

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Nina Leinonen

# LEIMAAMATTOMAN IMMUNOMÄÄRITYKSEN KEHITTÄMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Toukokuu 2012 | Sivumäärä 70 + 1 liite

FT Sari Pihlasalo, FT Harri Härmä, TKT Mika Jokinen

Nina Leinonen

# LEIMAAMATTOMAN IMMUNOMÄÄRITYKSEN KEHITTÄMINEN

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää epäspesifistä sitoutumista ja luminometrasta detektiota hyödyntävä leimaamaton menetelmä antigeenin pitoisuuden mittaamiseen. Opinnäytetyö suoritettiin Turun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan Biofysiikan laboratoriossa.

Menetelmää kehitettäessä hyödynnettiin biotiinin ja streptavidiinin muodostamaa vahvaa sidosta. Lopullisessa menetelmässä tarkoituksena on mitata antigeenin pitoisuutta. Karboksyyliyhdykkeillä modifioitu biotiini kilpailee menetelmässä biotiinin kanssa sitoutumisesta streptavidiniin. Sitoutumista mitataan lisäämällä  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattia ja mittaamalla fluoresenssia. Biotiinipitoisuuden ollessa pieni modifioitu biotiini pääsee sitoutumaan streptavidiniin ja saadaan korkea signaali. Biotiinipitoisuuden kasvaessa modifioitu biotiini kelatoi  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin jolloin signaali on heikko.

Työssä pyrittiin löytämään sopiva molekyyli testaamalla kaupallisia ja itse valmistettuja yhdisteitä. EDTA:n ja DTPA:n avulla todettiin, että karboksyyliyhdykkeitä tulee olla vähintään neljä menetelmän toimimiseksi. Työssä testattiin sitruunahappoa, epomiinia, biotiini-NTA:ta, biotiini-DTPA:ta ja biotiiniligandia. Myös erilaisia puskureita ( $\text{NaCl}$ , HEPES,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) sekä erilaisia tapoja lisätä  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatti testattiin.

Menetelmä vaatii vielä kehitystä, koska se ei toiminut minkään molekyylin kanssa toistettavasti. Tulokset viittaavat siihen, että  $\text{Eu}^{3+}$ -ioni on liian pieni ioni, jolloin se pääsee sitoutumaan modifioituun biotiiniin, vaikka biotiini onkin sitoutunut streptavidiniin.

ASIASANAT:

(Aikaerotteinen fluorometria, analyysimenetelmät, biotiini, vasta-aineet, streptavidini)

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

May 2012 | Total number of pages 70 + 1 appendix

Sari Pihlasalo Ph.D., Harri Härmä Ph.D., Mika Jokinen D.Sc.

Nina Leinonen

## DEVELOPMENT OF UNLABELED IMMUNOASSAY

The purpose of the thesis project was to develop an unlabeled method for immunoassays. The practical work was performed in the Laboratory of Biophysics at the University of Turku. The aim of the study was to develop a novel immunoassay which uses nonspecific bonding and luminometric detection.

In modeling the immunoassay, a biotin-streptavidin bond was exploited. A modified biotin competes against the biotin for binding to the streptavidin. The binding is detected by using an  $\text{Eu}^{3+}$  chelate and measuring fluorescence. When the concentration of biotin is low the modified biotin can bind to the streptavidin and a high signal is measured. When the concentration of biotin increases, the modified biotin surrounds the  $\text{Eu}^{3+}$  chelate and a low signal is detected.

The aim of the study was to find a suitable compound by testing various commercial molecules and molecules coupled in the Laboratory of Biophysics. By testing EDTA and DTPA, it was noticed that the molecule had to possess at least four carboxyl groups. Biotin NTA, biotin DTPA, epomin, citric acid and biotin ligand were also tested. Also different conditions and buffers were tested.

The method still requires development because it did not work repeatably with any of the tested molecules. The results show that the  $\text{Eu}^{3+}$  ion is too small an ion to be able to bind to the modified biotin, even though the modified biotin is bound to the streptavidin.

KEYWORDS:

(antibody, biotin, immunoassay, streptavidin, time-resolved fluorometry)

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)</b>	<b>8</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>9</b>
<b>2 MENETELMÄN PERIAATE</b>	<b>10</b>
<b>3 IHMISEN IMMUUNIJÄRJESTELMÄ</b>	<b>12</b>
3.1 Vasta-aineen rakenne	12
3.2 Vasta-aineiden luokittelu	13
3.3 Vasta-aineen sitoutuminen	14
<b>4 FLUORESENSSI</b>	<b>15</b>
4.1 Aikaerotteinen fluorometria	16
4.2 Sammutus	17
<b>5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>18</b>
5.1 Biotiini	18
5.2 Streptavidiini	18
5.3 $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatti	19
5.4 EDTA	19
5.5 DTPA	19
5.6 Victor <sup>2</sup> -monileimamittalaite	20
5.7 HPLC	20
<b>6 TYÖN SUORITUS</b>	<b>21</b>
6.1 Laimennosliuksen valinta	21
6.2 $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin lisäysmenetelmän valinta	21
6.3 Muiden yhdisteiden testaus	23
6.4 Biotiini-NTA	23
6.5 Biotiini-DTPA	24
6.5.1 Puhdistettujen fraktioiden testaus biotiinin ja DTPA:n suhteen	25
6.5.2 Fraktion 1 testaukset streptavidiinin ja biotiinin suhteen	25
6.5.3 Toinen puhdistus ja testaukset	26
6.5.4 Fraktioiden 6 ja 8 testaukset	27

6.6 Eu <sup>3+</sup> -kelaatin lisätestejä	28
6.7 Biotiiniligandin valmistus ja puhdistus	30
6.7.1 Biotiiniligandin testaukset	30
6.7.2 TFA:n haihdutus	31
6.8 Detergenttien ja puskurien testaus	32
6.9 QRET	33
<b>7 TULOKSET</b>	<b>34</b>
7.1 Laimennosliuoksen valinta	34
7.2 Eu <sup>3+</sup> -kelaatin lisäysmenetelmän testaus	37
7.3 Muiden yhdisteiden testaus	39
7.4 Biotiini-NTA	43
7.5 Biotiini-DTPA	45
7.5.1 Puhdistettujen fraktioiden testaus	45
7.5.2 Fraktion 1 jatkotestit	46
7.5.3 Toisen puhdistuksen testaukset	50
7.5.4 Fraktioiden 6 ja 8 testaukset	51
7.6 Eu <sup>3+</sup> -kelaatin lisätestit lisäyksen optimoinniksi	54
7.7 Biotiiniligandi	56
7.7.1 TFA:n haihdutus	59
7.8 Detergenttien ja puskurien testaus	62
7.9 QRET	66
<b>8 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>68</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>70</b>

## LIITTEET

Liite 1. Eu<sup>3+</sup>-testit eri liuoslisäyksillä.

## KUVAT

Kuva 1. Leimaamattoman määrityssysteemin periaate antigenin pitoisuuden määrittämiseksi.

## KUVIOT

Kuvio 1. IgG:n rakenne (2).	13
Kuvio 2. Stokesin siirtymä (5).	16
Kuvio 3. Biotiinin kemiallinen rakenne. (9)	18
Kuvio 4. EDTA:n rakenne (11).	19
Kuvio 5: DTPA:n rakenne (13).	20
Kuvio 6: Biotiini-NTA:n rakenne (15).	24
Kuvio 7. Aminobiotiinin rakenne (16).	24
Kuvio 8. Laimennosliuosten vertailu $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 0,3 $\mu\text{M}$ .	34
Kuvio 9. Laimennosliuosten vertailu SA-pitoisuudella 10 nM, $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 0,3 $\mu\text{M}$ .	35
Kuvio 10. Laimennosliuosten vertailu $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 1 $\mu\text{M}$ .	35
Kuvio 11. Laimennosliuosten vertailu SA-pitoisuudella 10 nM, $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 1 $\mu\text{M}$ .	36
Kuvio 12. Laimennosliuosten vertailu $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 3 $\mu\text{M}$ .	36
Kuvio 13. Laimennosliuosten vertailu SA-pitoisuudella 10 nM, $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 3 $\mu\text{M}$ .	37
Kuvio 14. $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuosten suhteelliset signaalit.	38
Kuvio 15. $\text{Eu}^{3+}$ -liuosten jatkotesti.	39
Kuvio 16. EDTA:n suhteelliset signaalit.	40
Kuvio 17. DTPA:n suhteelliset signaalit.	40
Kuvio 18. Sitruunahapon suhteelliset signaalit.	41
Kuvio 19. Biotiinin suhteelliset signaalit.	41
Kuvio 20. Aminobiotiini suhteelliset signaalit.	42
Kuvio 21. Epomiinien suhteelliset signaalit.	43
Kuvio 22. Biotiini-NTA:n suhteelliset signaalit.	44
Kuvio 22. Fraktioiden DTPA-pitoisuuden testaus.	46
Kuvio 24. Biotiini-DTPA-laimennos 1:1000.	48
Kuvio 25. Biotiini-DTPA-laimennos 1:100.	48
Kuvio 26. Biotiinin laimennoskäyrä TRF:llä mitattuna.	52
Kuvio 27. Fraktioiden 6 ja 8 biotiinimääritys aikaerotteisena fluoresenssina.	52
Kuvio 30. DTPA:n laimennoskäyrä.	53
Kuvio 31. Fraktion 8 DTPA-pitoisuuden määrittäminen.	53
Kuvio 32. Fraktion signaalilasku.	56
Kuvio 33. Biotiinin laimennoskäyrä.	58
Kuvio 34. Biotiiniligandin biotiinipitoisuuden määrittäminen.	58

## TAULUKOT

Taulukko 1. $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuokset.	22
Taulukko 2. $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuokset.	29
Taulukko 3. $\text{Eu}^{3+}$ -liuokset.	32
Taulukko 4. Fraktioiden biotiinipitoisuuden testaus.	45
Taulukko 5: Fraktion SA-testi.	49
Taulukko 6: Fraktioiden biotiinipitoisuuden testaus	50
Taulukko 7: Fraktioiden DTPA-pitoisuuden testaus.	51
Taulukko 8: $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin lisätestit	55

Taulukko 9: SA-pitoisuuden testaus.	57
Taulukko 10. TFA:n vaikutuksen testaus $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:3:3 -liuoksella.	59
Taulukko 11. TFA:n testaus HEPES-puskurilla.	60
Taulukko 12. Haihdutuksen vaikutuksen tulokset 5 mM NaCl:ssa.	60
Taulukko 13: Biotiiniligandin testaus eri SA-pitoisuuksilla.	61
Taulukko 14: $\beta$ -NTA:TOPO-testi.	62
Taulukko 15: Detergenttien testi.	63
Taulukko 16: $\beta$ -NTA:TOPO:n uusintatesti.	63
Taulukko 17: Detergenttien uusintatesti.	64
Taulukko 18: 5 mM NaCl-testi.	65
Taulukko 19: 5 mM HEPES-testi.	66
Taulukko 20. QRET-testin tulokset.	67
Taulukko 21: $\text{Eu}^{3+}$ -testi EDTA- ja DTPA-lisäyksillä.	1
Taulukko 22: $\text{Eu}^{3+}$ -testit $\beta$ -NTA:TOPO-lisäyksillä.	2

## KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

Biotiini-Eu	Europium-leimattu biotiini
Biotiini-T7-Eu	(2,2',2'',2''')[[4-[(4-fenyyli-isotiosyanaatti)-etyynyli]pyridiniini-2,6-diyli]bis(metyleeninitrilo)}tetrakis(asettaatti) europium(III)
Biotiini-T9-Eu	{2,2',2'',2'''}-{4'-4'''}-fenyyli-isotiosyanaatti)-2,2':6,6''-terpyridiniini-6,6''-diyl]bis(metyleeninitrilo)}tetrakis(asettaatti))-europium(III)
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimetyylaminopropyl)carbodiimide, 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi
Epomiini	Polyetyleneimiini
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiini-etaanisulfonihappo
MES	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid, 2-( <i>N</i> -morfoliino)etaanisulfonihappo
Nano Eu norm	Aikaerotteinen fluoresenssi, viritys aallonpituudella 340 nm, emission detektio aallonpituudella 615 nm
β-NTA	4,4,4-trifluoro-1-(2-naftalenyli)-1,3-butaanidioni
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
SA	Streptavidiini
SA-Alexa	Alexa Fluor 680 -leimattu streptavidiini
SDS	Natriumlauryylisulfaatti
TEAA	Triethylammonium acetate, trietyyliammoniumasettaatti
TFA	Trifluoroacetic acid, trifluorietikkahappo
TOPO	Trioktyylifosfiinioksidi
TRF	Aikaerotteinen fluoresenssi, viritys aallonpituudella 340 nm, emission detektio aallonpituudella 730 nm



# 1 JOHDANTO

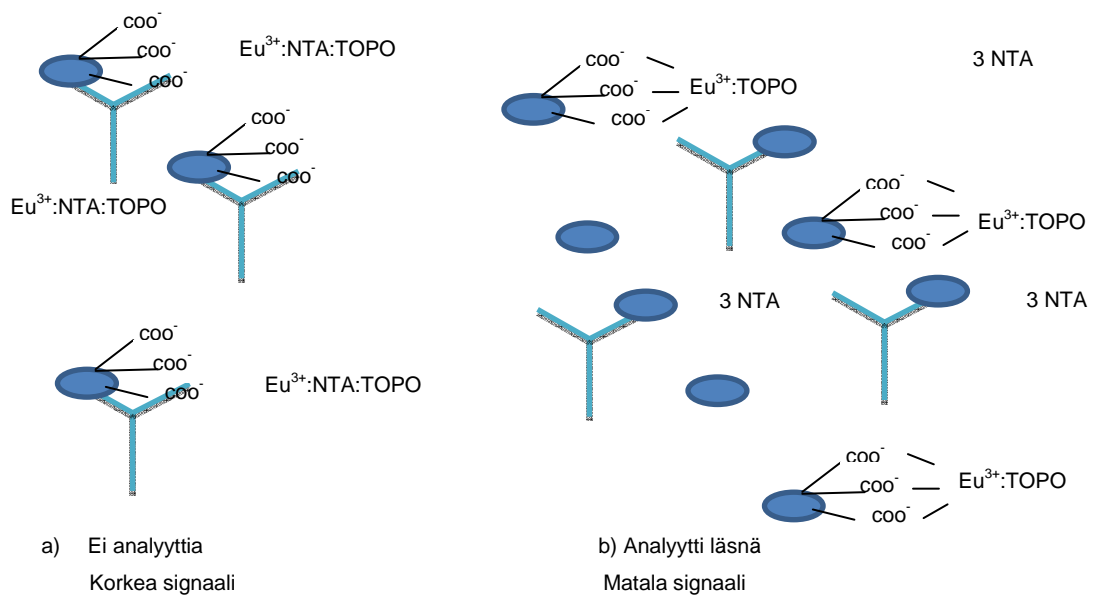
Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan Biofysiikan laboratoriossa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää epäspesifistä sitoutumista ja luminometrasta detektiota hyödyntävä leimaamaton menetelmä antigeenin pitoisuuden mittaamiseen.

Antigeenin pitoisuutta mitataan usein kilpailevalla määrityksellä tai ns. ”sandwich”-menetelmällä. Nämä menetelmät vaativat kuitenkin radioaktiivisella tai luminoivalla värillä leimatun antigeenin tai vasta-aineen ja ne sisältävät pesuvaiheita. Leimaus voi olla aikaa vievä ja hankala prosessi sekä lisäksi kallis.

