aine pääsee paremmin kosketuksiin pohjan bio-mAbin kanssa. Näiden kahden tekijän yhdistelmä, saattaa selittää ravistelutapojen tuloksien pienet erot.

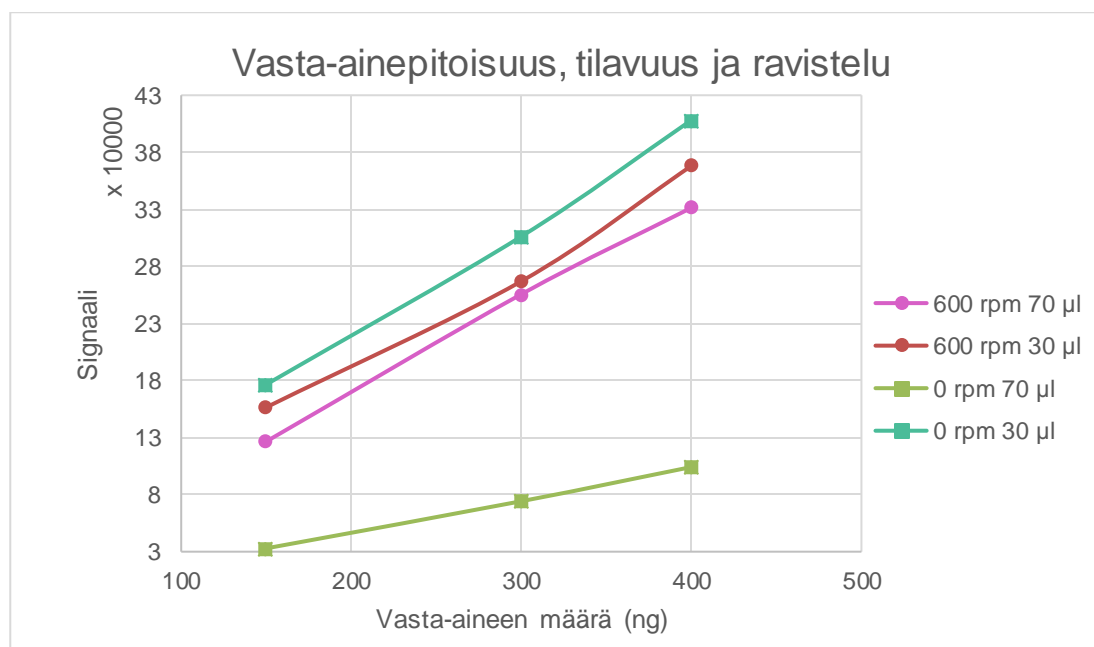


Kuva 9. Koeasetelma 1: Tasoravistelija ja levyinkubaattori (300 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.



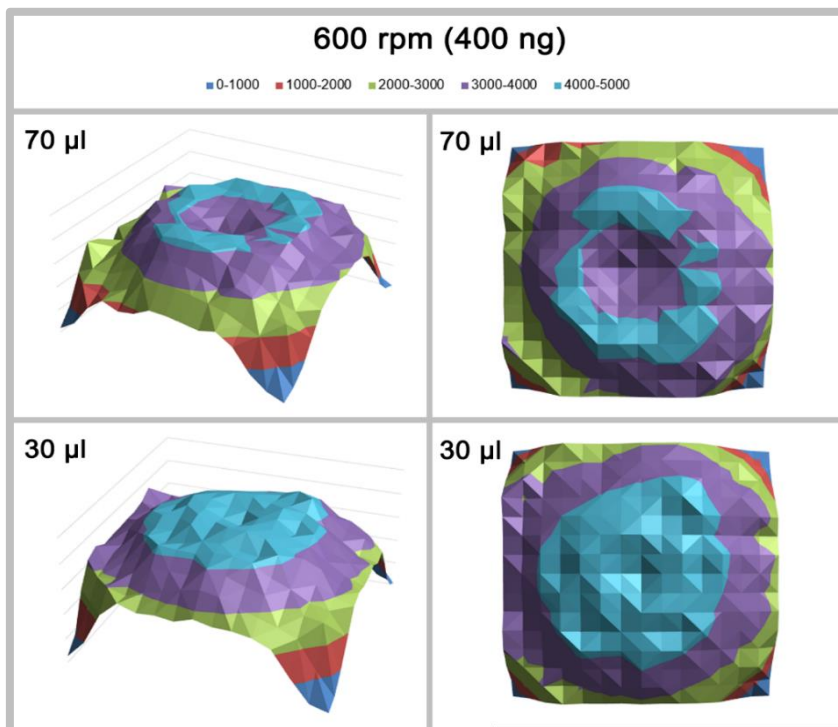
Kuva 10. Koeasetelma 1: Tasoravistelija ja levyinkubaattori (150 ng).
Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.

Koeasetelmassa 2 tutkittiin myös eri vasta-ainemäärien ja tilavuuden sekä ravistelun vaikutusta tuloksiin, kun käytössä oli levyinkubaattori. Levylukijoilla saadut tulokset on kuvattuna kaaviossa 2 ja skannauksista laaditut kuvaajat ovat koottu yhteen kuviin 11-14.

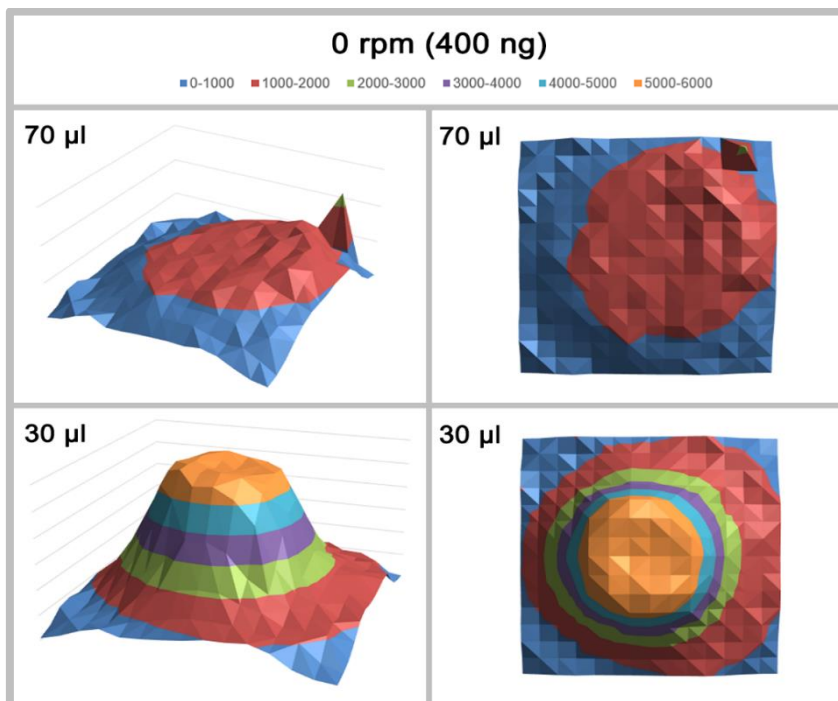


Kaavio 2. Koeasetelma 2: Vasta-aineen määrän ja tilavuuden sekä ravistelun vaikutus.

Kaaviossa 2 ilmenee suuri ero ravistelemattomien kuppien välillä eri tilavuuksissa. Ravistelemattoman levyn signaalitaso tilavuudella 70 µl on huomattavasti heikompi verrattuna tilavuudella 30 µl. Tilavuudella 30 µl ravistelemattomien kuppien signaalitaso vaikuttaa olevan jopa parempi kuin 600 rpm ravisteltujen kuppien signaalitaso samassa tilavuudessa. Ravisteltujen kuppien välinen ero tilavuuksien perusteella vaikuttaa olevan samanlainen kuin koeasetelmassa 1 havaittiin. Kaaviosta 2 voi myös havaita, että ravisteltujen kuppien signaalitasojen suhde tilavuudella 30 µl ei ole yhtä lineaarinen eri pitoisuuksissa kuin muilla kupeilla. Samalla levyllä inkuboidut kupit tilavuudella 70 µl muodostavat kuitenkin lineaarisen suhteen, joten inkuboinnissa ei pitäisi olla tapahtunut virhettä. Pienempi tilavuus saattaa korostaa signaalin vaihtelua ja olla myös herkempi ulkoisille tekijöille. Epätasainen annostelu kuppeihin voi myös selittää tulokset.



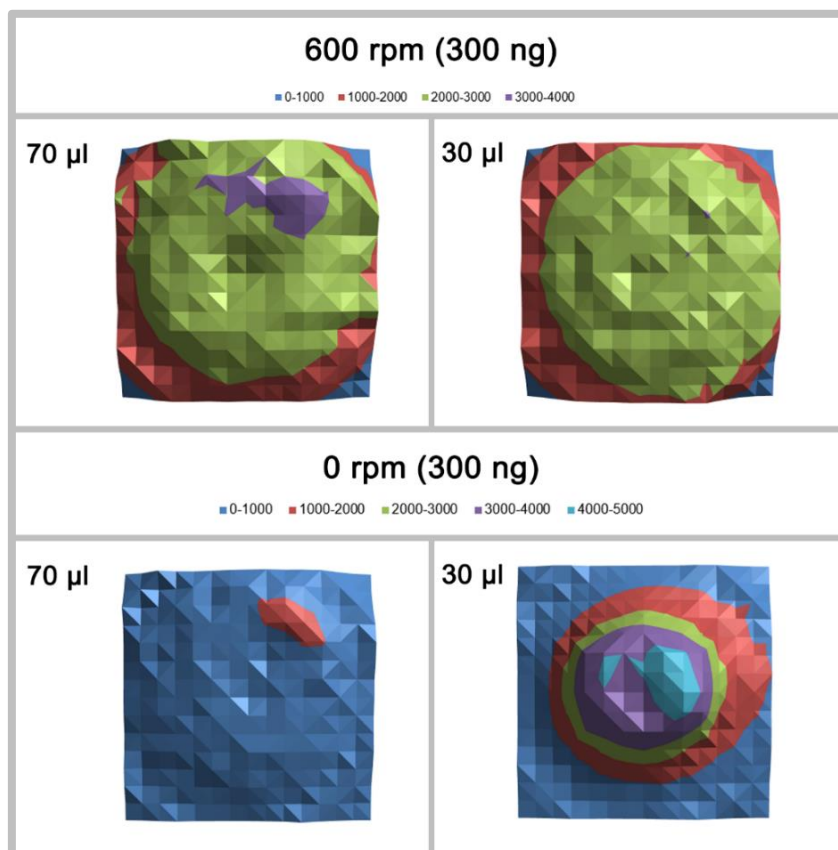
Kuva 11. Koeasetelma 2: 600 rpm (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.



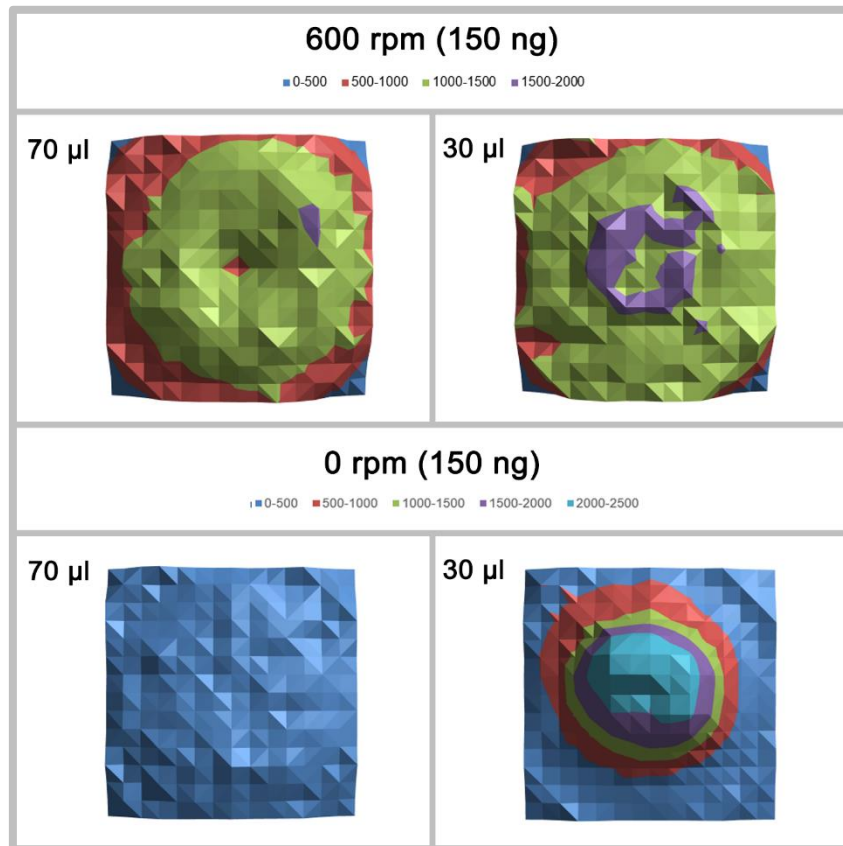
Kuva 12. Koeasetelma 2: 0 rpm (400 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.

Kuten koeasetelmassa 1, myös koeasetelman 2 skannaukset vahvistavat signaalitason olevan vahvempaa ja yleisesti tasaisempaa kupeissa, joihin annosteltu tilavuus oli 30 μl . Skannausten perusteella ravistellussa kupissa, jossa vasta-ainemäärä oli 300 ng ja tilavuus 70 μl , näyttää kuitenkin tuottavan korkeampaa signaalia verrattuna tilavuuteen 30 μl (kuva 13). Koska skannauksissa on tarkastellaan vain yksittäisiä kuppeja eikä kaikkien mitattujen kuppien keskiarvoa, voidaan olettaa että yksittäiset kuppien signaalit voivat poiketa keskiarvosta, ja siksi skannausdata ei välttämättä ole täysin edustavaa. Voidaan kuitenkin pysyä olettamuksessa, että pienempi tilavuus tuottaa parempia tuloksia samoilla vasta-ainemäärillä. Tämä johtuu siitä, että muu kokeellinen data tukee tätä oletusta, ja keskiarvotulokset viittaavat siihen, että 30 μl tilavuus tuottaa yleisesti voimakkaampaa signaalia.

Ravistelemattomissa kupeissa signaali on huomattavasti korkeampi pienemmässä tilavuudessa myös skannausten perusteella. Skannauksessa ravistelemattomissa kupeissa tilavuuksilla 30 μl muodostuu tasainen, lievästi kaareva signaalijakauma, mikä muistuttaa vuorenhuippua. Vasta-aine pääsee sitoutumaan keskelle pohjaa hyvin ilman ravistelua. Ylhäältäpäin kuvattuna skannauksissa kuitenkin näkyy, että vasta-aine ei välttämättä pääse sitoutumaan kupin pohjan reunoja myöten, mikä rajoittaa sitoutumisen tasaisuutta. Levylukija skannaa neliön muotoisen ruudukon, jolloin se kuvaa myös kupin reunoja sen pohjan lisäksi. Vertailemalla ravistelemattomien kuppien ja ravisteltujen kuppien skannausten muotoa, voidaan todeta, että ravisteltujen kuppien skannauksissa kupin pyöreä muoto ja todennäköisesti koko tulevat paremmin esiin. Tämä viittaisi siihen, että ravistelemattomissa kupeissa vasta-aine ei pääse sitoutumaan kupin koko pohjaan. Kun vasta-aine ei pääse jakautumaan tasaisesti kupin pohjan reunoja myöten, on se konsentroidumpaa keskeltä, mikä selittäisi ravistelemattomien kuppien korkean signaalin.

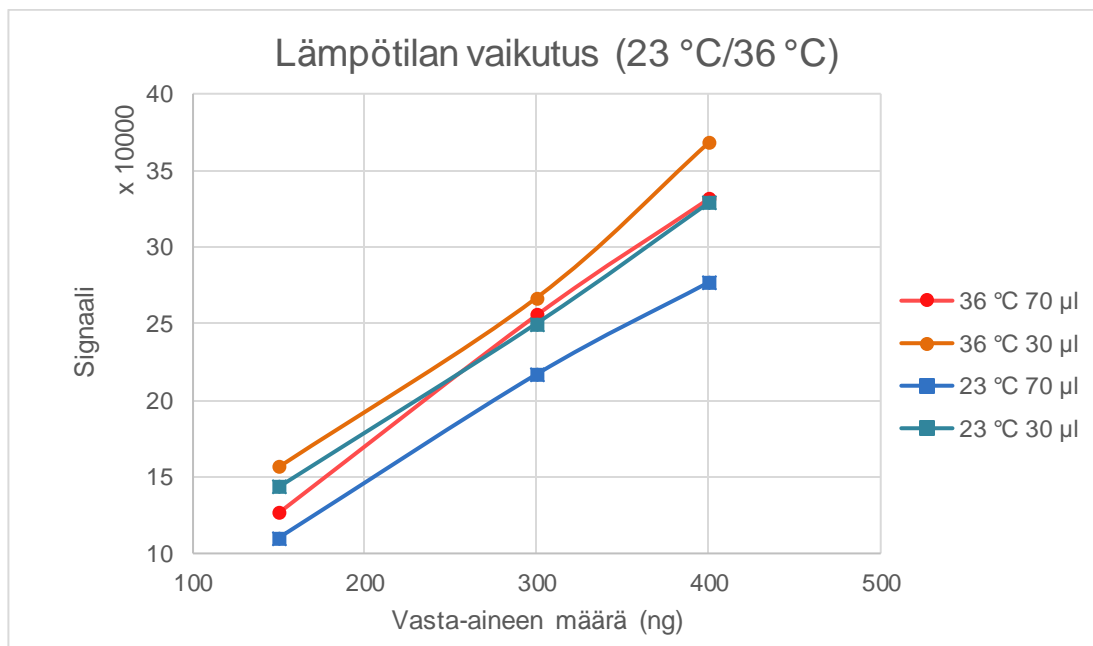


Kuva 13. Koeasetelma 2: 600 rpm ja 0 rpm (300 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.