Opinnäytetyössä kehitettiin spesifistä määrityssysteemiä ilman leimattuja määrittäyskomponentteja. Määrityksessä käytettiin epäspesifisiä värimolekyyleja, joita ei kuitenkaan ole kiinnitetty mitenkään käytettäviin määrittäyskomponentteihin. Menetelmää mallinnettiin streptavidiinin ja biotiinin muodostaman spesifisen ja vahvan sidoksen avulla. Biotiinia muokattiin lisäämällä siihen karboksyyliiryhmiä. Sitoutumista mitattiin lisäämällä näytteeseen  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattia ja mittaamalla fluoresenssia. Biotiinipitoisuuden ollessa pieni, modifioitu biotiini sitoutuu streptavidiiniiin jättäen  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin vapaaksi. Tällöin havaitaan suuri signaali. Biotiinipitoisuuden kasvaessa modifioitu biotiini ei enää pääse sitoutumaan streptavidiiniiin, jolloin sen karboksyyliiryhmät kelatoivat  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin. Tällöin havaitaan pieni signaali. Opinnäytetyössä testattiin erilaisia kaupallisia ja Biofysiikan laboratoriossa valmistettuja modifioituja biotiini –molekyyleja.

## 2 MENETELMÄN PERIAATE

Näytteeseen lisätään vasta-aine, karboksyyliyhmillä modifioitu antigeeni sekä  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatti. Menetelmässä karboksyyliyhmillä modifioitu antigeeni ja näytteen sisältämä antigeeni kilpailevat sitoutumisesta vasta-aineeseen. Kuvassa 1 on esitetty menetelmän periaate antigeenin pitoisuuden mittaamiseen. Näytteen antigeenipitoisuuden ollessa pieni, modifioitu antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen eikä pysty häiritsemään  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattia. Antigeenipitoisuuden kasvaessa modifioitu antigeeni jää liuokseen ja karboksyyliyhdyt keloivat  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin, jolloin luminoivan kelaatin  $\beta$ -NTA- tai TOPO-koordinaatiosidokset katkeavat. Menetelmä on nopea, sillä se ei sisällä yhtään pesuvaihetta ja helppo toteuttaa yleisesti saatavissa olevilla mikrotiiterilevyillä ja luminesenssin levylukijoilla.



Kuva 1. Leimaamattoman määrityssysteemin periaate antigeenin pitoisuuden määrittämiseksi.

Työn tavoitteena oli löytää menetelmään sopiva molekyyli. Nykyisissä immunomäärityksissä käytettävät fluoresoivat leimat ovat kalliita. Leimaamattomassa

menetelmässä näistä kalliista leima-aineista päästäisiin eroon. Menetelmä on homogeeninen, jolloin heterogeenisissä immunomäärityksissä suoritettavat pesuvaiheet jäävät pois. Tämä nopeuttaa menetelmän suoritusta.

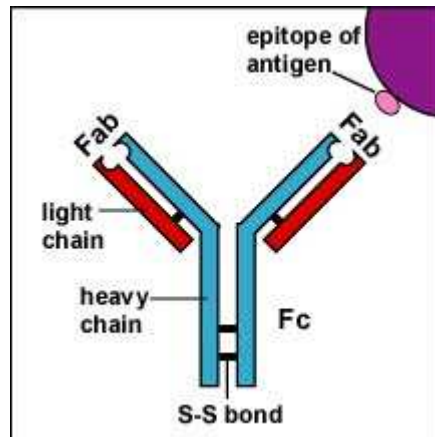
### 3 IHMISEN IMMUUNIJÄRJESTELMÄ

Ihmisen kehoa suojaa immuunijärjestelmä, tehokas sarja aseita, jotka voivat tuhota tai neutralisoida vieraat solut, virukset ja makromolekyylit. Jotkin mekaniemit ovat epäspesifisiä, eivätkä tehostu uudelleenaltistumisen myötä. Tätä osaa immuunipuolustuksesta kutsutaan luontaiseksi immunitetiiksi. Luontainen immunitetti saadaan jo syntyessä. Vastakohtana adaptiivinen immunitetti kohdistuu spesifiseen vieraaseen molekyyliin ja vasteen teho kasvaa, jos keho altistuu uudelleen samalle molekyyliin. Adaptiivinen immunitetti muodostuu kehon altistuessa erilaisille vieraille molekyyliin. Adaptiivinen immunitetti perustuu soluihin nimeltä lymfosyytit, joita muodostuu luuytimessä. Ne kantavat pinnallaan reseptoreita, jotka sitovat kehon vieraita molekyyliä. Jokainen solu kantaa vain yhden tyyppistä reseptoria. Lymfosyyttejä on kolmenlaisia: B-solut, auttaja-T-solut ja tappaja-T-solut. Tappaja-T-solut hajottavat vieraat tai infektoituneet solut sitouduttuaan niihin antigeenireseptorin kautta. (1)

Vasta-aineet ovat B-solujen lymfosyyttien erittämiä proteiineja, jotka sitovat vieraista molekyyliä kehossa. Ne ovat pääkomponentteja humoraalisessa immuunipuolustusjärjestelmässä (huolehtii solunulkoisessa tilassa taudinaiheuttajien tuhoamisesta). Infektion seurauksena vasta-aineita erittyy runsaasti ja niillä on spesifinen antigeenia sitova kohta. Vasta-aineet käyttävät sekä komplementivälitteistä solumyrkkyä että soluimmuunivastetta tappaakseen, vallatakseen ja puhdistakseen vieraan solun. (1)

#### 3.1 Vasta-aineen rakenne

Vasta-aineet ovat glykoproteiineja ja kuuluvat immunoglobuliinien supergeeniin perheeseen. Vasta-aine- ja immunoglobuliini – nimityksiä käytetään paljon vastavuoroisesti. Immunoglobuliini G, IgG, yleisimmin käytetty seerumin vasta-aine, koostuu kahdesta identtisestä raskasketjusta ja kahdesta identtisestä kevyetketjusta, jotka yhdistyvät toisiinsa rikkisilloin muodostaen Y-muodon. Kuviossa 1 on kuvattu IgG:n rakenne. Myös IgD:llä ja IgE:llä on sama Y-muoto. (1)



Kuvio 1. IgG:n rakenne (2).

Immunoglobuliini koostuu antigeenia sitovasta kohdasta (Fab) sekä kiteytyvästä osasta (Fc). Fc-osa tunnistaa isännän puolustusmekanismin. Nivelalue on joustava, jotta Fab-alueet voivat sitoa antigeenin kahdesta eri suunnasta. (1)

### 3.2 Vasta-aineiden luokittelu

Vasta-aineet jaetaan viiteen eri luokkaan: IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE. (1)

IgG on yleisin immunoglobuliini, 70-75 % kaikista immunoglobuliineista. Ihmisellä ja hiirellä on löydetty neljä alaluokkaa: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> ja IgG<sub>4</sub>. Naudalla on löydetty kolme ja jäniksellä yksi. Ihmisellä IgG<sub>1</sub> ja IgG<sub>3</sub> sitoutuvat komplementtiin (noin kahdestakymmenestä toinen toistaan aktivoivasta proteiinista koostuva immuunipuolustuksen osa, mikä tappaa vierasmolekyylejä) ja välittävät vasta-aineriippuvaista solumyrkkyä, kun taas IgG<sub>2</sub>:lla ja IgG<sub>4</sub>:lla komplementti antaa vähemmän affiniteettia eli vasta-aineet sitoutuvat heikommin antigeeniin. (1)

IgM:llä, joka muodostaa noin 10 % immunoglobuliineista, on pentameerinen rakenne. Siinä viisi immunoglobuliinimolekyyliä linkittyy toisiinsa raskasketjun C-pääteryhmästä hiilihydraatien sivuketjujen ja polypeptidin J-ketjujen kautta. Vaikka se on vahva komplementtia parantava vasta-aine, se ei pysty välittämään vasta-aineriippuvaista solumyrkkyä. IgM:n arvioitu molekyyli massa on noin 970 KDa. (1)

IgA muodostaa noin 15-20 % kaikista seerumissa esiintyvistä vasta-aineista. Ihmisessä yli 80 % IgA:sta esiintyy monomeerina, vaikka useimmissa nisäkäs-seerumeissa se esiintyy yleensä dimeerinä tai joskus jopa polymeerina. Kaksi alaluokkaa on löydetty: IgA<sub>1</sub> ja IgA<sub>2</sub>. IgA on hallitseva immunoglobuliini seerumin limaa sisältävissä eritteissä, muun muassa syljessä ja keuhkoputken eritteissä. Erittävä IgA esiintyy pääasiassa 385 KDa dimeeri-muodossa ja se on suojattu proteolyysiltä kattavalla glykolysaatiolla nivelalueella. (1)

IgD, molekyyli­massa noin 184 KDa, muodostaa alle 1 % kaikista immunoglobuliineista. Se esiintyy pääosin B-solujen pinnalla. Sen tehtävä on epäselvä. (1)

### 3.3 Vasta-aineen sitoutuminen

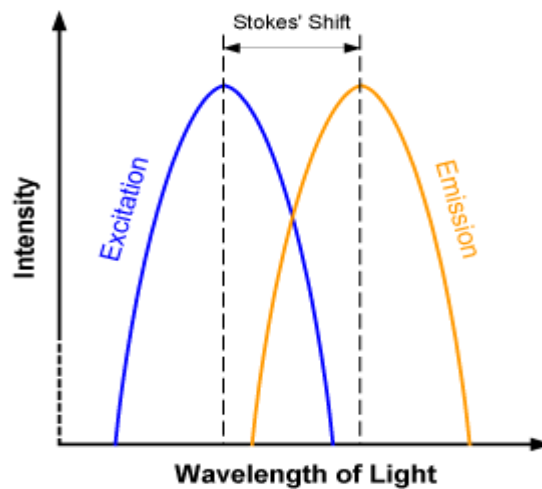
Immuunipuolustuksen käynnistävää molekyyliä kutsutaan immunogeeniksi. Antigeeni on molekyyli, joka sitoutuu vasta-aineeseen. Antigeenin alue, joka sitoo vasta-aineen, on nimeltään epitooppi tai antigeeninen determinantti. Antigeeni ei välttämättä ole proteiini. Alhaisen molekyyli­painon aineet, kuten lääkkeet ja jotkin hormonit, eivät ole antigeenisia itsessään, mutta ne voivat tulla sellaisiksi yhdistyessään proteiinikantajiin. Tällaisia yhdisteitä kutsutaan hapteeneiksi. Jotkin vasta-aineet, jotka on tuotettu näihin immunogeenisiin konjugaatteihin, ovat spesifisiä hapteeneille. Yleisin käytetty kantajayhdiste on naudan seerumin albumiini, BSA tai KLH ("keyhole limpet hemocyanin", nilviäisten ja äyriäisten verenkierrosta löytyvä happea sitova kuparipitoinen proteiini). Kantajaproteiinien käyttö ei ole rajoitettu vain pienille ei-immunogeenisille yhdisteille; pienet proteiinit, joilla on alhainen immunogeneettisyys, on myös yhdistetty kantajaproteiineihin ja niitä on käytetty menestyksellisesti vasta-aineiden kehittämiseen. (1)

## 4 FLUORESENSSI

Luminesenssi on ilmiö, jossa atomin tai molekyylin viritystilän purkautuessa atomi palaa alemmalle energiatasolle. Samalla ylimääräinen energia vapautuu valona. Fluoresenssi on luminesenssin alalaji, jossa fotonin virittäminen eli atomin elektroni siirtyy korkeammalle viritystilalle. Viritystilän purkautuessa elektroni laskee nopeasti alimmalle virittyneelle tilalle. Loput alkuperäisen fotonin energiasta siirtyy lämmöksi. Elektronin laskiessa takaisin perustilalle, vapautunut energia havaitaan valona. Fluoresenssissa emittoidut fotonit havaitaan nopeasti niiden absorptiojälkeen. (3) Fluoresenssi-ilmiössä atomi absorboi valoa tietyllä aallonpituudella ja pienen hetken kuluttua emittoi valon pitemmällä aallonpituudella. Tätä kutsutaan fluoresenssin eliniäksi. (4)

Fluoresenssi soveltuu immunomääritysten mittaustavaksi sen luontaisen spesifisyyden vuoksi. Mitattu signaali määrittää sekä virittävät että emittoivat aallonpituudet ja sillä voidaan määrittellä fluoresenssin elinikä (aika-erotteiset tekniikat). Fluoresenssilla saavutettavat korkeammat herkkyudet (verrattuna fosforesenssiin) perustuvat siihen, että fluoresenssi mitataan vasten nolla-taustaa ja vastaavasti emissio voidaan yhdistää yhden fotonin herkkyyteen. Normaalisti fluoresenssilla mitattu fluoresoiva yhdiste saavuttaa herkkyyden välillä  $10^{-9} - 10^{-14}$  mol/L. Käytännön rutiinistöissä fluorometriset menetelmät ovat alttiita häiritseville tekijöille, kuten taustaa häiritsevät liuokset ja materiaalit, mikä asettaa rajat havaittavalle herkkyydelle. (4)

Molekyylit absorboivat valoa lyhyemmällä aallonpituuksilla kuin emittoivat sitä. Tästä aiheutuu energiavaje, joka johtuu siitä, että molekyylit menettävät osan absorboituneesta valosta värähtelyihin. Tätä eroa absorptiomaksimin ja emissiomaksimin välillä kutsutaan Stokesin siirtymäksi, joka on kuvattu kuviossa 2.(3)



Kuvio 2. Stokesin siirtymä (5).

Kun molekyyli absorboi valoa, yksi sen elektroneista korkeimmalta miehityltä orbitaalilta nousee tyhjälle orbitaalille. Kun elektronin spin on suojattu, elektroni ylenee jollekin korkeammalle virittyneelle singlettilalle. Energia vaihtelee perustilan singletin ja virittyneiden singlettien välillä aiheuttaen absorptiospektrin. (4)

#### 4.1 Aikaerotteinen fluorometria

Taustafluoresenssi hankaloittaa paljon fluorometrisia mittauksia monen biologisen yhdisteen aiheuttaessa sitä. Aikaerotteisessa fluorometriassa yritetään päästä eroon tästä häiritsevästä taustasta. Siinä mitataan emissiota tietyn ajanjakson jälkeen virittymisestä. Aikaerotteisen fluorometrian tarkoituksena on parantaa herkkyttä laskemalla taustafluoresenssia. (4)

Käytettävällä fluoroforilla pitäisi olla pitkä elinikä, pitkä Stokesin siirtymä ja kapea emissiopeikki soveltuakseen aikaerotteiseen fluorometriaan. Tällaisia fluorofooreja ovat lantanidi-ionin, joita ovat europium(III) ( $\text{Eu}^{3+}$ ), terbium(III) ( $\text{Tb}^{3+}$ ), samarium(III) ( $\text{Sm}^{3+}$ ) ja dysprosium(III) ( $\text{Dy}^{3+}$ ), sisältämät kelaatit. (6)



## 4.2 Sammutus

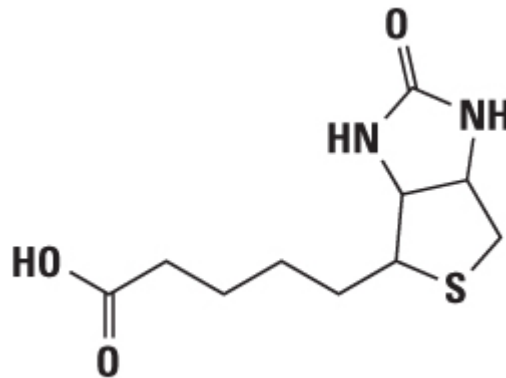
Fluoresenssin sammutus on käytännöllinen työkalu proteiinien, membraanien ja muiden makromolekyylien rakenteiden tutkimukselle. Sammutusreaktiot ovat helppoja suorittaa ja antavat arvokasta informaatiota. Liuossammuttajareaktiot antavat tietoa fluoresoivien ryhmien sijainnista makromolekyylissa. (7)

Tässä työssä tutkittava menetelmä perustuu Biofysiikan laboratoriossa kehitettyyn menetelmään homogeeniselle ligandin sitoutumismääritykselle, nimeltään QRET (quenching resonance energy transfer), resonanssienergiansiirron sammutus. QRET-menetelmässä luminesenssin emissio, jonka aiheuttaa lantanidikelaattileimattu kohdespesifinen molekyyli, sammutetaan tehokkaasti liukoisella sammuttajakemikaalilla. Kun leimattu ligandi sitoutuu reseptoriin, näytteen pitkäikäinen luminesenssin emissio voidaan havaita, kun molekyyli on suojattu reseptorilla. (8) QRET-menetelmässä modifioitua molekyyliä sitoutuessa vasta-aineeseen sammuttaja ei pääse kiinni molekyyliin ja havaitaan korkea signaali. Kun liukeseen lisätään modifioimatonta molekyyliä, sitoutuu se vasta-aineeseen jättäen modifioitua molekyyliä vapaaksi. Tällöin sammuttaja pääsee sitoutumaan modifioituun molekyyliin ja matala signaali havaitaan.