Kuva 14. Koeasetelma 2: 600 rpm ja 0 rpm (150 ng). Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna ylhäältä.

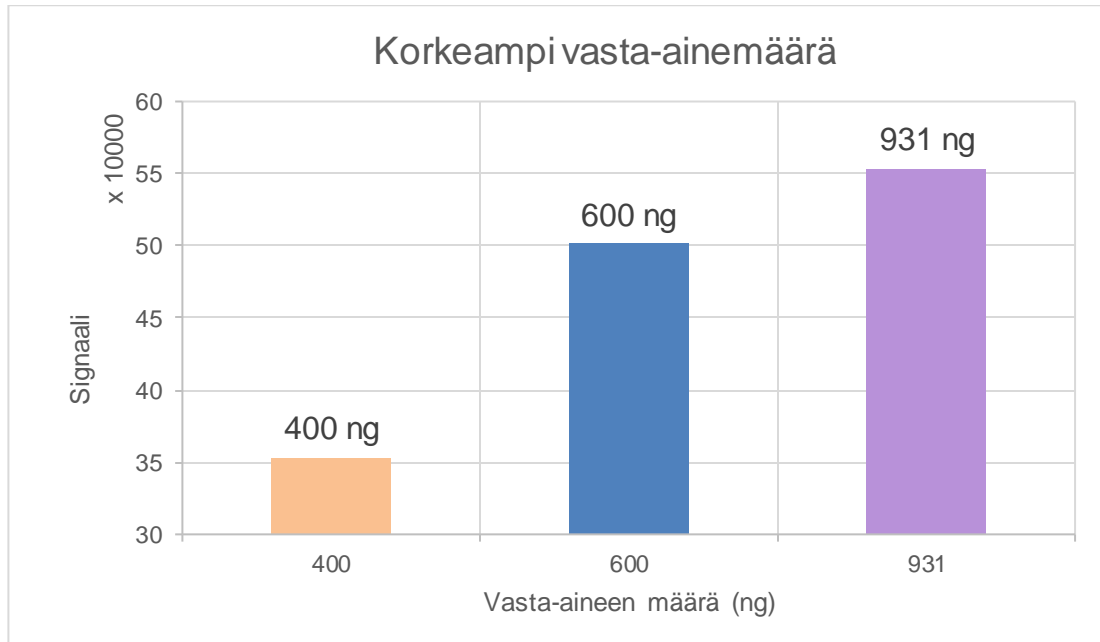
Koeasetelman 1 levyä 2 ja koeasetelman 2 levyä 1 voidaan vertailla, sillä molemmissa kaikki parametrit olivat samat paitsi asetettu lämpötila. Ensimmäisessä oli 23 °C ja toisessa 36 °C. Lämpötilan vaikutusta tuloksiin, voidaan havaita tarkastelemalla kaaviota 3 sekä vertailemalla kuvia 8-10 kuvien 11, 13 ja 14 kanssa.



Kaavio 3. Lämpötilan vaikutus.

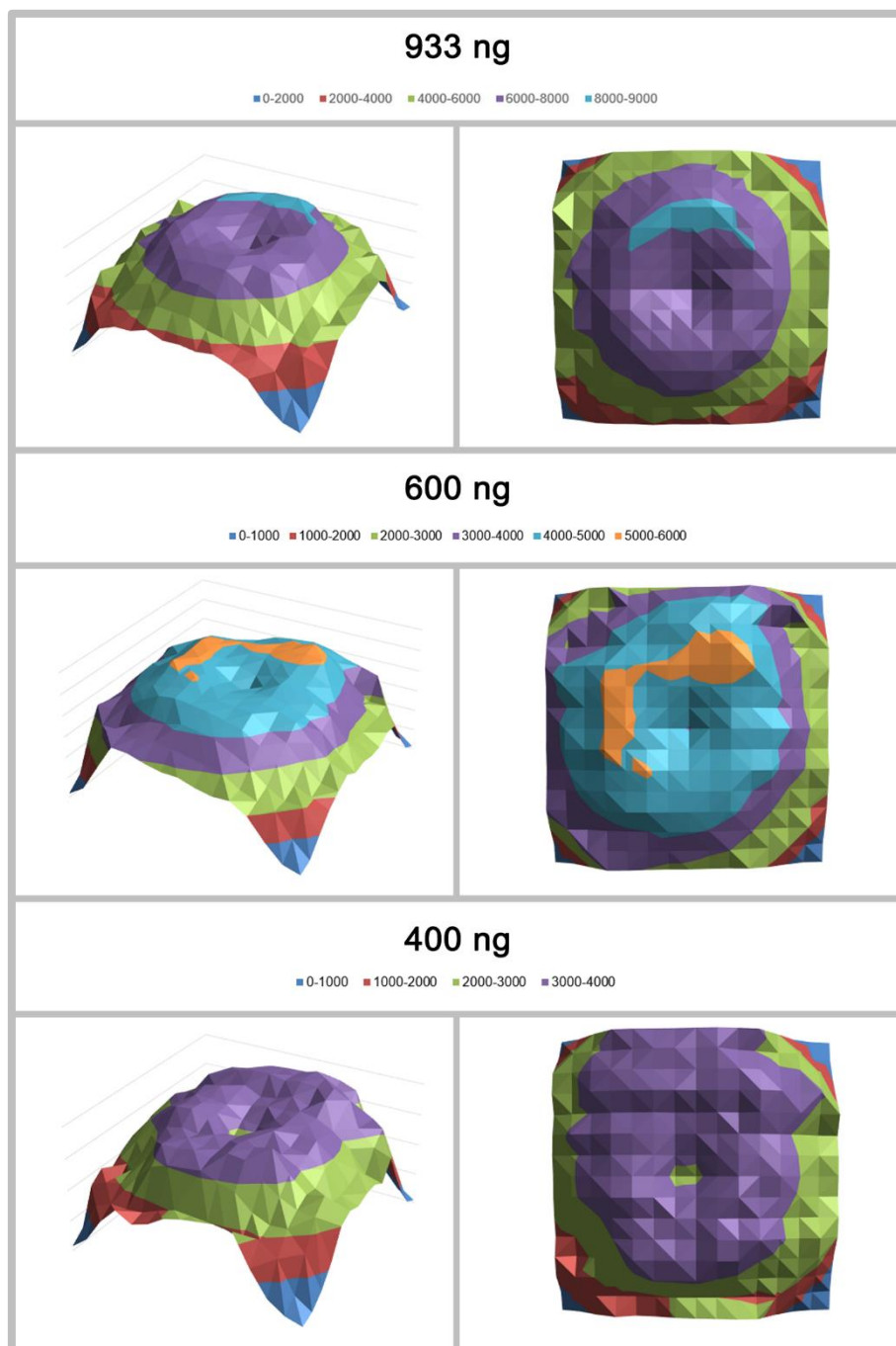
Kaaviosta 3 voidaan havaita, että 36 °C:ssa inkuboidut kupit antavat parempaa signaalia verrattuna 23 °C:ssa inkuboituihin kuppeihin. Vaikka kaaviossa esitetään koeasetelman 2 kuppien data, joka todettiin epätasaiseksi, voidaan todeta että lämpötilan nosto lisää signaalin voimakkuutta. Lämpimämmässä inkuboidut kupit, joiden annosteltu tilavuus oli 70 µl, tuottavat saman tasoista signaalia kuin viileämmässä inkuboidut kupit, joihin oli annosteltu 30 µl. Skannauksia vertailemalla voidaan myös todeta, että vaikka kyseessä on pieniä eroja, vaikuttaa 36 °C:ssa inkuboitujen kuppien signaali olevan tasaisempaa kuin 23 °C:ssa inkuboitujen kuppien, erityisesti kun kyse on pienemmästä tilavuudesta.

Koeasetelmassa 3 tutkittiin, vaikuttaako suurempi annosteltu vasta-ainemäärä tuloksiin. Tulokset ovat esitetty kaaviossa 4, joka havainnollistaa kuppien signaalien vaihtelua eri vasta-ainemäärillä, sekä kuvassa 15, johon on koottu yksittäisten kuppien pohjien skannausten signaalijakaumien kuvaajat.



Kaavio 4. Koeasetelma 3: Korkeampi vasta-ainemäärä.

Kaavion 4 perusteella kuppien signaali kasvaa vasta-ainemäärän lisääntyessä, mutta kasvu alkaa hidastumaan 600 ng:n jälkeen. Signaalin kasvu tarkoittaa, että kupeissa saattaa olla vielä sitoutumatonta bio-mAb-pintaa jäljellä. Tuloksilla voidaan tutkia vasta-ainepinnan saturaatiopisteen merkitystä, eli sitä pistettä, jossa kuppien pinta on sitoutunut maksimaalisesti vasta-aineeseen eikä lisäännos enää merkittävästi lisää sitoutumista tai paranna signaalitasoa. Liian suuren vasta-ainemäärän käyttö voi johtaa materiaalien hukkaan ilman, että signaalitaso nousee merkittävästi. Tarkempia havaintoja varten on vertailtava myös skannauksia kuppien signaalijakaumasta.



Kuva 15. Koeasetelma 3: Yksittäisten kupprien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (933 ng, 600 ng ja 400 ng).

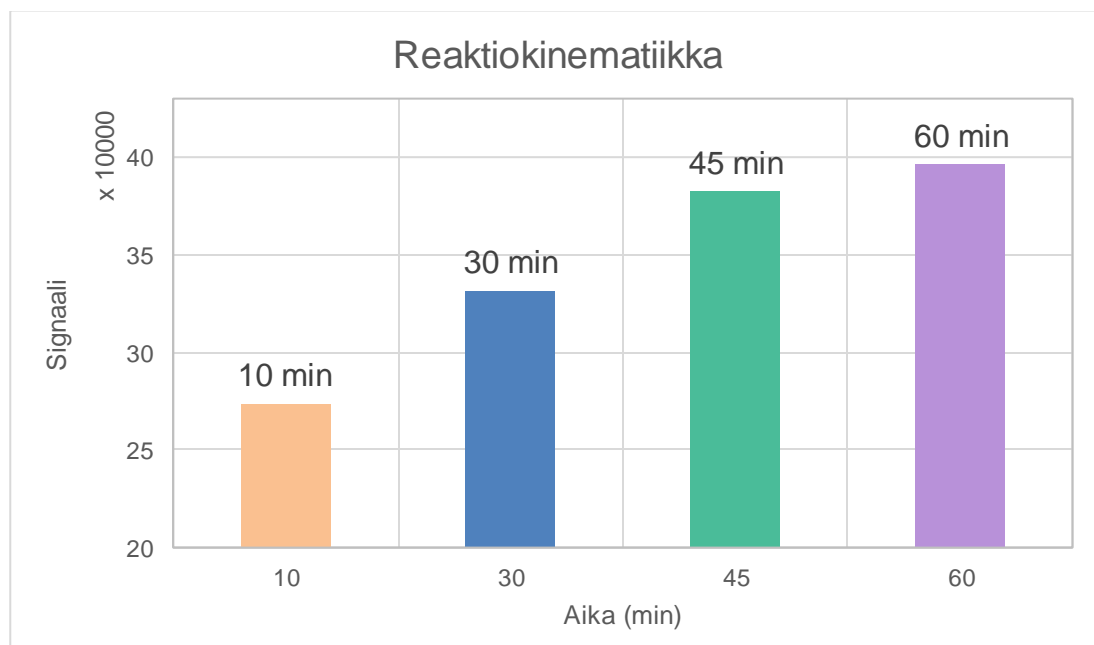
Skannaukset näyttävät muodoltaan hyvin samankaltaisilta, vaikka signaalitasot poikkeavatkin toisistaan. Tämä viittaa siihen, että pelkästään signaalin perusteella ei voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä menetelmän onnistumisesta tai bio-mAb-pinnan mahdollisesta homogeenisuudesta. Jos

pienemmillä vasta-ainemäärillä saadaan hyviä tuloksia, se olisi hyödyllistä, sillä optimaalinen vasta-ainemäärä voisi vähentää resurssien käyttöä ja samalla säilyttää menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden.

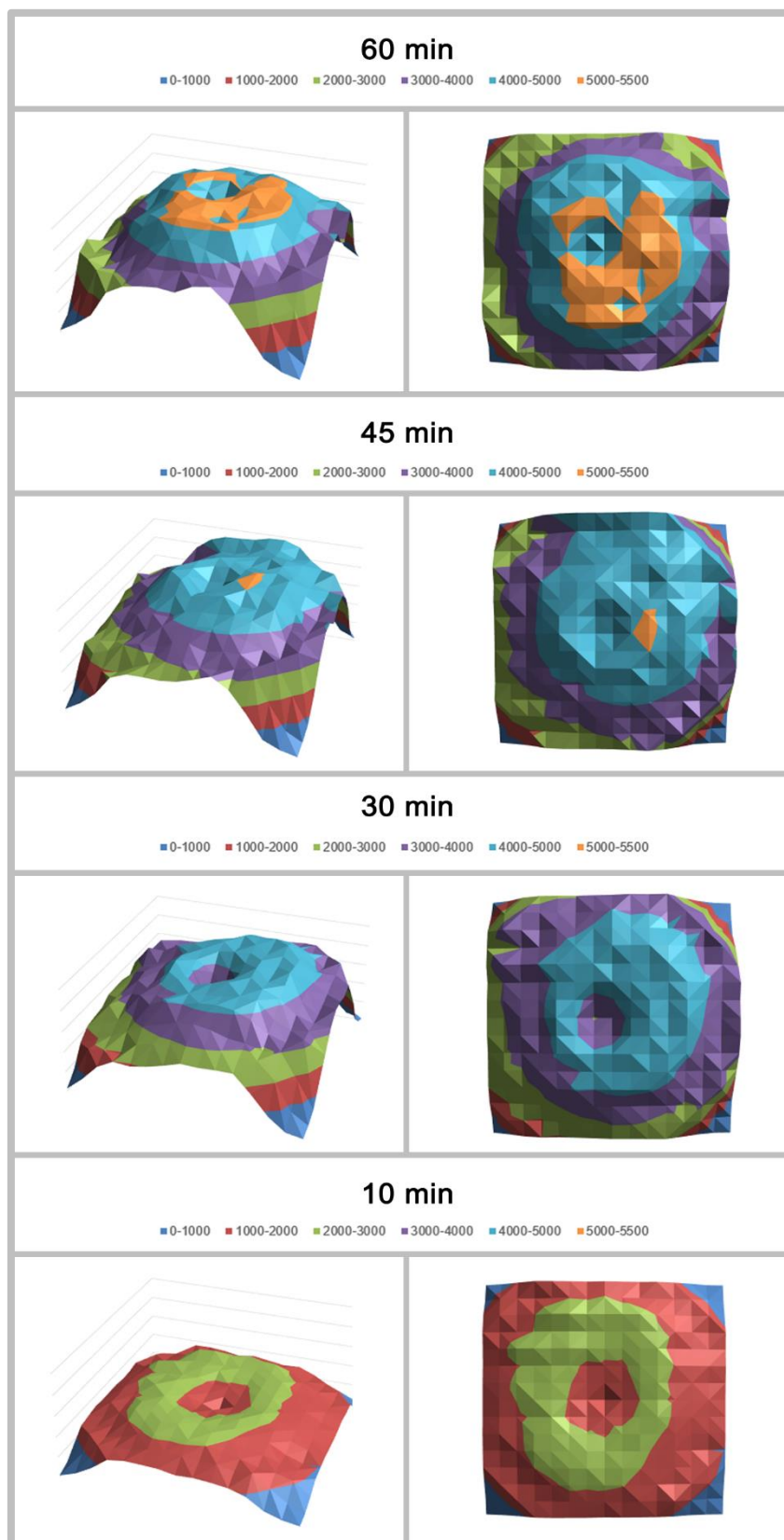
Kaikissa skannauksissa näkyy pientä laskua muodon keskiosassa, erityisesti 400 ng kupin skannauksessa. Tämä voi johtua ravistelusta, jos liuos ei ole päässyt jakautumaan tasaisesti, eikä keskiosa ole saanut tarpeeksi liuosta. Lisäksi kupit ovat myös mahdollisesti reagoineet ilman kanssa, mikä on voinut kuluttaa bio-mAb-pintaa keskeltä. Signaalia saadaan kuitenkin kupin keskiosasta, myös 400 ng kupin tapauksessa, mikä tarkoittaa, että vasta-aine on päässyt sitoutumaan pohjaan.