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 5.1 Biotiini

Biotiini on pieni, vesiliukoinen vitamiini. Sen molekyylipaino on 244 Da. Biotiini tunnetaan myös nimillä H-vitamiini, B7-vitamiini ja koentsyymi R. Sitä on jokaisessa elävässä solussa pieniä määriä ja se on kriittinen tekijä monissa biologisissa prosesseissa, kuten solukasvussa ja sitruunahappokierrossa. Pienen koon vuoksi biotiini voidaan konjugoida moniin proteiineihin ja muihin molekyyliin häiritsemättä juurikaan niiden biologista aktiivisuutta. (9)



Kuvio 3. Biotiinin kemiallinen rakenne. (9)

### 5.2 Streptavidini

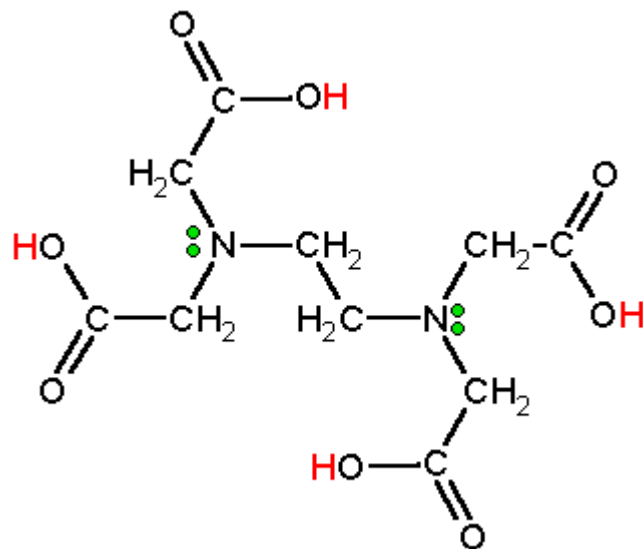
Streptavidini on tetrameerinen biotiinia sitova proteiini. Se on eristetty *Streptomyces avidinii* -bakteerista. Streptavidinin molekyylipaino on 60 kDa ja sillä on neljä sitoutumispaikkaa. Biotiinin ja streptavidinin spesifinen vuorovaikutus tekee systeemistä hyödyllisen ja herkän työkalun ei-radioaktiivisen detektiosysteemin kehittämiseen. (9)

### 5.3 $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatti

$\text{Eu}^{3+}$ -kelaatti koostuu  $\text{Eu}^{3+}$ -ionista, tunnetuista kelatoivista ligandeista kuten 2-naftoyylitrifluoroasetonista ( $\beta$ -NTA, kaksi koordinaatiopaikkaa) ja yhdisteistä, kuten tri-*n*-oktyylifosfiinioksidi (TOPO, yksi koordinaatiopaikka), jotka koordinoituvat edelleen  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin kanssa. Näin ollen  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin yhdeksän koordinaatiopaikan täyttämiseen tarvitaan kolme  $\beta$ -NTA- ja kolme TOPO-molekyyliä. (10)

### 5.4 EDTA

EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ , on aminohappo, joka muodostaa kompleksiyhdisteen monien metallien kanssa. Se on polyproottinen happo, jolla on neljä karboksyyliiryhmää ja kaksi aminoryhmää. Kuviossa 4 on kuvattu EDTA:n rakenne. (11)

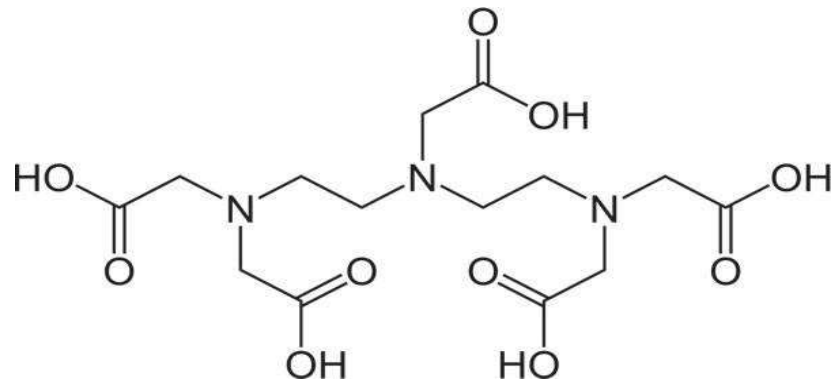


Kuvio 4. EDTA:n rakenne (11).

### 5.5 DTPA

DTPA eli dietyleenitriamiinipentaetikkahappo,  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$ , on aminohappo, joka koostuu dietyleenitriamiinista ja siihen modifioiduista viidestä karboksyyli-

ryhmästä. DTPA:n molekyylipaino on 393,2 g/mol. (12) Kuviossa 5 on esitetty DTPA:n rakenne.



Kuvio 5: DTPA:n rakenne (13).

### 5.6 Victor<sup>2</sup>-monileimamittalaite

Fluoresenssin mittaamiseen käytettiin Victor<sup>2</sup>-monileimamittalaitetta (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Suomi). Laite soveltuu fluorimetrisiin, luminometrisiin ja fotometrisiin mittauksiin.

### 5.7 HPLC

Puhdistuksessa käytettiin HPLC Ultimate 3000 –laitetta (Dionex, Thermo Scientific, ). HPLC on korkean erotuskyvyn nestekromatografi. Nestekromatografiasa erotus perustuu nestefaasin ja kiinteän faasin vuorovaikutukseen. Puhdistettava näyte on nestemäisenä ja kiinteä faasi taas on pakattu käytettävään kolonniin. Näyte pakotetaan kolonnin läpi korkeassa paineessa, mikä nopeuttaa huomattavasti puhdistusta verrattuna yleisesti käytettyyn pylväskromatografiaan, joka perustuu painovoimaan. (14)

## 6 TYÖN SUORITUS

Määritykset suoritettiin 96-mikrotiiterilevyllä. Työssä testattiin erilaisia kaupallisia biotiiniyhdisteitä sekä itse valmistettuja ja puhdistettuja biotiiniyhdisteitä. Työssä käytettävä vesi oli MQ PF vettä, jatkossa kaikki vesi tarkoittaa tätä vettä.

### 6.1 Laimennosliuoksen valinta

Testattiin kahta erilaista laimennosliuosta, 5 mM NaCl sekä 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-puskuria, pH 7,40. Liuoksiin valmistettiin laimennossarjat EDTA:sta, 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 mM. Molempiin Liuoksiin valmistettiin kaksi laimennossarjaa, toiseen lisättiin lisäksi 1 µM streptavidini. Laimennoksia pipetoitiin kuoppalevyille 100 µl/kaivo neljänä rinnakkaisena. Laimennosten päälle pipetoitiin kolmea eri pitoisuutta Eu<sup>3+</sup>:β-NTA:TOPO-liuosta vedessä, 1:3:3. Pitoisuudet olivat 0,3; 1; 3 µM. Liuoksia pipetoitiin 2 µl/kaivo. Levyn sekoituksen jälkeen mitattiin fluoresenssi Victor<sup>2</sup>:lla. Liitteessä 1 olevien tulosten perusteella 5 mM NaCl antaa paremman herkkyuden. Jatkotestiin päätettiin ottaa pitoisuudet 0,3 ja 1 µM, sillä 3 µM kaikki tulokset olivat nollatason lähellä.

### 6.2 Eu<sup>3+</sup>-kelaatin lisäysmenetelmän valinta

Tässä testissä testattiin erilaisia pitoisuuksia ja tapoja lisätä Eu<sup>3+</sup>-kelaatti. Taulukossa 1 on listattuna Eu<sup>3+</sup>-kelaattiliuokset.

Taulukko 1.  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuokset.

<b>Liuos</b>	<b>Pitoisuus</b>	<b>Kelaatin koostumus</b>
<b>1</b>	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:3:3
<b>2</b>	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:1:3
<b>3</b>	1 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:1:3
<b>4</b>	1 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$
	3 $\mu\text{M}$	$\beta$ -NTA:TOPO 1:1
<b>5</b>	1 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$
	30 $\mu\text{M}$	$\beta$ -NTA:TOPO 1:1
<b>6</b>	1 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$
	300 $\mu\text{M}$	$\beta$ -NTA:TOPO 1:1
<b>7</b>	0,1 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$
	30 $\mu\text{M}$	$\beta$ -NTA:TOPO 1:1

Kuoppalevyn kaivoihin pipetoitiin neljänä rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  EDTA-laimennoksia 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 mM, jotka oli tehty 5 mM NaCl:iin. Näiden päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$   $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuoksia. Liuoksia, joissa  $\text{Eu}^{3+}$  ja  $\beta$ -NTA:TOPO olivat erikseen, lisättiin 2  $\mu\text{l}$   $\text{Eu}^{3+}$ -liuosta ja tämän jälkeen 2  $\mu\text{l}$   $\beta$ -NTA:TOPO –liuosta. Levyn sekoituksen jälkeen mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla. Tulosten perusteella, parhaaksi menetelmäksi osoittautui liuos 6, eli 1  $\mu\text{M}$   $\text{Eu}^{3+}$  2  $\mu\text{l}$ /kaivo + 300  $\mu\text{M}$  NTA:TOPO 2  $\mu\text{l}$ /kaivo, sillä tällä liuoksella saatiin signaali laskemaan luokkaan tuhansia, joka erottuu nollasignaalista, muttei ole liian pieni, jotta se hukkuisi tyhjän levyn aiheuttamaan signaaliin.

Testi toistettiin vielä uudestaan liuosten 5, 6 ja 7 osalta. EDTA-laimennoksia 0; 1; 10; 100; 1000; 10 000; 100 000 nM 5 mM NaCl:ssa pipetoitiin kuoppalevyille 100 µl/kaivo kolmena rinnakkaisena.  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuoksia pipetoitiin kaivoihin 2 µl  $\text{Eu}^{3+}$  ja 2 µl NTA:TOPO. Sekoituksen jälkeen mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla. Tulosten perusteella myös tässä testissä liuos 6 osoittautui parhaaksi, eli laskemaan signaalia luokkaan tuhansia.

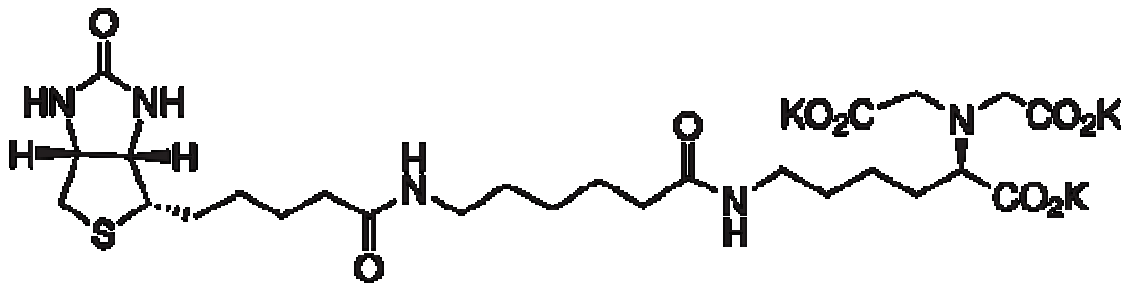
### 6.3 Muiden yhdisteiden testaus

Testattiin menetelmää sitruunahapolla, EDTA:lla, biotiinilla, DTPA:lla, epomiinilla ja aminobiotiinilla. Jokaista yhdistettä laimennettiin 5 mM NaCl:iin 0; 1; 10; 100; 1000 ja 10 000 nM:seksi. Sitruunahappo, EDTA, biotiini ja DTPA tehtiin lisäksi vielä 5 mM NaCl-liuokseen, johon oli lisätty 0,005 mM NaOH. NaOH:n lisäyksellä varmistettiin, että mahdollinen signaalilasku todella johtuu  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin kelatoinnista EDTA:han ja DTPA:han eikä vain pH:n laskusta. EDTA ja DTPA ovat happoja ja suurilla pitoisuuksilla myös vesiliuos on hapan. Koska  $\text{Eu}^{3+}$ :β-NTA:TOPO ei ole stabiili alhaisessa pH:ssa, nostettiin NaOH:n avulla pH korkeammaksi.

Laimennoksia pipetoitiin kaivoon 100 µl neljänä rinnakkaisena ja niiden päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM  $\text{Eu}^{3+}$  sekä 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla. Tulosten perusteella signaali laskee EDTA:lla ja DTPA:lla riittävästi, alle signaalin 0,2, muilla ei havaita selkeää signaalin laskua, vaan signaalit pysyvät lähellä nollanäytteen aiheuttamaa signaalia 1,0.

### 6.4 Biotiini-NTA

Biotiini-NTA-kantaliuos valmistettiin Sigma-Aldrichilta tilatusta yhdisteestä ( $N_{\epsilon}$ -( $N$ (+)-biotinyyli-6-aminoheksanoyyli)- $N_{\alpha}$ ,  $N_{\alpha}$ -bis(karboksimetyyli)- $L$ -lysiini trikali-um suola, erä. BCBG1828V). Kuviossa 6 on kuvattu biotiini-NTA:n rakenne. Yhdisteeseen lisättiin 10 M NaOH:a ja vettä.