6.2 Reaktiokinematiikka

Koeasetelmassa 4 tutkittiin eri inkubointiaikojen vaikutusta reaktion tehokkuuteen. Tulokset ovat havaittavissa kaaviossa 5 sekä kuvassa 16, johon on koottu yhteen yksittäisten kuppien pohjien skannaukset.



Kaavio 5. Koeasetelma 4: Reaktiokinematiikka.



Kuva 16. Koeasetelma 4: Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (60 min, 45 min, 30 min ja 10 min).

Kaavion 5 avulla voidaan havaita, kuinka signaali kasvoi tasaisesti 45 minuuttiin asti, minkä jälkeen sen kasvu hidastui, mikä viittaa reaktiosaturaation saavutettuun pisteeseen. 45 minuuttia inkuboitu levy tuottaa enemmän signaalia kuin 10 tai 30 minuuttia inkuboidut levyt, mutta hieman vähemmän kuin 60 minuuttia inkuboitu levy.

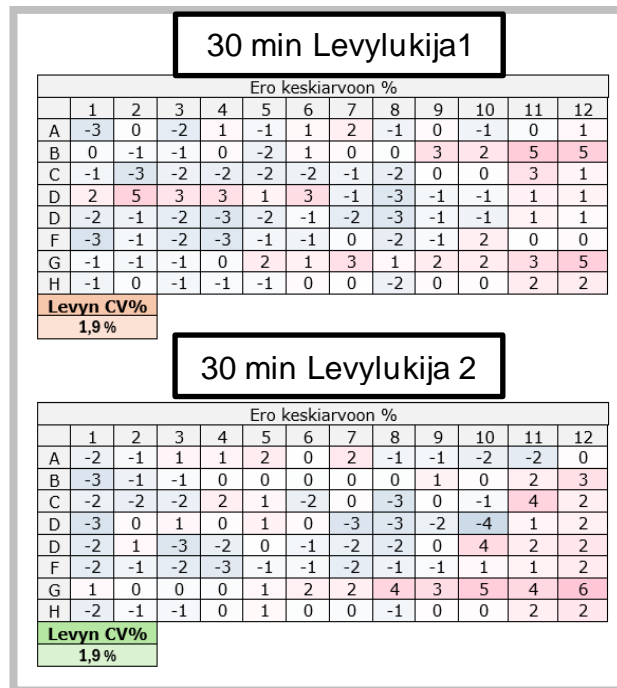
Skannauksien perusteella voidaan todeta, että signaalijakauma tasoittuu inkubointiajan kasvaessa. Pidemmällä inkubointiajalla vasta-aine ehtii sitoutua tehokkaammin bio-mAbiin. 45 minuutin ja 60 minuutin inkuboinnin skannauksien välillä ei kuitenkaan ole merkittävää eroa tasaisuudessa. Signaaleista ja skannauksista saadut tulokset viittaavat, että inkubointiajan pidentäminen parantaa vasta-aineen sitoutumista, mutta 45 minuutin jälkeen vaikutus on vähäinen. Tämä voi osoittaa, että optimaalinen reaktiotehokkuus saavutetaan noin 45 minuutin kohdalla, ja pidempi inkubointiaika ei tuo merkittävää lisähyötyä.

6.3 Inkubointiaikojen vaikutus tulosten tasalaatuisuuteen

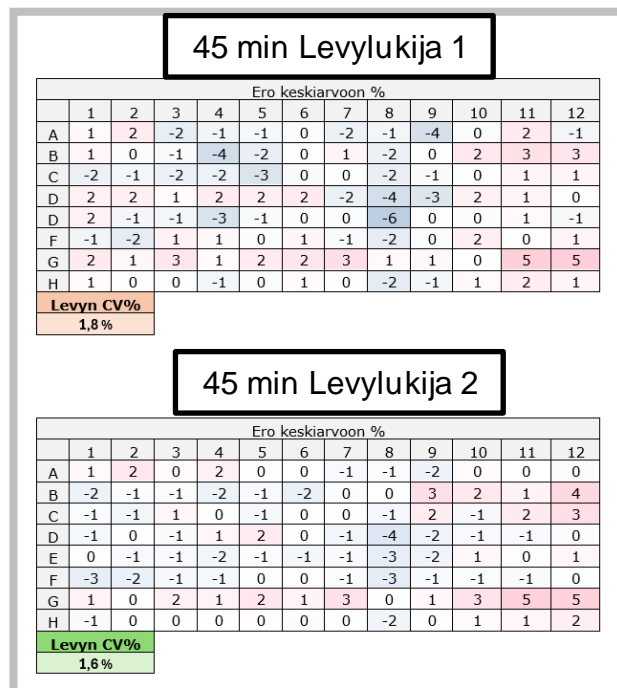
Koeasetelmassa 5 tutkittiin menetelmän johdonmukaisuutta, inkubointiajan vaikutusta tulosten tasalaatuisuuteen, sekä kahden levylukijan mahdollisia eroja.

Tuloksien analysoimisessa keskityttiin kuppikohtaisen signaalieron arviointiin suhteessa levyn keskiarvoon. Signaalierojen kuvaajat molempien levylukijoiden tuloksista on esitetty kuvissa 17 ja 18, joissa näkyvät 30 ja 45 minuutin inkubointiaikojen tulokset. Kummankin levyn kuvat esittävät signaalieroja numeerisesti erona keskiarvoon sekä värikoodattuna, mikä helpottaa signaalin jakautumisen ja mahdollisten poikkeamien tunnistamista. Kuvissa näkyy myös levyjen variaatiokertoimet (CV%), jotka kuvaa signaalin hajontaa koko levyn alueella. Pieni CV%-arvo viittaa tasaisempaan ja tarkempaan signaaliin, kun taas suuri CV%-arvo kertoo suuremmasta hajonnasta ja mahdollisista poikkeamista. Levylukija 1 viittaa levylukijaan, jolla on aiemmin mitattu kuppien

signaalia, ja Levylukija 2 viittaa levylukijaan, jolla on aiemmin vain skannattu kupprien pohja.



Kuva 17. Koeasetelma 5: Levyn sisäinen hajonta (30 min).



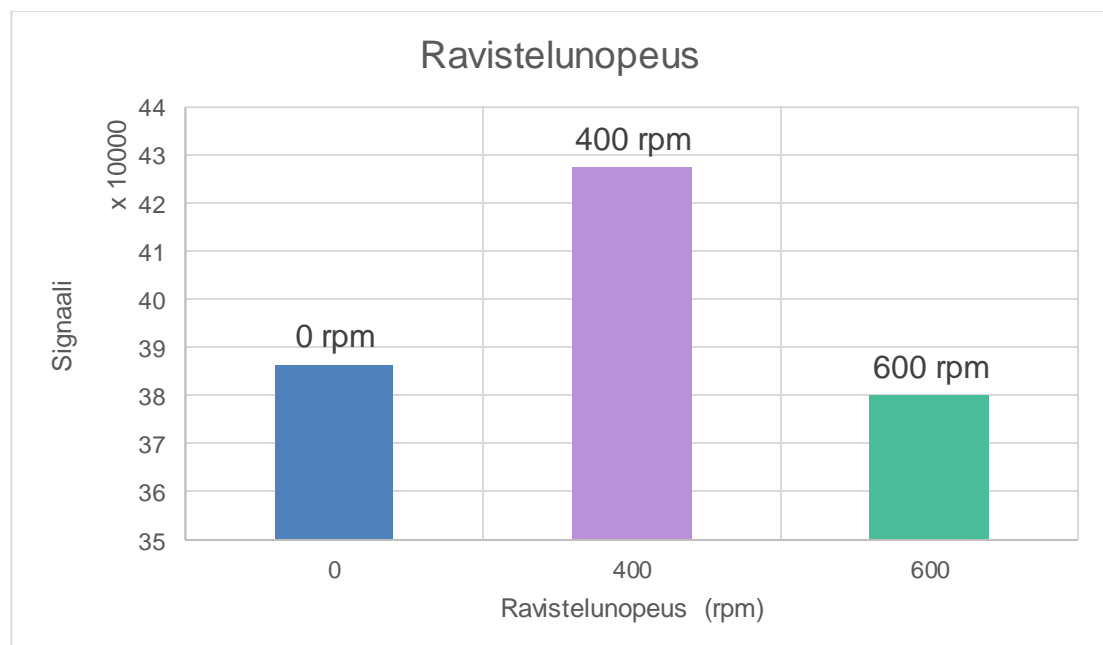
Kuva 18. Koeasetelma 5: Levyn sisäinen hajonta (45 min).