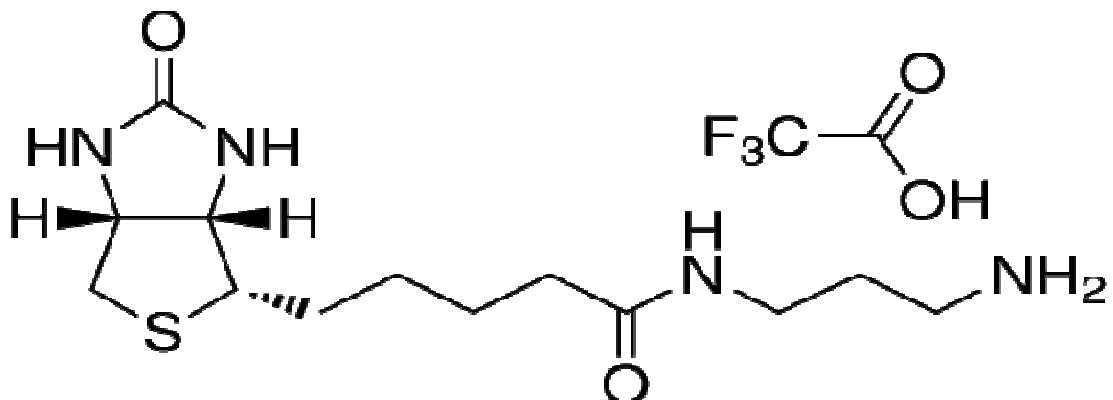


Kuvio 6: Biotiini-NTA:n rakenne (15).

Testattiin biotiini-NTA:ta tekemällä kolme laimennossarjaa, 0; 1; 10; 100; 1000; 10 000 nM. Ensimmäiseen sarjaan ei lisätty streptavidiniä, toiseen lisättiin 10 nM ja kolmanteen 100 nM streptavidiniä. Kontrolliksi laimennettiin DTPA:ta 0; 1; 10; 100; 1000; 10 000 nM 5 mM NaCl:iin. Pipetoitiin laimennoksia kaivoon 100  $\mu$ l neljänä rinnakkaisena ja niiden päälle 2  $\mu$ l 1  $\mu$ M  $\text{Eu}^{3+}$  ja 2  $\mu$ l 300  $\mu$ M  $\beta$ -NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

### 6.5 Biotiini-DTPA

Valmistettiin biotiini-DTPA -liuos, yhdistämällä DTPA aminobiotiiniin. Aminobiotiini (*N*(+)-biotinyyli-3-aminopropyylimmonium trifluoriasetaatti, erä. 0001449303) tilattiin Sigma-Aldrichilta, kuvassa 7 on kuvattu aminobiotiinin rakenne.



Kuvio 7. Aminobiotiinin rakenne (16).



Liuokseen lisättiin aminobiotiinini ja DTPA:n lisäksi 100 mM MES-puskuria, pH 6,0 ja 30 g/l EDACia. Seoksen annettiin reagoida huoneenlämmössä 2 tuntia, jonka jälkeen se siirrettiin jääkaappiin. Seos puhdistettiin HPLC:llä, käyttäen isoa kolonnia 25 cm x 21,2 mm, gradientti asetoniiriili 1-50 % 0-45 min, 20 mM TEAA, injektioilavuus 200 µl. Puhdistuksessa käytettiin isoa kolonnia, jotta saatiin näytettä tarpeeksi puhdistettavaksi. Isoon kolonniin voidaan injektoida noin 1 mg näytettä. Puhdistuksesta kerättiin neljä fraktiota, joista kolme ensimmäistä fraktiota olivat todella lähekkäin.

#### 6.5.1 Puhdistettujen fraktioiden testaus biotiinin ja DTPA:n suhteen

Testattiin puhdistettuja fraktioita biotiinin pitoisuuden suhteen. Kaivoihin pipetoitiin kolmena rinnakkaisena 100 µl ensin biotiinin laimennossarja: 0; 10; 100; 1000 nM ja näiden perään fraktioita, joita laimennettiin suhteessa 1:100, kaikki 5 mM NaCl:iin. Liuosten päälle pipetoitiin 30 nM SA-Alexaa 10 µl, inkuboitiin 15 minuuttia. Tämän jälkeen pipetoitiin 120 nM biotiini-Eu:ta 10 µl ja inkuboitiin 15 minuuttia. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm sekä TRF.

Seuraavaksi testattiin fraktioita DTPA:n pitoisuuden suhteen. Jokaista fraktiota laimennettiin 1:10 000; 1:1000 ja 1:100 5 mM NaCl:iin. Laimennoksia pipetoitiin kaivoon kolmena rinnakkaisena 100 µl, ja näiden päälle 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

Tulosten perusteella fraktiossa 1 on sekä DTPA:ta että biotiinia, joten fraktiota 1 käytetään jatkotesteissä.

#### 6.5.2 Fraktion 1 testaukset streptavidiniin ja biotiinin suhteen

Fraktiota 1 laimennettiin 0; 1:100 000; 1:10 000; 1:1000 5 mM NaCl:iin. Laimennossarjoja tehtiin neljä ja sarjoihin pipetoitiin eri pitoisuuksia streptavidiniä. Streptavidinipitoisuudet olivat 0; 30; 300; 3000 nM. Näitä seoksia pipetoitiin kaivoihin 100 µl kolmena rinnakkaisena. Seosten päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Seuraavassa testissä valmistettiin biotiinista laimennossarja 0; 1; 10; 100; 1000; 10 000 nM 5 mM NaCl:iin. Laimennoksia pipetoitiin neljä rinnakkaista 100 µl kaivoihin kuutena sarjana. Biotiini-DTPA laimennettiin 1:1000 ja 1:100 ja streptavidiini 0; 0,3; 3; 30 µM. Kolmeen biotiinisarjaan pipetoitiin 10 µl 1:1000 biotiini-DTPA-laimennosta ja kolmeen biotiinisarjaan pipetoitiin 10 µl 1:100 biotiini-DTPA-laimennosta. Sarjoihin, joissa on 1:1000 biotiini-DTPA:ta, pipetoitiin streptavidiinia 0; 0,3 ja 3 µM. Sarjoihin, joissa on 1:100 biotiini-DTPA:ta, pipetoitiin streptavidiinia 0; 3 ja 30 µM. Streptavidiinia pipetoitiin myös 10 µl/kaivo. Seosten päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Seuraavassa testissä biotiini laimennettiin 10 µM, biotiini-DTPA 1:300; 1:1000 ja 1:3000 sekä streptavidiini 100; 300; 1000 ja 3000 nM, kaikki tehtiin 5 mM NaCl. Biotiinia pipetoitiin vuorotellen 0 ja 10 µM 100 µl/kaivo neljänä rinnakkaisena. Ensimmäiseen sarjaan ei pipetoitu ollenkaan biotiini-DTPA:ta ja streptavidiinia pipetoitiin 10 µl/kaivo 0; 100; 300; 1000 ja 3000 nM niin, että jokaista pitoisuutta oli sekä 0 että 10 µM biotiinia sisältävissä kaivoissa. Toiseen sarjaan pipetoitiin 1:3000 laimennettua biotiini-DTPA:ta 10 µl/kaivo sekä streptavidiinia 0; 100 ja 300 nM 10 µl/kaivo. Kolmanteen sarjaan pipetoitiin 1:1000 laimennettua biotiini-DTPA:ta 10 µl/kaivo sekä streptavidiinia 0; 300 ja 1000 nM 10 µl/kaivo. Neljännenteen sarjaan pipetoitiin 1:300- laimennettua biotiini-DTPA:ta 10 µl/kaivo sekä streptavidiinia 0; 1000 ja 3000 nM 10 µl/kaivo. Kaikkien seosten päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO:a. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Tulosten perusteella biotiini-DTPA ei toimi kunnolla, koska signaalit eivät laske edes luokkaan kymmeniätuhansia, joten puhdistettiin sitä uudelleen eri parametreilla.

### 6.5.3 Toinen puhdistus ja testaukset

Puhdistettiin HPLC:llä uudestaan biotiini-DTPA:ta. TEAA vaihdettiin 0,1 % TFA:han. Puhdistuksessa käytettiin isoa kolonnia 25 cm x 21,2 mm, gradientti

asetonitrili 1-50 % 0-45 min, koko ajan juoksi 0,1 % TFA, injektiotilavuus oli 200 µl. Puhdistuksesta kerättiin 13 fraktiota.

Fraktioita testattiin biotiinipitoisuuden osalta seuraavasti. Ensin laimennettiin biotiini 10 nM ja jokaista fraktiota 1:100 1x PBS:ään. Levyille pipetoitiin ensin pelkkä puskuri, sitten 10 nM biotiini ja seuraavaksi fraktiolaimennokset 100 µl/kaivo kolme rinnakkaista. Näiden päälle pipetoitiin 10 µl 30 nM SA-Alexaa, inkuboitiin 15 minuuttia ja pipetoitiin 10 µl 120 nM biotiini-Eu:a. Inkuboitiin vielä 15 minuuttia ja mitattiin TRF ja Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

DTPA:n havaitsemiseen fraktioista laimennettiin fraktioita 1:350 5 mM NaCl:iin ja pipetoitiin 100 µl/kaivo kolme rinnakkaista. Päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Testien tulosten perusteella fraktioissa 1-9 on DTPA:ta ja fraktioissa 6 ja 8 on biotiinia, joten fraktiot 6 ja 8 otettiin jatkotesteihin.

#### 6.5.4 Fraktioiden 6 ja 8 testaukset

Laimennettiin biotiinia 100 µM, fraktioita 6 ja 8 1:100; 1:1000; 1:10 000 ja streptavidiinia 300 ja 3000 nM. Biotiini laimennettiin 5 mM NaCl:iin, biotiini-DTPA ja streptavidiini veteen. Biotiinia pipetoitiin levyille 0 tai 100 µM 100 µl/kaivo kolme rinnakkaista. Biotiini-DTPA:ta pipetoitiin 0; 1:100; 1:1000 ja 1:10 000 10 µl/kaivo. Streptavidiinia pipetoitiin 0; 300 ja 3000 nM 10 µl/kaivo. Näiden päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Seuraavassa testissä tehtiin biotiinista laimennossarja 0; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 ja 10 nM 1x PBS:ään, jossa oli lisäksi 0,1 g/L BSA:ta. Fraktioita laimennettiin 1:100 000; 1:30 000; 1:10 000; 1:3000; 1:1000; 1:300; 1:100 1 x PBS:ään, jossa oli lisäksi 0,1 g/L BSA:ta. Laimennoksia pipetoitiin 100 µl/kaivo kolme rinnakkaisista. Päälle pipetoitiin 10 µl/kaivo 30 nM SA-Alexaa ja inkuboitiin 15 minuuttia. Pipetoitiin vielä päälle 10 µl 120 nM biotiini-Eu:ta ja inkuboitiin vielä 15 minuut-

tia. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm ja TRF. Tulosten perusteella fraktiossa 8 näkyy signaalin laskua, joten testattiin sitä vielä lisää.

### **Fraktion 8 lisätesti**

Laimennettiin DTPA:ta 0; 3; 10; 30; 100; 300 nM ja fraktiota 8 1:10 000; 1:3000; 1:1000; 1:300; 1:100 5 mM NaCl:iin. Pipetoitiin levyille 100 µl/kaivo neljänä rinnakkaisena ja päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM Eu<sup>3+</sup> ja 2 µl 300 µM β-NTA:TOPO. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

### **6.6 Eu<sup>3+</sup>-kelaatin lisätestejä**

Koska signaalit eivät näyttäneet laskevan riittävästi, testattiin vielä uudestaan erilaisia kelaattiliuoksia pitoisuuden ja lisäystavan parantamiseksi. Kaikki testit aloitettiin samoin, eli kaivoihin pipetoitiin: neljänä rinnakkaisena 100 µl 0/10 µM biotiinia 2 mM HEPES-puskurissa, pH 7,8, 10 µl 0/100 nM streptavidini sekä 10 µl 0/1:500 biotiiniligandi. Biotiiniligandin valmistus ja puhdistus on kuvattu seuraavassa kappaleessa. Ensimmäiseen sarjaan pipetoitiin vielä 10 µl 70 mM HCl:ää, jotta saatiin testattua myös pH:n vaikutusta. Eu<sup>3+</sup>-kelaattiliuokset on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2.  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuokset.

Liuos	Pitoisuus	
1	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27
2	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27
3	2 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA 1:9
4	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ :TTA:TOPO 1:27:27
5	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ :TTA:TBPO 1:9:9

Kaikki välilaimennokset valmistettiin DMSO:hon ja loppulaimennokset valmistettiin veteen. Kelaattiliuoksia pipetoitiin sarjojen päälle 2  $\mu\text{l}$ . Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Vertailtiin myös erilaisia olosuhteita lisäyksille. Pipetoitiin 100  $\mu\text{l}$  kaivoihin neljänä rinnakkaisena EDTA ja DTPA 0; 1; 10; 100; 1000; 10 000; 100 000 nM. EDTA:n päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$ /kaivo 0,3  $\mu\text{M}$   $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27. DTPA:n päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$   $\text{Eu}^{3+}$  ja 2  $\mu\text{l}$  300  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NTA:TOPO, näitä sarjoja tehtiin kaksi. Toista sarjaa inkuboitiin 15 minuuttia ennen  $\beta$ -NTA:TOPO –liuoksen lisäystä. Lisäksi tehtiin vielä kolmas sarja, jonka päälle pipetoitiin 0,3  $\mu\text{M}$   $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Seuraavaksi testattiin laimennosliuoksen vaikutusta. Testattiin siis laimennoksia vedessä, DMSO-vesi-seoksessa, sekä DMSO:ssa. Samalla testattiin pitoisuuden vaikutusta, veteen tehty  $\beta$ -NTA:TOPO-liuos laimennettiin 90  $\mu\text{M}$ , muut liuokset olivat pitoisuudeltaan 300  $\mu\text{M}$ . DTPA laimennettiin 10  $\mu\text{M}$  ja pipetoitiin kaivoon kolmena rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  0; 10  $\mu\text{M}$  DTPA. Päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$   $\text{Eu}^{3+}$  ja 2  $\mu\text{l}$  90  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NTA:TOPO. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla. Testin

perusteella veteen tehty  $\beta$ -NTA:TOPO laskee signaalia parhaiten ja 90  $\mu$ M pitoisuus laskee signaalia paremmin kuin 300  $\mu$ M pitoisuus.

## 6.7 Biotiiniligandin valmistus ja puhdistus

Biotiiniligandin valmistus aloitettiin puhdistamalla biotiini-T7-Eu, joka on seitsemänhampainen Eu-leimattu biotiini. Biotin-T7-Eu puhdistettiin HPLC:llä käyttäen pientä kolonnia 15 cm x 4,6 mm, gradienttina metanoli 2-60 % 0-58 min, koko ajan juoksi 20 mM TEAA. Käyttäen puhdistuksessa pientä kolonnia, saadaan parempi erotuskyky. Biotiini-T7-Eu kerättiin talteen yhteen fraktioon. Puhdistuksen jälkeen irrotettiin Eu biotiini-T7-Eu:sta lisäten eri pitoisuuksia HCl:ää, menen koko ajan väkevämpään pitoisuuteen. Irtoamista tarkasteltiin UV-valossa. Eu loistaa UV-valossa punaisena. Kun liuos muuttui värittömäksi, oli Eu irronnut. Biotiiniligandi puhdistettiin uudelleen samalla ohjelmalla, tällä kertaa käyttäen TEAA:n tilalla 0,5 % TFA:ta, jotta irronnut Eu saatiin pois liuoksesta.

### 6.7.1 Biotiiniligandin testaukset

Laimennettiin DTPA:ta 200 nM. Biotiiniligandia laimennettiin 1:10<sup>6</sup>; 1:10<sup>5</sup>; 1:10<sup>4</sup>; 1:10<sup>3</sup> ja 1:10<sup>2</sup> 5 mM NaCl:iin. Pipetoitiin laimennoksia kaivoihin 100  $\mu$ l neljä rinnakkaista. Päälle pipetoitiin 2  $\mu$ l 1  $\mu$ M Eu<sup>3+</sup> ja 2  $\mu$ l 300  $\mu$ M  $\beta$ -NTA:TOPO. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

Laimennettiin biotiini 10  $\mu$ M 5 mM NaCl:iin. Laimennettiin streptavidini 0; 30; 300 ja 3000 nM veteen sekä biotiiniligandi 0; 1:1000 ja 1:100 veteen. Pipetoitiin levyille neljänä rinnakkaisena 100  $\mu$ l 0/10  $\mu$ M biotiini, 10  $\mu$ l 0; 30; 300 ja 3000 nM streptavidini ja 10  $\mu$ l 0; 1:1000 ja 1:100 biotiiniligandi. Päälle pipetoitiin 2  $\mu$ l/kaivo 1  $\mu$ M Eu<sup>3+</sup> ja 2  $\mu$ l 300  $\mu$ M  $\beta$ -NTA:TOPO. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

Laimennettiin biotiini 0; 0,1; 0,3; 1; 3 ja 10 nM 5 mM NaCl:iin, jossa lisäksi 0,1 g/L BSA:ta. Biotiiniligandi laimennettiin 1:10<sup>6</sup>; 3:10<sup>5</sup>; 1:10<sup>5</sup>; 3:10<sup>4</sup>; 1:10<sup>4</sup>; 3:10<sup>3</sup> ja 1:10<sup>3</sup> 5 mM NaCl:iin, jossa lisäksi 0,1 g/L BSA:ta. Pipetoitiin laimennoksia 100

$\mu\text{l}$ /kaivo neljänä rinnakkaisena. Päälle pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$ /kaivo 30 nM SA-Alexa ja inkuboitiin 15 minuuttia. Tämän jälkeen pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$  120 nM biotiini-Eu:ta ja inkuboitiin taas 15 minuuttia. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla TRF ja Nano Eu norm.

#### 6.7.2 TFA:n haihdutus

Testattiin TFA:n vaikutusta mittaustuloksiin. Pipetoitiin kaivoihin neljänä rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  5 mM NaCl, 10  $\mu\text{l}$  0; 1:100 ja 1:10 biotiiniligandia, 100 ja 1000 nM DTPA sekä 1:100 ja 1:10 0,1 % TFA. Päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  0,3  $\mu\text{M}$  Eu<sup>3+</sup>: $\beta$ -NTA:TOPO 1:3:3 tai 2  $\mu\text{l}$  0,3  $\mu\text{M}$  Eu<sup>3+</sup>: $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27. Tehtiin sama testi myös HEPES-puskurilla, eli aluksi 100  $\mu\text{l}$  2 mM HEPES-puskuria, pH 7,8, muuten samoin. Päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  0,3  $\mu\text{M}$  Eu<sup>3+</sup>: $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

Tulosten perusteella TFA nosti signaalia korkeammaksi kuin biotiiniligandi, joten haihdutettiin HetoVacilla TFA pois biotiiniligandista. Putken sisältö haihdutettiin kuiviin, eli samalla haihtui pois metanoli ja vesi. Pipetoitiin kaivoon neljänä rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  5 mM NaCl, 10  $\mu\text{l}$  0 ja 100  $\mu\text{M}$  DTPA; 1:220 ja 1:22 haihdutettu biotiiniligandi; 1:220 ja 1:22 haihdutettu TFA; 1:100 ja 1:10 biotiiniligandi sekä 1:100 ja 1:10 TFA. Päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$  Eu<sup>3+</sup> ja 2  $\mu\text{l}$  90  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NTA:TOPO. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

Pipetoitiin kaivoon neljänä rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  0; 10  $\mu\text{M}$  biotiini 5 mM NaCl:ssa, 10  $\mu\text{l}$  0; 1:100 haihdutettu biotiiniligandi; 1:45 haihduttamaton biotiiniligandi sekä 10  $\mu\text{l}$  0; 500 nM streptavidini. Päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$  Eu<sup>3+</sup> ja 2  $\mu\text{l}$  90  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NTA:TOPO. Mitattiin Victor<sup>2</sup>:lla Nano Eu norm.

#### **Biotiiniligandin testaus liuoksilla EuCl<sub>3</sub> + erilaisilla molekyyileilla**

Pipetoitiin kaivoon neljänä rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  0; 10  $\mu\text{M}$  biotiini 5 mM NaCl:ssa, 10  $\mu\text{l}$  0; 1:100 haihdutettu biotiiniligandi sekä 10  $\mu\text{l}$  0; 500 nM streptavidini. Päälle pipetoitiin 2  $\mu\text{l}$  taulukossa 3 listattuja seoksia sekä näiden päälle 2  $\mu\text{l}$  90  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NTA:TOPO.

Taulukko 3.  $\text{Eu}^{3+}$ -liuokset.

Liuos	Pitoisuus	
1	1 $\mu\text{M}$	$\text{EuCl}_3$
2	1 $\mu\text{M}$	$\text{EuCl}_3$ + EDTA
3	1 $\mu\text{M}$	$\text{EuCl}_3$ + DTPA
4	1 $\mu\text{M}$	$\text{EuCl}_3$ + $\beta$ -NTA
5	0,3 $\mu\text{M}$	$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:3:3

Seosten 4 ja 5 lisäysten jälkeen mitattiin heti Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla, muut mitattiin  $\beta$ -NTA:TOPO-lisäysten jälkeen. Mittausten jälkeen pipetoitiin kaivoihin 10  $\mu\text{l}$  1 mM HCl, ja mitattiin uudestaan Nano Eu norm. Mittausten jälkeen lisättiin vielä 10  $\mu\text{l}$  10 mM HCl ja mitattiin vielä uudestaan Nano Eu norm.

### 6.8 Detergenttien ja puskurien testaus

Testattiin pieneneekö signaalien hajonta käyttämällä detergenttiä. Detergentit vähentävät epäspesifistä sitoutumista. Detergentti voi myös vaikuttaa epäspesifiin vuorovaikutuksiin pitämällä  $\beta$ -NTA:n ja TOPO:n liukoisempana, jotteivat ne sitoutuisi streptavidiniin tai kaivon reunoille epäspesifisesti. Ne voivat myös muodostaa  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin kanssa suurempia rakenteita tai muuttaa streptavidinin pintaa niin, että sitoutunut ligandi pysyisi paremmin suojassa ja  $\text{Eu}^{3+}$ -ioni ei löydä sitä.

Kaivoihin pipetoitiin neljänä rinnakkaisena 100  $\mu\text{l}$  0 tai 10  $\mu\text{M}$  biotiinia 2 mM HEPES-puskurissa, pH 7,8, 10  $\mu\text{l}$  300 nM streptavidinia ja 10  $\mu\text{l}$  0 tai 1:100 biotiiniligandia. Inkuboitiin levyä 10 minuuttia ja pipetoitiin päälle 0 tai 2  $\mu\text{l}$  300 tai 3000 nM  $\beta$ -NTA:TOPO 1:1 tai 0 tai 10  $\mu\text{l}$  0,1 mM Triton X-100 tai 5 mM SDS



tai 1 mM CTAB tai 0,1 g/l BSA. Viimeiseksi pipetoitiin vielä 2 µl 0,3 µM  $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:3:3 jokaiseen kaivoon. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

Testattiin myös uudestaan puskurien vaikutusta keskihajontaan. Pipetoitiin kaivoihin neljänä rinnakkaisena 100 µl 0 tai 1 µM biotiini 5 mM NaCl:ssa, 10 µl 0 tai 300 nM streptavidiini ja 10 µl 0; 1:100 ja 1:10 biotiiniligandi. Seosten päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM  $\text{Eu}^{3+}$  ja 2 µl 300 µM  $\beta$ -NTA:TOPO 1:1 5 mM NaCl:ssa tai 2 µl 300 µM  $\beta$ -NTA:TOPO 1:1 Triton X-100:ssa.

Toiselle levyille pipetoitiin kaivoihin neljänä rinnakkaisena 100 µl 0 tai 1 µM biotiini 5 mM HEPES-puskurissa, 10 µl 0 tai 300 nM streptavidiini, 10 µl 0; 1:100 ja 1:10 biotiini-ligandi. Seosten päälle pipetoitiin 2 µl 1 µM  $\text{Eu}^{3+}$  ja 2 µl 300 µM  $\beta$ -NTA:TOPO, molemmat vedessä. Mitattiin molemmista levyistä Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

## 6.9 QRET

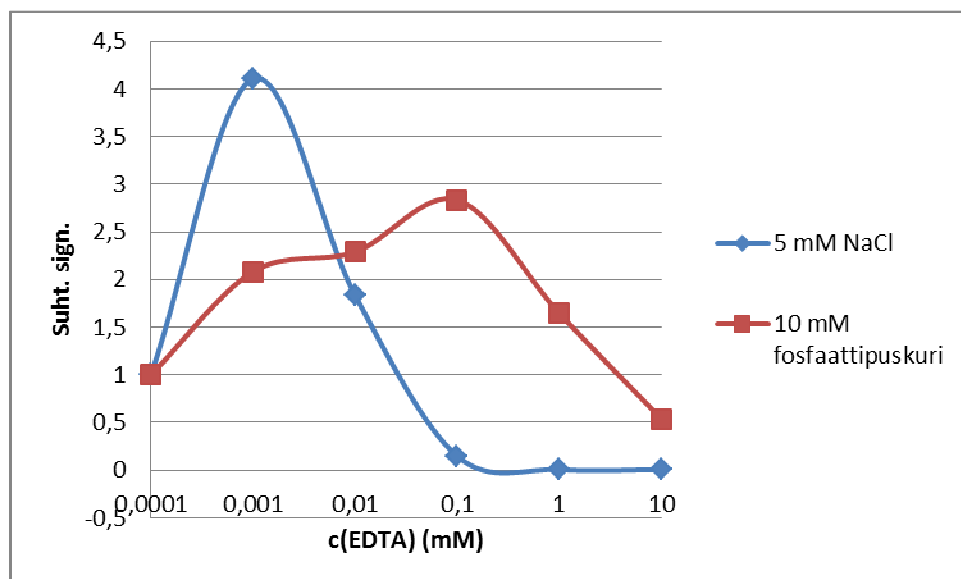
Lopuksi testattiin QRET-menetelmä vertailuksi menetelmän toimivuudesta. Kaivoon pipetoitiin neljänä rinnakkaisena 100 µl 0; 10 µM biotiini 5 mM HEPES + 150 mM NaCl –puskurissa, pH = 7, 10 µl 0,1; 1 µM streptavidiini vedessä. Inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä. Seuraavaksi pipetoitiin 10 µl 100 nM biotiini-Eu 7 tai 9 vedessä ja 10 µl 50 µM orgaanista sammuttajamolekyylia rhodamiini 800 vedessä. Käytetty biotiini-Eu oli sama kuin biotiiniligandin valmistuksessa käytetty,  $\text{Eu}^{3+}$ -ionia ei kuitenkaan ole tässä irrotettu. Mitattiin Nano Eu norm Victor<sup>2</sup>:lla.

## 7 TULOKSET

Seuraavissa kappaleissa on esitetty testien tulokset ja pohdintaa niiden pohjalta. Osa tuloksista on esitetty suhteellisina signaaleina. Suhteellinen signaali saatiin jakamalla näytteen signaali nollanäytteen signaalilla. Nollanäytteenä oli yleensä pelkkä käytettävä puskuri. Nollanäytteen suhde oli siis aina yksi. Loput tulokset on esitetty varsinaisina signaaleina taulukoissa.

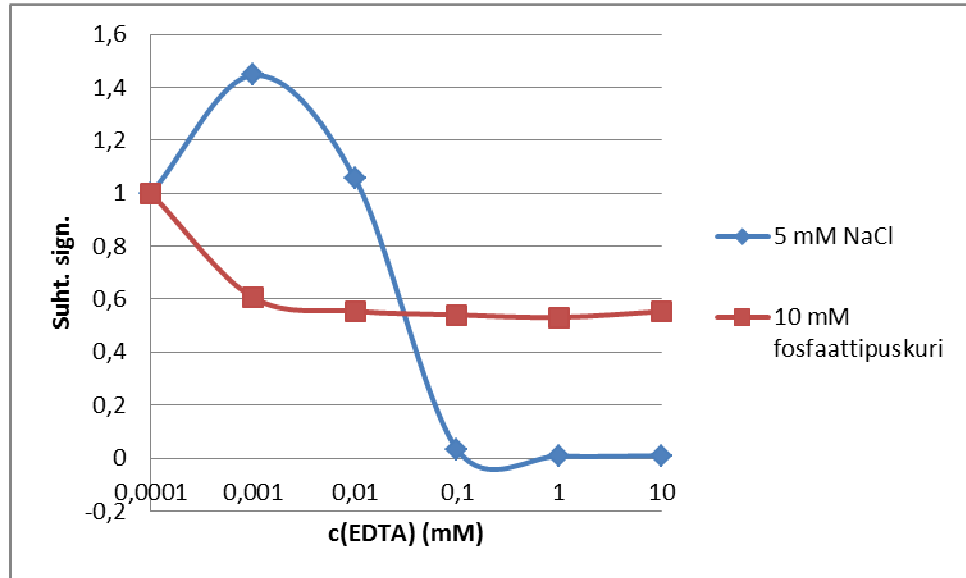
### 7.1 Laimennosliuoksen valinta

Toimiakseen menetelmä vaatii suolapitoisen liuoksen. Tässä testissä testattiin NaCl-liuosta sekä Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-puskuria. Samalla testattiin myös kolme eri pitoisuutta Eu<sup>3+</sup>-kelaattia. Kuvioissa 8-13 on esitetty liuosten suhteelliset signaalit eri Eu<sup>3+</sup>-kelaatin pitoisuuksilla sekä streptavidiinipitoisuuksilla.



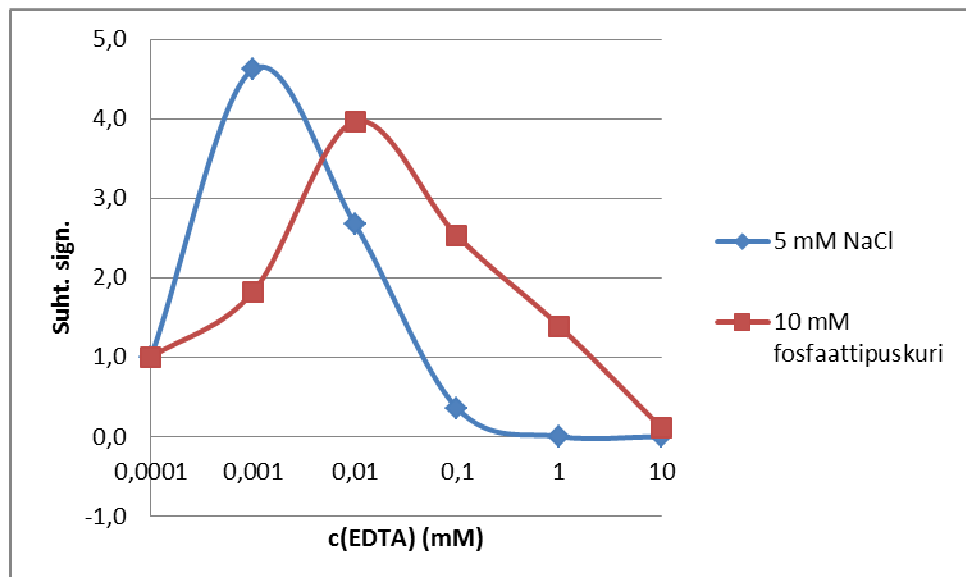
Kuvio 8. Laimennosliuosten vertailu Eu<sup>3+</sup>-pitoisuudella 0,3 μM.