Tuloksista käy ilmi, että inkubointiaika ei vaikuttanut merkittävästi levyn sisäiseen tasalaatuisuuteen tai signaalin hajontaan. Molemmissa tapauksissa signaalin vaihtelu levyn sisällä oli vähäistä, ja CV%-arvot pysyivät alhaisina. 45 minuutin inkubaatiossa CV% oli kuitenkin hieman pienempi verrattuna 30 minuutin inkubaatioon, mikä saattaa osoittaa tasaisempaa signaalin jakautumista. Levylukijoiden välisistä tuloksista ei myöskään nähdä merkittäviä tuloksia, mikä osoittaa, että mittaustulokset olivat toistettavissa kummallakin laitteella.

Kummastakin levystä skannattiin myös 14 yksittäisen kupin pohjaa. Kupit olivat valittu satunnaisesti ympäri levyä. Skannauksista ei ilmennyt merkittäviä eroja kuppien välillä, vaan signaalijakauma näytti yhtä tasaiselta kummankin levyn sisällä, mikä tukee menetelmän johdonmukaisuutta.

6.4 Ravistelunopeus

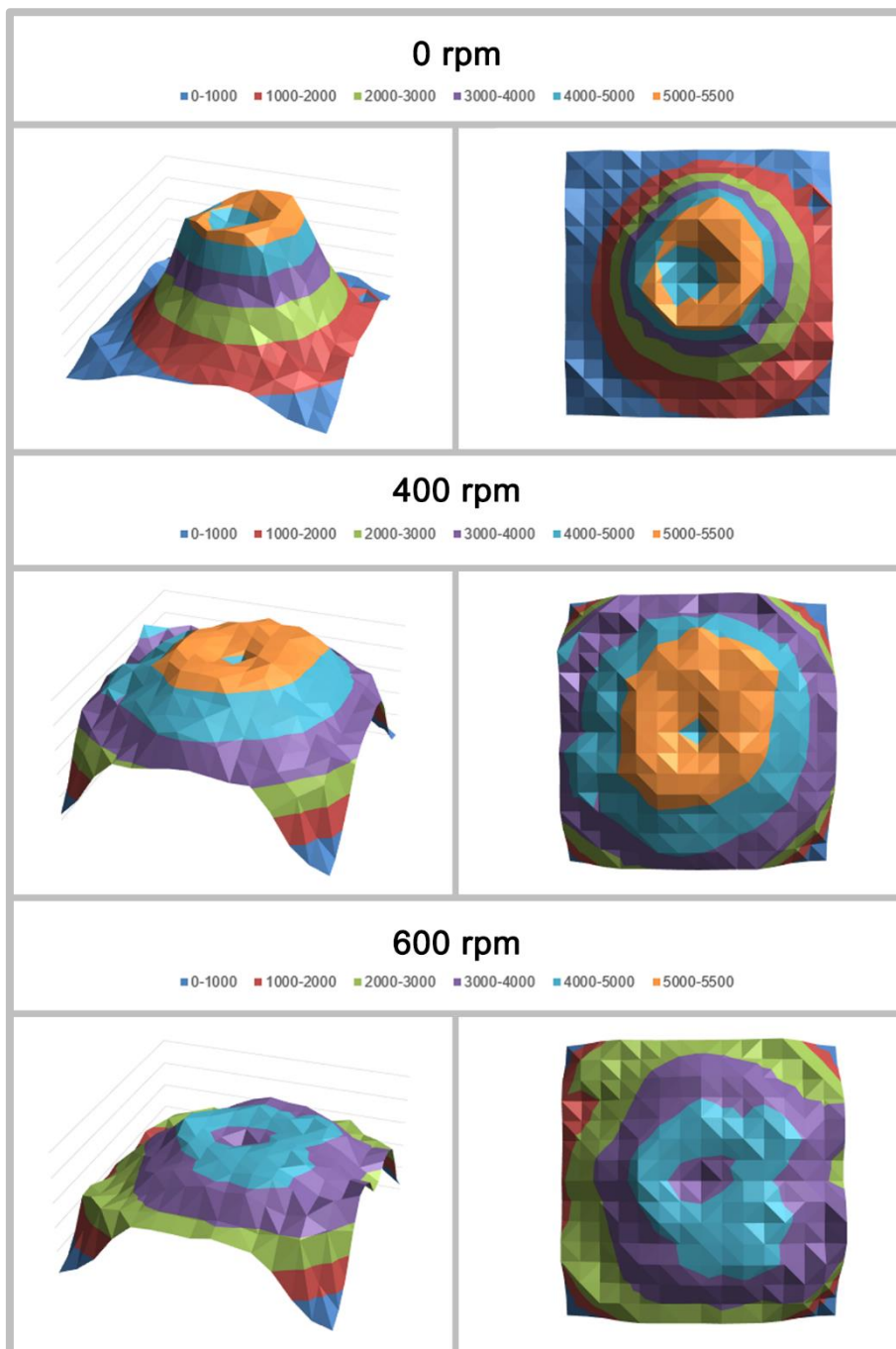
Koeasetelmassa 6 tutkittiin ravistelunopeuden vaikutusta tuloksiin. Tulokset ovat esitetty kaaviossa 6 sekä kuvassa 19, johon on koottu yhteen yksittäisten kuppien pohjien skannaukset.



Kaavio 6. Koeasetelma 6: Ravistelunopeuden vaikutus.

Kaaviosta 6 ilmenee, kuinka signaali on korkeampi 400 rpm ravistelunopeudella kuin 600 rpm ravistelunopeudella tai ravistelemattomuudella.

Ravistelemattomalla levyllä saadaan hieman korkeampaa signaalia verrattuna 600 rpm ravisteltuun, mutta sama ilmiö näkyi myös koeasetelmassa 2.

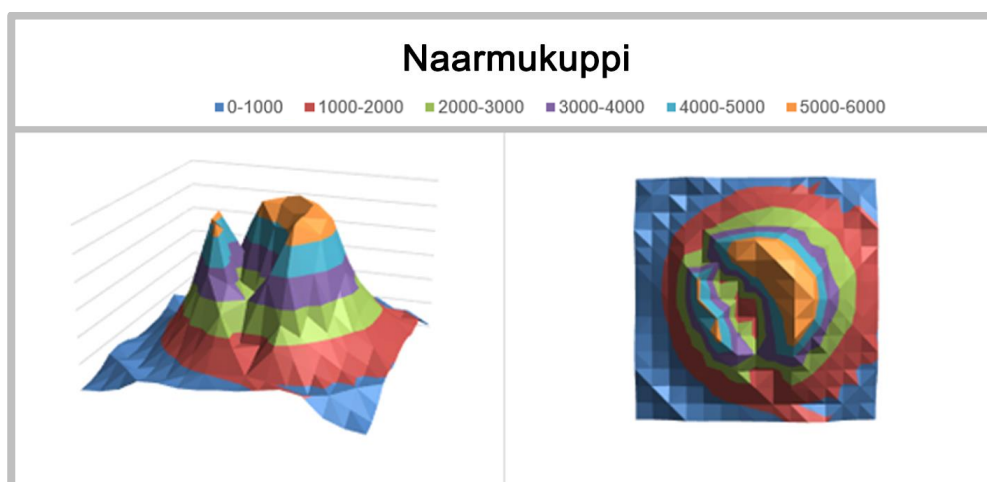


Kuva 19. Koeasetelma 6: Yksittäisten kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (0 rpm, 400 rpm ja 600 rpm).

Kaikissa skannauksissa näkyy jälleen kupin keskellä oleva alue, jossa signaali on matalampi verrattuna ympäröivään alueeseen. Sama ilmiö havaitaan myös ravistelemattomassa kupissa, joten ravistelu ei todennäköisesti ole syynä tähän eroavuuteen. Todennäköisempi selitys siis on kupin vanheneminen, jolloin bio-mAb-pinta on mahdollisesti päässyt kulumaan ilman vaikutuksesta jo ennen vasta-aineen annostelua. Toinen mahdollinen selitys saattaisi olla kupissa oleva roska tai partikkeli, joka voisi kuluttaa vasta-ainetta pois pesun yhteydessä.