Kuviossa 8 on esitetty liuosten suhteelliset signaalit streptavidiinipitoisuuden ollessa 0 ja Eu<sup>3+</sup>-pitoisuudella 0,3 μM.



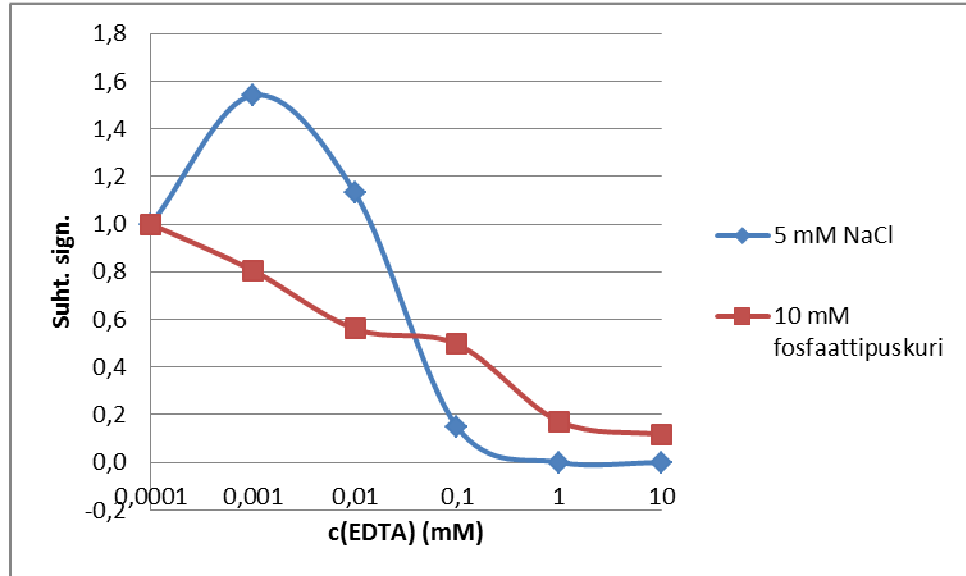
Kuvio 9. Laimennosliuosten vertailu SA-pitoisuudella 10 nM,  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 0,3  $\mu\text{M}$ .

Kuviossa 9 nähdään, että lisättäessä joukkoon streptavidinia fosfaattipuskurin signaali muuttuu melko tasaiseksi. Tästä voidaan jo päätellä, että näistä liuoksista NaCl on parempi, koska signaali muuttuu EDTA:n pitoisuuden kasvaessa, kuten oletettiin.



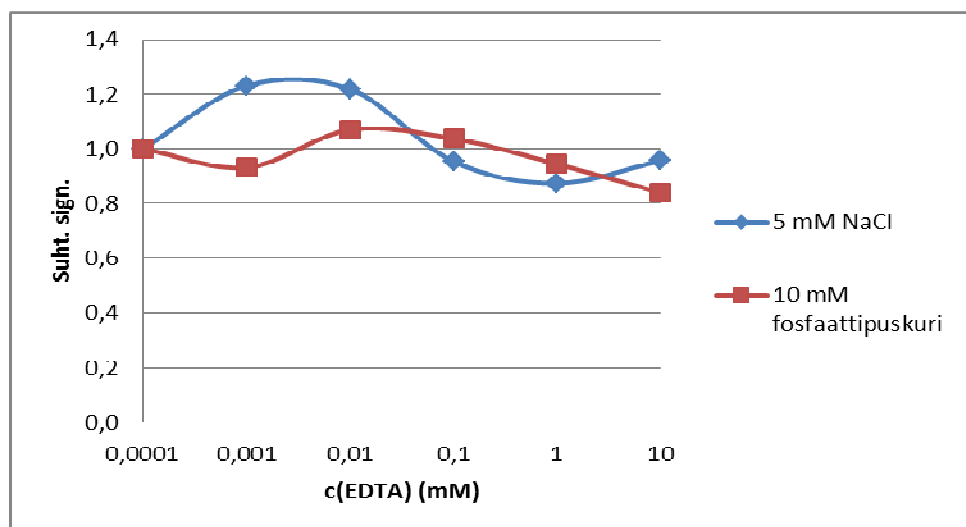
Kuvio 10. Laimennosliuosten vertailu  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 1  $\mu\text{M}$ .

Kuvioista 8 ja 10 nähdään, että NaCl vaikuttaa molemmissa lähes samalla tavalla, eli signaali laskee EDTA:n pitoisuuden kasvaessa. Fosfaattipuskurilla signaali myös laskee, muttei ihan yhtä nopeasti.



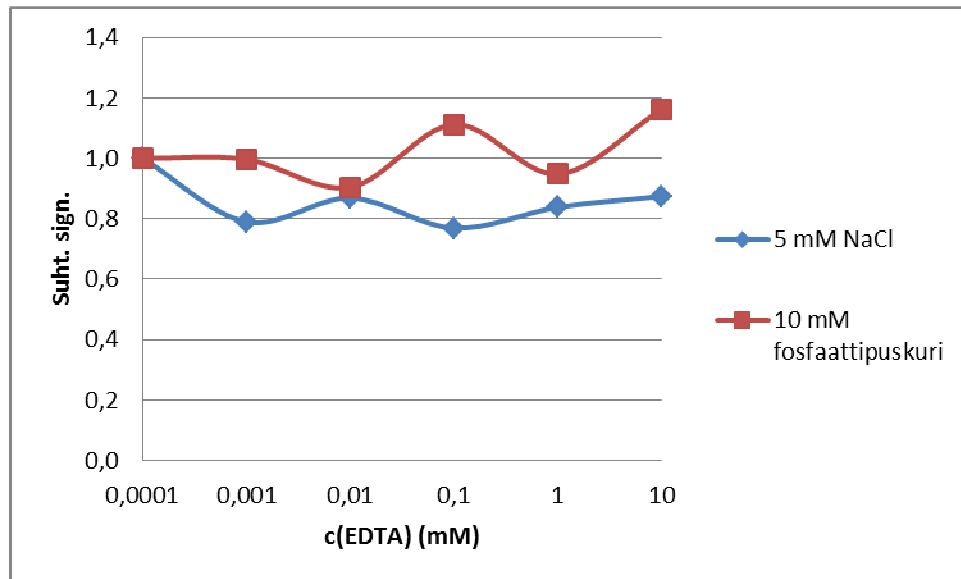
Kuvio 11. Laimennosliuosten vertailu SA-pitoisuudella 10 nM,  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 1  $\mu\text{M}$ .

Kuviossa 11 fosfaattipuskurin signaali tasoittuu hieman, samoin kuin kuviossa 9. Tästä voidaan päätellä, että NaCl on parempi laimennosliuos seuraaviin testeihin, sillä streptavidiinin lisäys ei vaikuta merkittävästi signaaliin.



Kuvio 12. Laimennosliuosten vertailu  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella 3  $\mu\text{M}$ .

$\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuuden noustessa  $3 \mu\text{M}$  signaalit ovat lähellä nollanäytettä, mikä ei ole toivottavaa. Näin ollen  $3 \mu\text{M}$  on liian korkea pitoisuus.



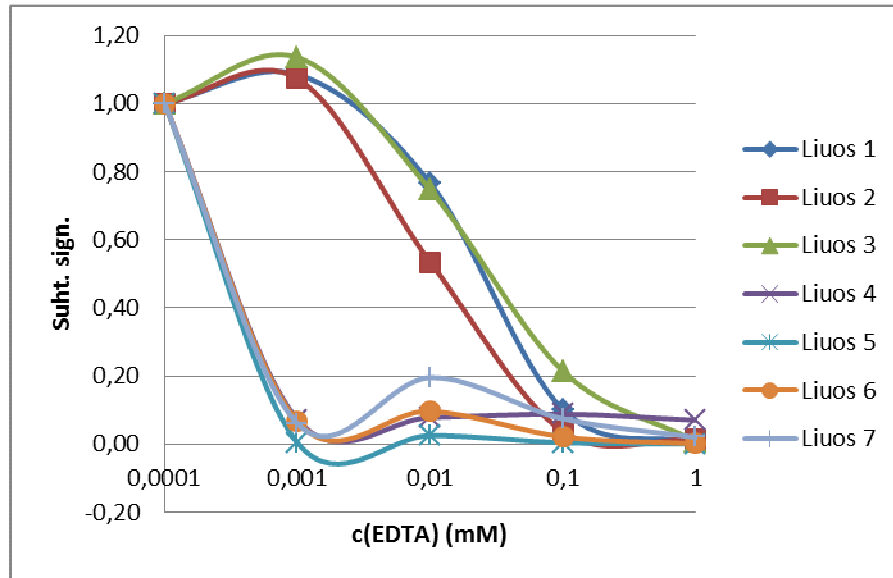
Kuvio 13. Laimennosliuosten vertailu SA-pitoisuudella  $10 \text{ nM}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella  $3 \mu\text{M}$ .

Kuviosta 13 nähdään, että myös streptavidiniä lisättäessä signaalit pysyvät nollanäytteen tuntumassa  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuuden ollessa  $3 \mu\text{M}$ . Seuraavista testeistä jätetään siis  $3 \mu\text{M}$  pitoisuus pois, koska se on liian korkea pitoisuus. Signaalin halutaan laskevan EDTA-pitoisuuden noustessa alle  $0,4$ .  $\text{Eu}^{3+}$ -pitoisuudella  $3 \mu\text{M}$  signaalit pysyttelevät lähellä tasoa  $1,0$ , jolloin ne eivät erotu taustasignaalisista.

## 7.2 $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin lisäysmenetelmän testaus

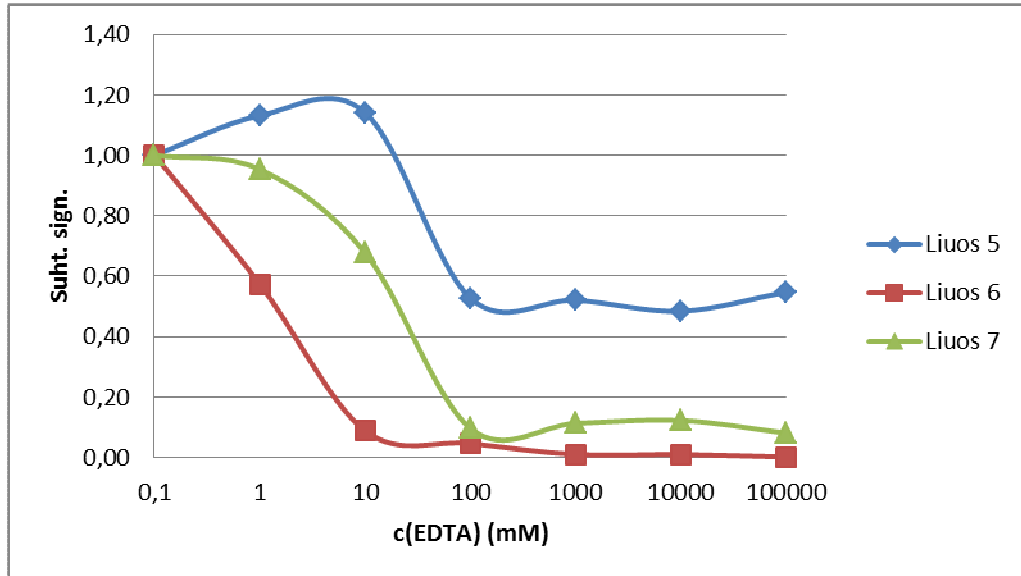
$\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin lisäysmenetelmättestissä testattiin seitsemää eri liuosta, liuokset on lueteltu taulukossa 1. Testin tulokset on esitelty kuviossa 14. Kaikki liuokset piirrettiin samaan kuvaajaan. Edellisen testin perusteella pitoisuuksiksi valittiin  $0,3 \mu\text{M}$  ja  $1 \mu\text{M}$ . Liuoksissa, joissa  $\text{Eu}^{3+}$  ja  $\beta\text{-NTA:TOPO}$  lisättiin erikseen,  $\beta\text{-NTA:TOPO}$ :n pitoisuudet määriteltiin lisäämällä 1-, 10- ja 100-kertainen määrä verrattuna  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin pitoisuuteen. Liuosten erikseen lisäämistä päätettiin kokeilla, jotta nähdään tuottaako tämä eroa verrattuna kaikkien lisäämiseen kerral-

la. Ideana oli, että  $\beta$ -NTA:TOPO saattaa kelatoida  $\text{Eu}^{3+}$ :n jo ennen niiden lisäämistä varsinaiseen näytteeseen. Kun ne lisätään erikseen,  $\text{Eu}^{3+}$  ehtii sitoutua mahdolliseen modifioituun molekyyliin.



Kuvio 14.  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattiliuosten suhteelliset signaalit.

Kuvion 14 osoittamien tulosten perusteella saatiin ero sille, lisätäänkö  $\text{Eu}^{3+}$  ja  $\beta$ -NTA:TOPO yhdessä vai erikseen. Yhdessä lisättäessä EDTA ei pysty irrottamaan  $\text{Eu}^{3+}$ -ionia  $\beta$ -NTA- ja TOPO-ligandeista. Kun EDTA sekoitetaan ensin  $\text{Eu}^{3+}$ -liuoksen kanssa,  $\beta$ -NTA ja TOPO eivät pysty enää sitoutumaan  $\text{Eu}^{3+}$ -ioniin tai irrottamaan sitä  $\beta$ -NTA- ja TOPO-ligandeista. Liuoksissa 1, 2 ja 3 signaalit nousevat korkealle ja näissä nimenomaan lisätään kaikki yhdessä  $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO-liuoksena. Liuoksessa 4 signaali on jokaisella EDTA:n pitoisuudella liian matala, joten sitä ei kannata käyttää, signaalit eivät eroa kunnolla taustasignaalista. Jatkotestiin otetaan siis liuokset 5, 6 ja 7.

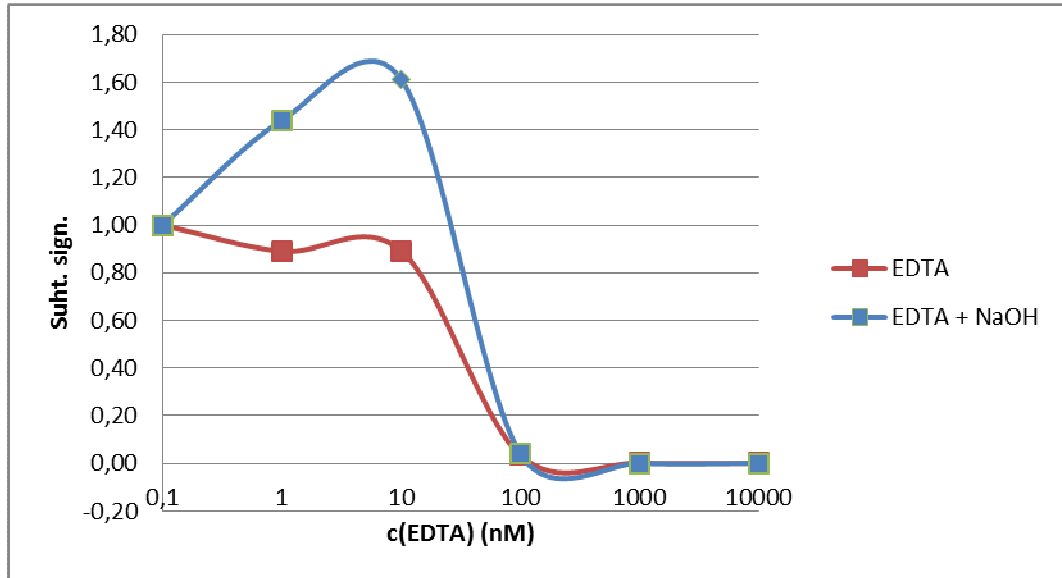


Kuvio 15.  $\text{Eu}^{3+}$ -liuosten jatkotesti.