Skannauksien perusteella 400 rpm ravisteltu kuppi tuottaa korkeampaa signaalia ja lisäksi melko tasaista signaalijakaumaa. Vaikka ero 600 rpm ravisteltuun kuppiin ei ole merkittävä, havainto voi viitata siihen, että maltillisempi ravistelunopeus voi olla menetelmälle soveltuvampi. Maltillisempi ravistelunopeus vähentää liuoksen liiallista liikettä, joka saattaa aiheuttaa epätasaisasta jakautumista tai jopa bio-mAb-pinnan kulumista.

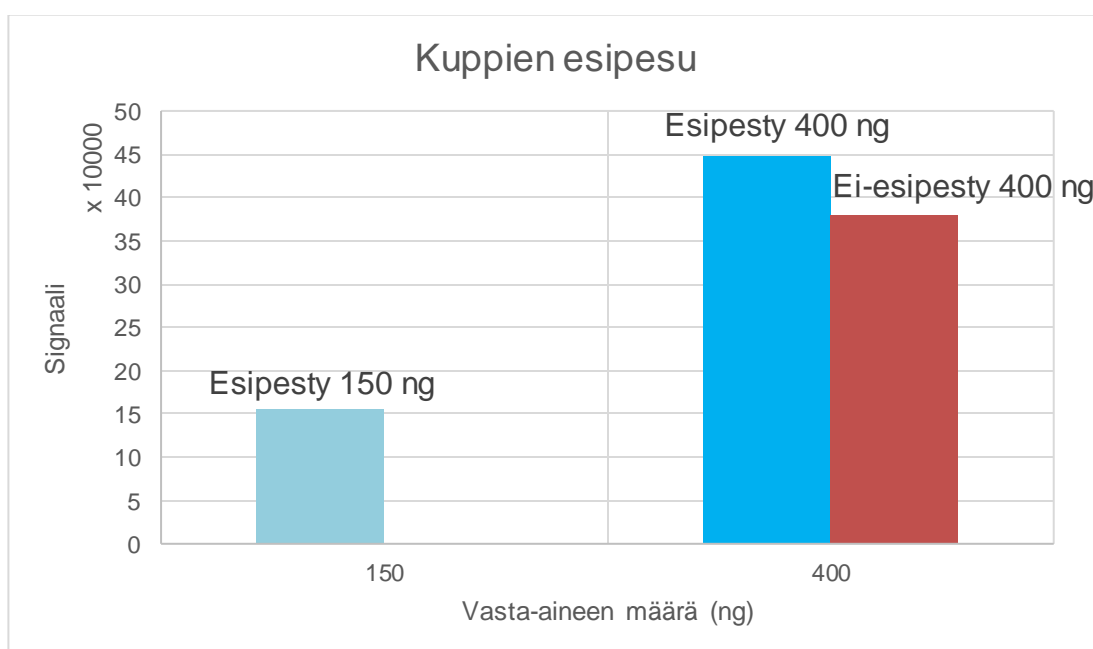
Koeasetelmassa 5 valmistettiin myös yksi ”naarmukuppi”, joka myös skannattiin (Kuva 20.). Naarmulla saatiin häirittyä bio-mAb-pintaa, mikä näkyi selkeänä laskuna naarmun kohdalla verrattuna ympäröivään alueeseen. Naarmukokeen avulla voitiin arvioida menetelmän luotettavuutta. Tulokset osoittivat, että menetelmä on herkkä havaitsemaan bio-mAb-pinnan poikkeavuuksia, kuten naarmuja, jotka heikentävät vasta-aineen sitoutumista.



Kuva 20. Naarmutetun kupin skannaus kuvattuna sivulta sekä ylhäältä.

6.5 Kuppien esipesu

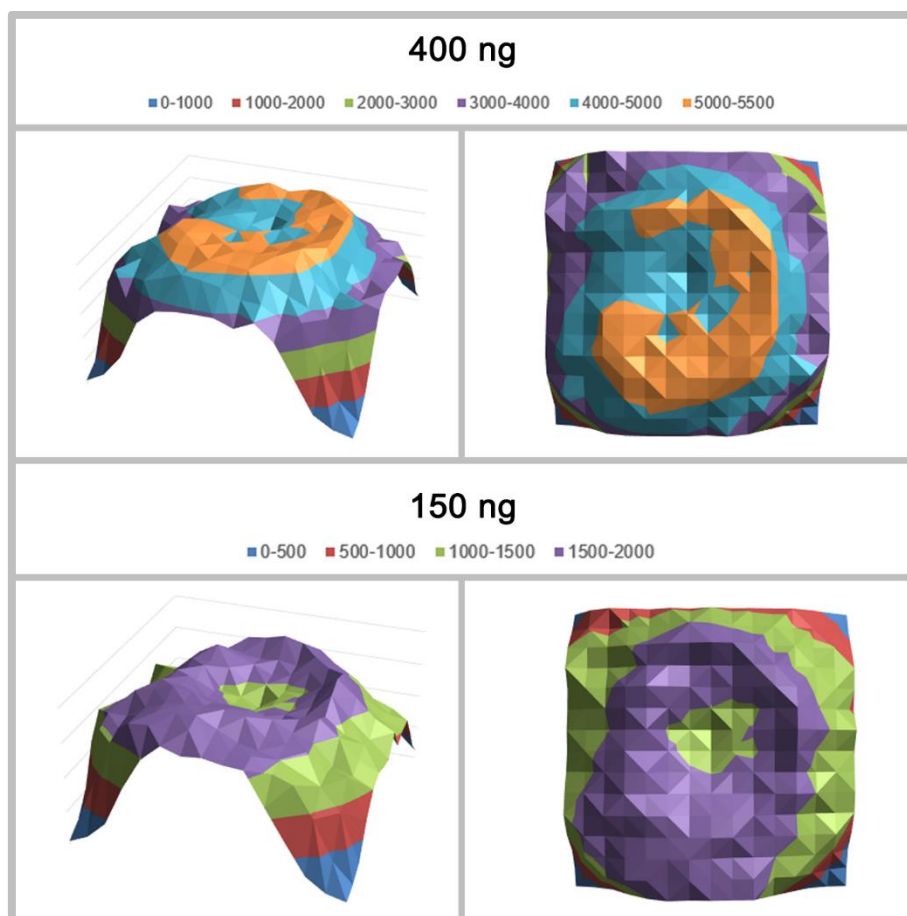
Koeasetelmassa 7 kupit esipestiin ennen vasta-aineen annostelua. Mitatuista signaaleista laadittiin kaavio 7, johon liitettiin myös koeasetelman 5 kuppien dataa, jossa parametrit olivat samanlaiset kuin esipestyissä 400 ng -pitoisissa kupeissa, mutta niitä ei oltu esipesty. Tämä mahdollisti esipesun vaikutuksen vertailun signaalin vaihtelevuuteen. On kuitenkin huomioitava, että 150 ng -pitoisuuden kuppien tuloksia ei voida verrata muiden koeasetelmien kuppien tuloksiin, koska niitä ei oltu valmistettu samalla inkubointiajalla (45 minuuttia).



Kaavio 7. Koeasetelma 7: Esipesun vaikutus.

Kaaviosta 7 ilmenee, että esipestyt kupit tuottavat voimakkaampaa signaalia verrattuna pesemättömiin kuppeihin, kun vertaillaan 400 ng-pitoisten kuppien signaaleja toisiinsa. Koska kyseessä eivät ole saman koeryhmän kuppien tulokset, eroissa voi esiintyä pientä vaihtelua, mutta signaaliero voi myös viitata siihen, että välikerroksen liuottaminen pois parantaa leimatun vasta-aineen kykyä sitoutua bio-mAb-pintaan. Esipesu ei todennäköisesti häiritse bio-mAb-pinnan omaa rakennetta.

Esipestyjen kuppien pohjista skannattiin kuvaajat, jotka ovat koottu yhteen kuvaan 21.



Kuva 21. Koeasetelma 7: Yksittäisten esipestyjen kuppien skannaukset kuvattuna sivulta sekä ylhäältä (400 ng ja 150 ng).

Skannaukset vaikuttavat samankaltaisilta, kuin aiemmissa koeasetelmissa kuvatut kupit. 400 ng-pitoinen kuppi vaikuttaa signaalijakaumaltaan yleisesti tasaiselta, kun taas 150 ng-pitoisten kuppien signaalitaso on heikompi ja jakauma epätasaisempi. Tämä voi viitata siihen, että 150 ng määrä on liian pieni tämän menetelmän tehokkuuteen, vaikka esipesu saattaa parantaa vasta-aineen sitoutumista bio-mAb-pintaan ja siten signaalia.