Jatkotestiin lisättiin testattavia EDTA:n pitoisuuksia, jotta saadaan useampi mitauspiste. Liuoksessa 6 signaali laskee kaikkein lineaarisimmin ja oikeat signaalit ovat sopivaa suuruusluokkaa. Liuoksen 5 oikeat signaalit ovat liian pieniä, jolloin ne hukkuvat taustasignaaliin. Myös liuoksen 7 viimeisten pitoisuuksien kohdalla oikeat signaalit ovat liian matalia, eli signaali laskee liian nopeasti. Näiden tulosten perusteella jatkotesteissä  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatti lisätään kahtena liuoksena,  $1 \mu\text{M}$   $\text{Eu}^{3+}$  ja  $300 \mu\text{M}$   $\beta\text{-NTA:TOPO}$ .

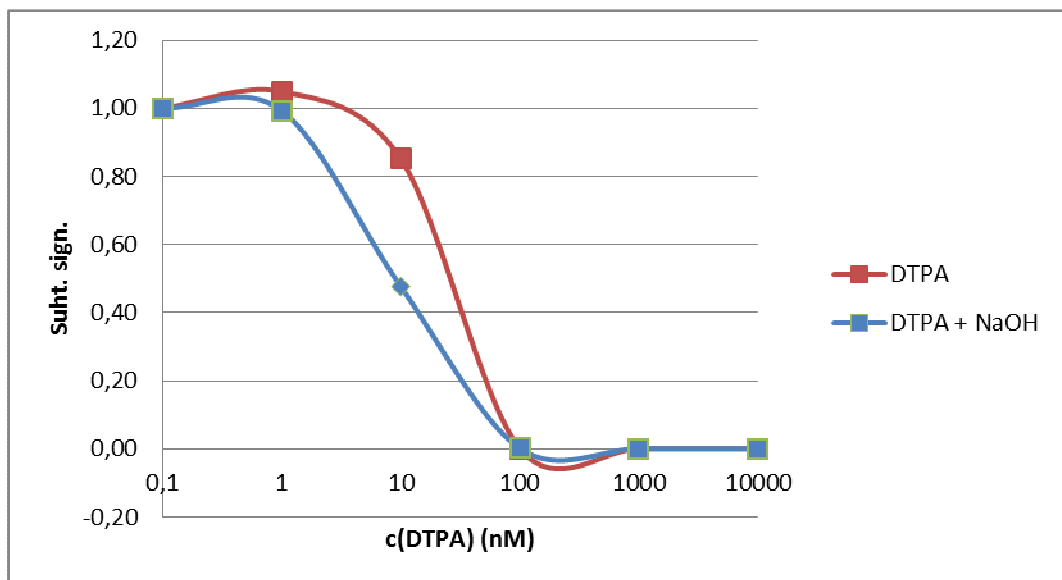
### 7.3 Muiden yhdisteiden testaus

Seuraavassa kappaleessa esitellään muiden yhdisteiden testien tulokset. EDTA:n, DTPA:n, sitruunahapon ja biotiinin testit tehtiin niin, että puskuriin lisättiin myös  $0,005 \text{ mM}$   $\text{NaOH}$ :ia ja selvitettiin, onko sillä jotain vaikutusta. Epomiinit ja aminobiotiini testattiin pelkästään puskurilla, ilman  $\text{NaOH}$ :ia.



Kuvio 16. EDTA:n suhteelliset signaalit.

Kuviossa 16 on esitetty EDTA:n tulokset. Signaali laskee hyvin EDTA:n pitoisuuden kasvaessa, vaikka se aluksi nouseekin. Signaali on lähellä nollaa viimeisillä pitoisuuksilla, mutta varsinaisista signaaleista nähdään, etteivät signaalit kuitenkaan ole liian pieniä.

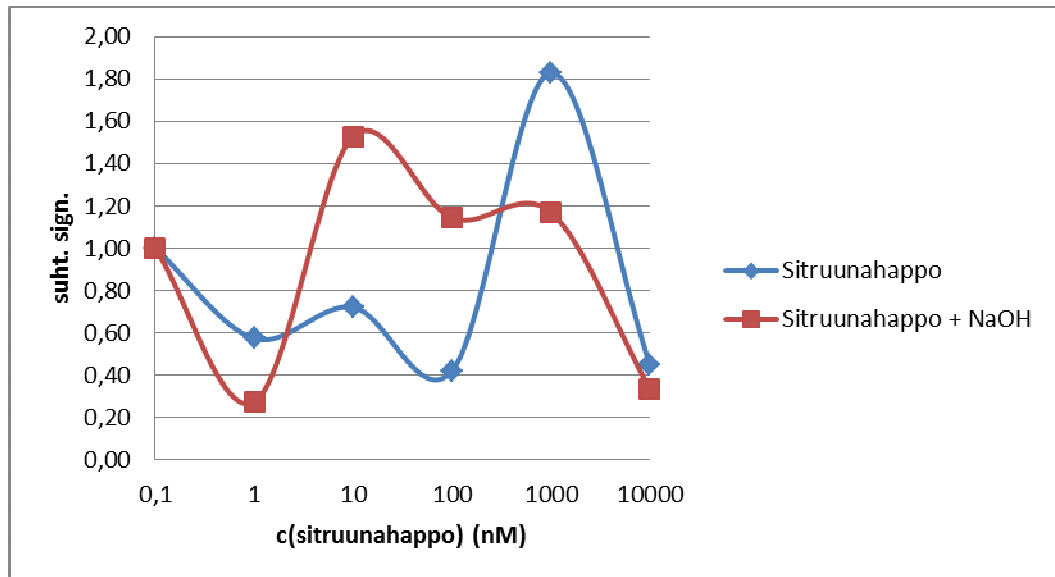


Kuvio 17. DTPA:n suhteelliset signaalit.

Kuviossa 17 on esitetty DTPA:n tulokset. Signaalit laskevat hyvin molemmissa tapauksissa, loppupitoisuuksilla ollaan lähellä nollaa. Varsinaisista signaaleista

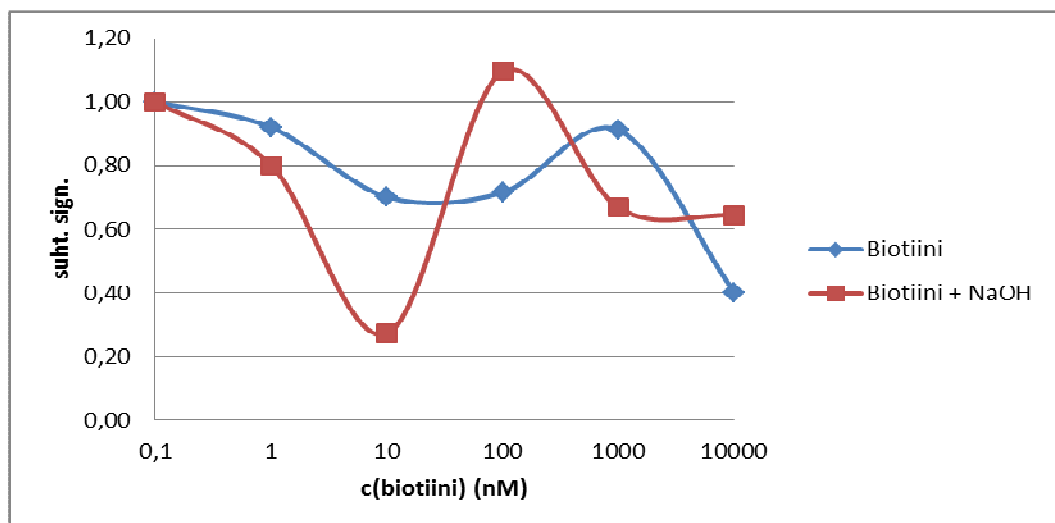


nähdään, etteivät signaalit kuitenkaan ole liian pieniä. NaOH:n lisäys ei juurikaan muuta tulosta, joten tästä voidaan päätellä, että todella on kyse koordinaatiosidosten muodostumisesta, eikä pH:n laskusta. Suurilla pitoisuuksilla tosin voi olla kyse sekä koordinaatiosidosten muodostumisesta että pH:n laskusta.



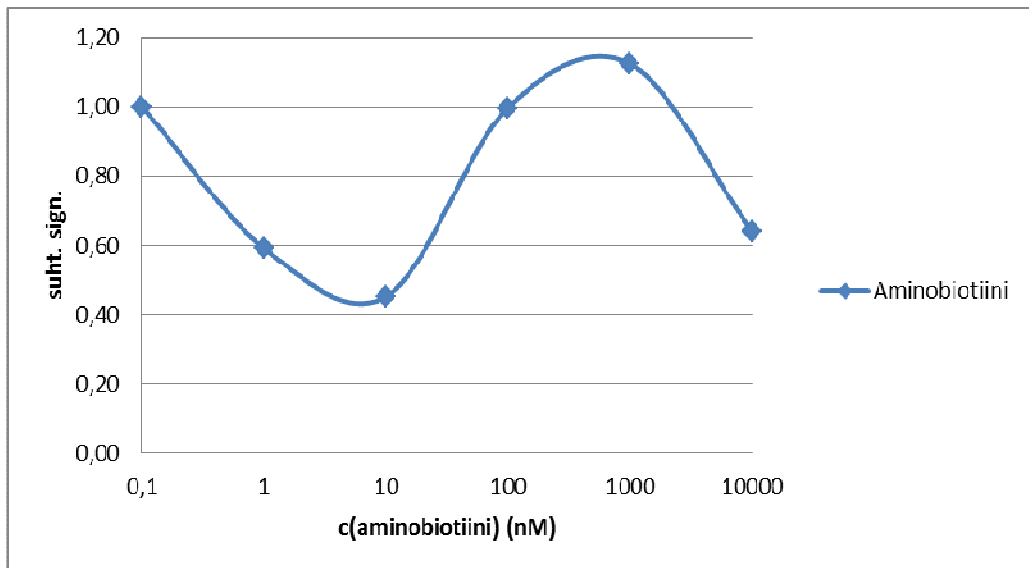
Kuvio 18. Sitruunahapon suhteelliset signaalit.

Kuviossa 18 on esitetty sitruunahapon testin tulokset. Kuvioista nähdään, että signaalit heiluvat ylös ja alas eikä signaalin laskua tapahdu. NaOH:lla ei ole juuri mitään vaikutusta. Sitruunahappo ei siis toimi tässä menetelmässä.



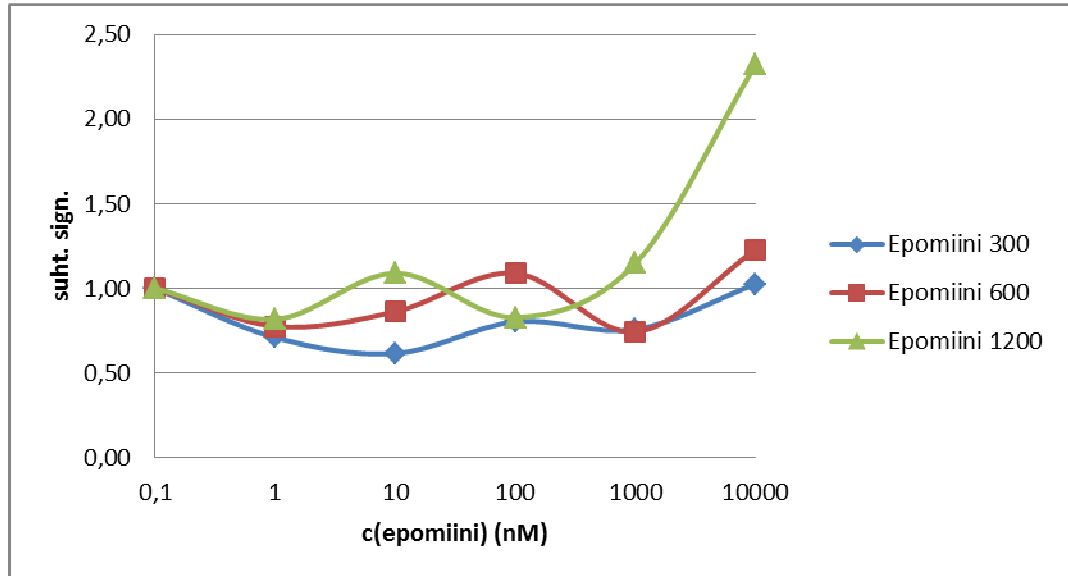
Kuvio 19. Biotiinin suhteelliset signaalit.

Kuviossa 19 on esitetty biotiinin tulokset. Biotiinia ei oltu modifioitu mitenkään tässä testissä, ja signaalien pitäisikin olla melko korkeita. NaOH:lla ei ole merkittävää vaikutusta. Varsinaisissa signaaleissa keskihajonta oli myös voimakasta, tästä tulisi pyrkiä pienempään. Biotiini sisältää yhden karboksyyliiryhmän ja näin ollen ei pysty häiritsemään  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattia. Tämän perusteella leimaamaton menetelmä varten biotiinia täytyy modifioida.



Kuvio 20. Aminobiotiinin suhteelliset signaalit.

Kuviossa 20 esitettyssä aminobiotiinin tuloksissa nähdään, että signaali ei laske alle 0,4 ja nousee korkeammaksi pitoisuuden kasvaessa, joten aminobiotiini tällaisenaan ei sovi menetelmään.



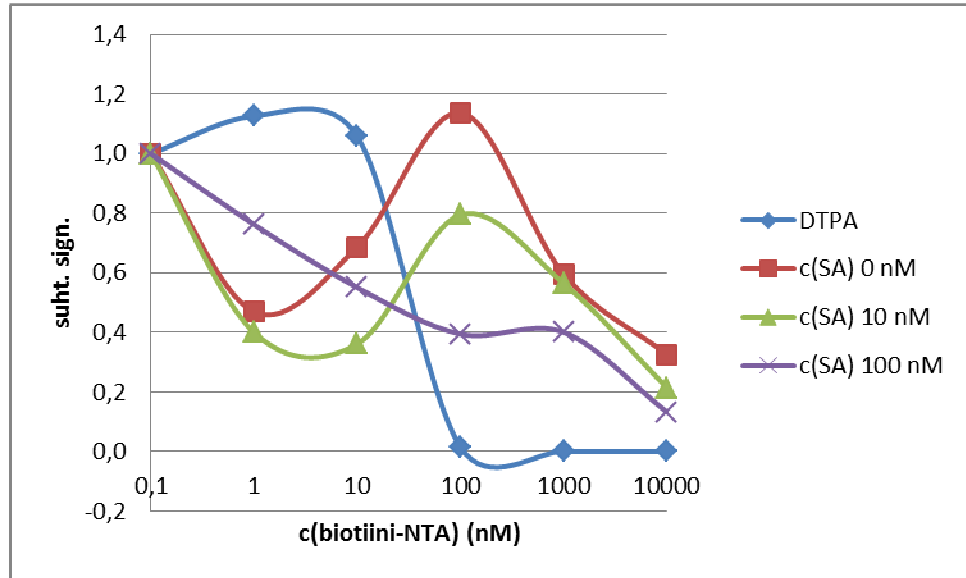
Kuvio 21. Epomiinien suhteelliset signaalit.