7 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää laadunvalvontamenetelmä testikuppien vasta-ainepinnan homogeenisuuden määrittämiseksi. Koeasetelmat mahdollistivat useiden parametrien, kuten annostellun vasta-aineen määrän, tilavuuden, ravistelutavan ja inkubointiolosuhteiden vaikutusten tarkastelun.

Tulokset osoittivat, että tilavuudella on merkittävä vaikutus signaalitasoon ja sen tasaisuuteen. Tilavuudella 30 µl saavutettiin korkeampi ja tasaisempi signaali verrattuna suurempaan 70 µl tilavuuteen. Tämä johtuu suuremman tilavuuden aiheuttamasta reaktiokomponenttien laimenemisestä, mikä heikentää vasta-aineen sitoutumista bio-mAb-pintaan. Pienemmän tilavuuden käytön havaittiin johtavan konsentroituneempaan vasta-ainepitoisuuteen, mikä vahvisti signaalia. Tämä mahdollistaa vasta-aineen säästämisen käyttämällä pienempää, mutta korkeamman pitoisuuden omaavaa liuostilavuutta.

Signaalitaso kasvoi vasta-aineen määrän lisääntyessä, mutta kasvu hidastui 600 ng jälkeen, mikä viittaa vasta-ainepinnan saturaatiopisteeseen. Vertailu 600 ng ja 400 ng välillä osoitti, että vaikka 600 ng-pitoisuus tuotti hieman parempaa signaalia, skannausten perusteella tasalaatuisuudessa ei ollut merkittäviä eroja. Näin ollen pienemmän vasta-ainemäärän, kuten 400 ng, käyttö voi olla perusteltua, sillä se tarjoaa tasalaatuisia tuloksia ilman tarpeetonta resurssien kulutusta. Verrattuna 400 ng-pitoisuuteen, 300 ng-pitoisuus tuotti myös tasalaatuista tulosta skannauksien perusteella, vaikka signaali oli heikompi. Tämä viittaa siihen, että laadunvalvonnassa on mahdollista saavuttaa riittävä tasalaatuisuus käyttämällä huomattavasti pienempää vasta-ainemäärää. Kuitenkin, jos laadunvalvonnan tarpeet edellyttävät vahvempaa signaalia, 400 ng tarjoaa paremman tasapainon signaalitason ja resurssien käytön välillä.

Ravistelutapa ei vaikuttanut merkittävästi tuloksiin, mutta levyinkubaattorin orbitaalinen ravistelu yhdessä lämpötilasäätelyn kanssa tuotti tasaisemman signaalijakauman. Tämä viittaa siihen, että tasainen lämpötila ja tasainen ravistelu voivat vähentää liuoksen epätasaista haihtumista ja edistää reaktion tasaisuutta.

Ravistelunopeuden vaikutuksista havaittiin, että 0 rpm (ravistelematon) tuotti tasaisen signaalijakauman, mutta vasta-aine ei päässyt sitoutumaan kupin pohjan reunoihin asti, jolloin se ei kertonut bio-mAb-pinnan homogeenisuudesta luotettavasti. Sen sijaan 600 rpm ja 400 rpm antoivat lupaavia tuloksia, mutta 400 rpm tuotti voimakkaampaa signaalia. Tämä viittaa siihen, että 400 rpm voi olla optimaalinen ravistelunopeus menetelmän tarkkuuden kannalta.

Inkubointiajan vaikutuksia tarkasteltaessa havaittiin, että pidempi inkubointiaika voi parantaa signaalitasoa, mutta tämän vaikutus oli rajallinen tietyllä tasolla. Vertailussa havaittiin, että 45 minuutin inkubointiaika tuotti paremman signaalin ja tasaisemman signaalijakauman kupin sisällä verrattuna 30 minuuttiin. Lisäksi pidempi inkubointiaika saattoi vähentää levyn sisäistä hajontaa. Kuitenkin 60 minuutin inkubointiaika ei tarjonnut merkittävää parannusta tuloksiin, mikä vahvistaa, että 45 minuuttia on optimaalisin inkubointiaika.

7.1 Jatkokehitys

Kokonaisuudessaan opinäytetyö osoitti, että menetelmän kehittäminen vasta-ainepinnan homogeenisuuden arvioimiseksi on mahdollista ja tarjoaa tietoa prosessin optimointiin. Menetelmän soveltaminen tuotannossa voi parantaa laadunvalvontaa, vähentää epäonnistuneiden erien riskiä ja edistää tuotteiden luotettavuutta.

Jatkossa tulisi tarkemmin tutkia, sopiiko 300 ng vasta-ainemäärä optimaaliseksi kustannustehokkuuden ja signaalin tasaisuuden näkökulmasta, sekä varmistaa, että 400 rpm on tehokkain ravistelunopeus homogeenisuuden saavuttamiseksi. Lisäksi kokeita tulisi laajentaa kupeille, joissa käytetään tavallista välikerrosta, joka mahdollisesti liuotetaan pois esipesussa. Tämä on oleellinen askel, sillä menetelmän implementointi laadunvalvontaan edellyttää kuppien testaamista samoissa olosuhteissa kuin tuotantoprosessissa käytettävissä tavallisissa testikupeissa.

Menetelmän yksinkertaistamiseksi olisi myös syytä siirtyä käyttämään vain yhtä levylukijaa, joka mittaa signaalin ja skannaa kuppien pohjat. Tämä vähentäisi laitteiston monimutkaisuutta ja parantaisi prosessin tehokkuutta.

Itse menetelmän implementointi laadunvalvontaan vaatii vielä tarkempaa suunnittelua ja testausvaiheiden integroimista osaksi tuotantoprosessia. Tämä sisältää esimerkiksi menetelmän skaalautuvuuden arvioimisen suurilla tuotantoerillä sekä signaalitulosten vertailua hyväksyttäviin raja-arvoihin. On tärkeää määrittää, mikä signaalitulos on hyväksyttävä ja minkä tasoiset signaalijakaumat kupin sisällä ovat normaaleja. Näiden kriteerien avulla voidaan varmistaa, että laadunvalvontaprosessi on luotettava ja tehokas. Lisäksi menetelmän tehokkuuden varmistaminen erityyppisillä erillä voisi edelleen parantaa tuotannon luotettavuutta ja vähentää resurssihävikkiä.

8 Lähteet

BNO Team, 2024. *Biology Notes Online*. [Online]

Available at: <https://biologynotesonline.com/lock-and-key-model/>

[Haettu 22.09.2024].

Chiu, N. H. L. & Christopoulos, T. K., 2021. *Advances in Immunoassay Technology*. InTechOpen.

Cox, K. L. ym., 2012. *Immunoassay Methods*. Teoksessa: *The Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Dickson, E., Pollak, A. & Diamandis, E., 1995. Ultrasensitive bioanalytical assays using time-resolved fluorescence detection. *Pharmacology & Therapeutics*, 66(2), pp. 207-235.

Dornell, J., 2023. *Monoclonal vs Polyclonal Antibodies*, Technology Networks.

Eleftherios P. Diamandis, 1988. Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: Principles and applications. *Clinical Biochemistry*, 21(3), pp. 139-150.

Haney, S. A., Bowman, D. & Chakravarty, A., 2015. *An Introduction to High Content Screening : Imaging Technology, Assay Development, and Data Analysis in Biology and Drug Discovery*. John Wiley & Sons.

International Organization for Standardization, 2016. *ISO 13485:2016*.

Kohdeyrityksen perehdytysmateriaali.

Koistinen, H. & Stenman, U.-H., 2014. *Novel Approaches in Immunoassays*. London: Future Medicine Ltd.

Luong, J. H. T. & Vashist, S. K., 2020. Chemistry of Biotin–Streptavidin and the Growing Concern of an Emerging Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *ACS Omega*, 5(1), pp. 10-18.

Matsumoto, K., 2020. Recent developments in lanthanide chelates as luminescent labels for biomedical analyses. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Osa/vuosikerta 57, pp. 119-191.

Rezaei, N., 2021. *Monoclonal Antibodies*. London: IntechOpen.

Seveus, L. ym., 1992. Time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cytometry*, 13(4), pp. 329-338.

Silvestrini, R. & Burke, S. E., 2017. *Title: The Certified Quality Engineer Handbook*. 4th toim. ASQ Quality Press.

Sztefko, K., 2011. *Immunodiagnosics and Patient Safety*. Kraków: De Gruyter.

Wild, D., 2013. *The Immunoassay Handbook : Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 4th toim. San Diego: Elsevier Science & Technology.

Ylikotila, J., 2009. *Highly fuctional binding surface for miniaturised solid-phase immunoassays*. Turku: Turun Yliopisto.