Kuviossa 21 on esitetty epomiinien suhteelliset signaalit. Niillä signaalit eivät kovasti muutu ja kasvavat loppua kohden. Näin ollen epomiinitkaan eivät ole menetelmään soveltuvia molekyyleja.

Testien perusteella nähdään, että EDTA ja DTPA saavat signaalin laskemaan toivotulla tavalla, eli taustasignaaliin verrattuna nähdään selkeä lasku signaaleissa, muiden yhdisteiden kohdalla ei kuitenkaan tapahdu samanlaista laskua. Tämän perusteella kuitenkin tiedetään, että menetelmän toimimiseksi molekyylissa tulee olla vähintään neljä karboksyyliiryhmää, kuten EDTA:ssa.

#### 7.4 Biotiini-NTA

Tässä testissä testattiin kaupallista biotiini-NTA-liuosta. Testissä kontrollina käytettiin DTPA:ta. EDTA ja DTPA pystyvät sitomaan  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin niin, että  $\beta$ -NTA ja TOPO eivät enää voi sitoutua siihen. Biotiini-NTA ei kuitenkaan tulosten perusteella tähän pysty ja vie siten edellytykset myös leimaamattoman immunomäärityksen toiminnalta.



Kuvio 22. Biotiini-NTA:n suhteelliset signaalit.

Kuviosta 22 nähdään, että biotiini-NTA ei laske samalla tavalla signaalia kuin DTPA. Streptavidiinin pitoisuuden kasvaessa signaali laskee hieman, muttei kuitenkaan tarpeeksi. Kun streptavidinia ei ole ollenkaan, signaali nousee yli taustasignaalin tason. Streptavidiinin pitoisuuden kasvaessa signaali lähtee laskemaan, mutta selvää eroa ei saada signaali-taustasuhteessa. Tämän perusteella biotiini-NTA ei toimi toivotulla tavalla menetelmässä, eli signaalit eivät laske niin paljon, että ne erottuisivat taustasignaalista.

Kirjallisuuden perusteella NTA:ssa on vain yksi aminoryhmä, jossa on vapaita elektronipareja ja vain kolme karboksyyli ryhmää, eli vaikka biotiini-NTA:ssa tyypen määrää on lisätty, ei koordinaatiosidoksia muodostavia yksiköitä ole siltikään riittävästi. NTA sitoutuu osittain  $\text{Eu}^{3+}$ -ioniin, mutta koordinaatiosidoksia muodostuu kuitenkin vähemmän kuin esimerkiksi EDTA:aan verrattuna, joten kilpailu ympäröivän veden tai  $\beta$ -NTA- ja TOPO-ligandien kanssa lienee heikompa. (17)

## 7.5 Biotiini-DTPA

### 7.5.1 Puhdistettujen fraktioiden testaus

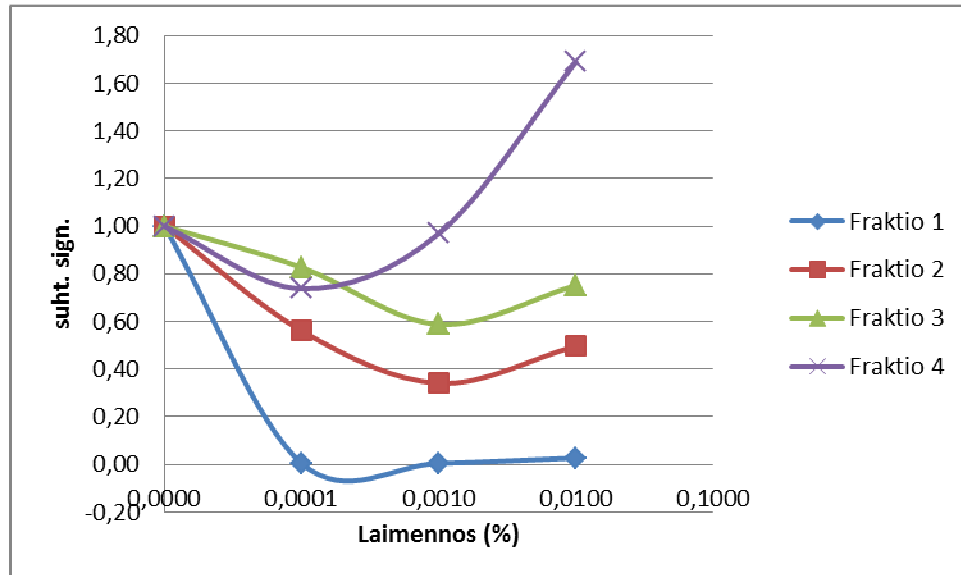
Puhdistettujen fraktioiden biotiinipitoisuustestin tulokset on esitetty varsinaisina signaaleina, koska jokaista fraktiota testattiin vain yhden laimennoksen suhteen. Näin tuloksia on helpompi tarkastella. Testin tarkoituksena oli testata, löytyykö jostain fraktiosta biotiinia. Yhdessä DTPA:n pitoisuuden testaamisen kanssa saadaan selville, sisältääkö jokin fraktio mahdollisen biotiini-DTPA:n ja tätä fraktiota käytettäisiin siis jatkotutkimuksiin.

Taulukko 4. Fraktioiden biotiinipitoisuuden testaus.

c(biotiini) (nM)	TRF		CV %	Eu	
	keskiarvo			keskiarvo	CV %
0	737		23,2	268602	14,9
10	131		2,8	591289	1,9
100	105		2,5	627701	1,4
1000	110		3,7	648037	0,7
	Fraktio 1	230	14,1	481332	1,6
	Fraktio 2	106	12,5	648638	2,6
	Fraktio 3	634	4,2	412188	8,9
	Fraktio 4	926	5,0	426505	9,8

Taulukossa 4 nähdään, että fraktioissa 1 ja 2 on biotiinia, sillä näissä fraktioissa TRF-signaali on laskenut. Esimerkiksi fraktiossa 1 signaalien keskiarvo on 230 kun fraktiossa 3 se on 634. Pelkän puskurin aiheuttama signaalien keskiarvo on 737, eli fraktio 3 ei erotu tästä taustasignaalista. Biotiinipitoisuuden kasvaessa signaalit laskevat, jo 10 nM biotiinipitoisuudella signaalien keskiarvo on 131. Kaikki fraktiot kuitenkin testattiin myös DTPA:n osalta.

DTPA-testin tulokset on esitetty taas suhteellisina signaaleina, sillä testissä käytettiin useampaa laimennosta jokaisesta fraktiosta. Testissä ei testattu erikseen DTPA:ta, vaan tuloksia voidaan verrata aiempiin DTPA:n laimennoskäyriin.

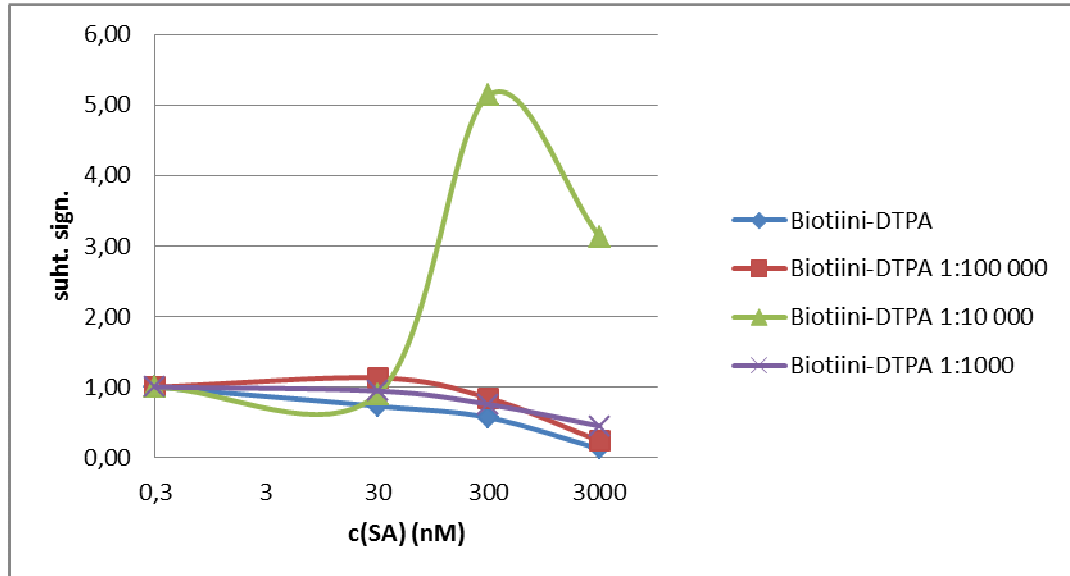


Kuvio 22. Fraktioiden DTPA-pitoisuuden testaus.

Kuviosta 22 nähdään fraktioiden signaalit DTPA:n suhteen. Fraktioita laimennettiin 1:10 000; 1:1000 ja 1:100, kuviossa laimennokset on esitetty prosentiosina. Kuviosta nähdään, että fraktion 1 signaalit ovat kaikkein alhaisimpia, myös fraktion varsinaiset signaalit ovat alhaisimpia, kymmenentuhannen luokkaa. Muiden fraktioiden oikeat signaalit ovat luokkaa miljoona. Näin ollen voidaan päätellä, että fraktiossa 1 on DTPA:ta, muissa fraktioissa ei niinkään. Tämän perusteella otetaan fraktio 1 jatkotesteihin.

### 7.5.2 Fraktion 1 jatkotestit

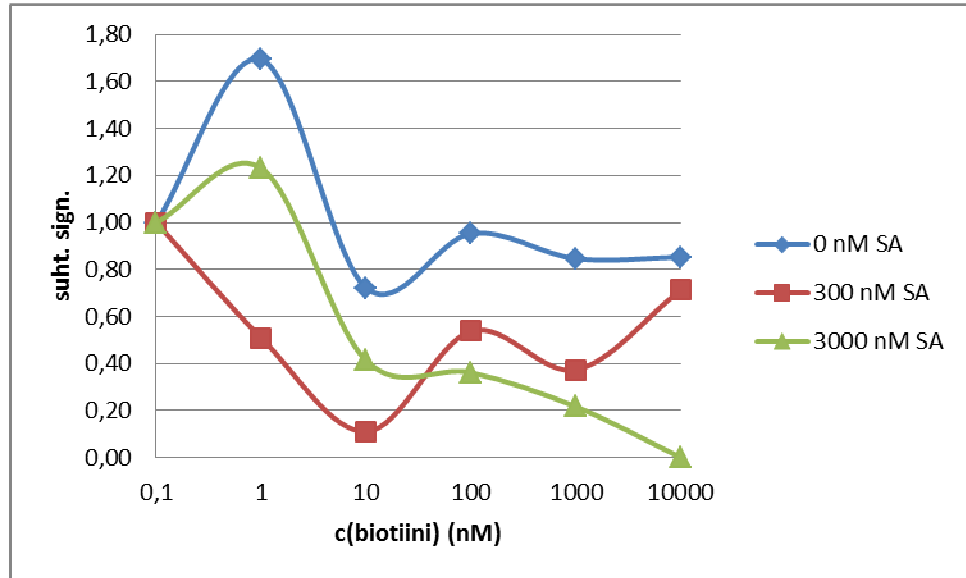
Tässä testissä testattiin streptavidiinin pitoisuuden vaikutusta signaaliin. Fraktiota laimennettiin 1:100 000; 1:10 000 ja 1:1000. Tulokset on esitetty streptavidiinipitoisuuden funktiona jokaisen laimennoksen osalta erikseen. Testin tarkoituksena oli selvittää sopivaa streptavidiinipitoisuutta.



Kuvio 23. Fraktion 1 suhteelliset signaalit SA-pitoisuuden funktiona.

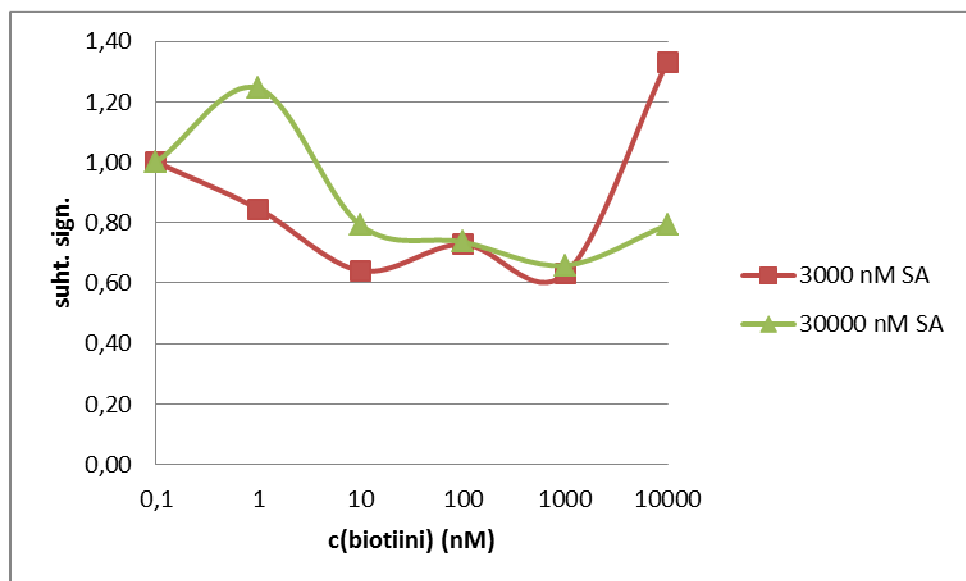
Kuviossa 23 näkyy, että laimennoksessa 1:10 000 signaali nousee reilusti, tämä saattaa johtua pipetointivirheestä tai muusta virheestä. Ilman biotiini-DTPA:ta signaali laskee tasaisesti, myös kaksi muuta laimennosta näyttävät laskevan signaalia tasaisesti. Varsinaisten signaalien perusteella laimennoksen 1:1000 signaalit ovat sopivaa suuruusluokkaa, kymmeniätuhansia ja signaali laskee tasaisesti streptavidinin pitoisuuden noustessa. Jatkotestissä käytetään siis laimennosta 1:1000. Menetelmän periaatteen mukaan streptavidinin pitäisi nostaa signaalia, eli kuvion käyrät pitäisi nousta. Tämän perusteella tässä vaiheessa testejä voidaan jo todeta, että ehkä menetelmä ei toimikaan kuten kuviteltiin. Kuitenkin, epäspesifisen luonteen takia streptavidinin lisäys voi aiheuttaa jonkin lisäefektin systeemiin ja menetelmä kannattaa testata vielä niin, että analyyttinä toimiva biotiini on läsnä.

Seuraavassa testissä mukaan otettiin myös biotiini, näin kaikki menetelmässä tarvittavat komponentit ovat läsnä. Testattiin eri pitoisuuksia streptavidiniä tässäkin testissä, samoin biotiinia. Biotiini-DTPA laimennettiin edellisen testin perusteella 1:1000, mukaan otettiin kuitenkin myös vielä laimennos 1:100, jota edellisessä testissä ei ollut.



Kuvio 24. Biotiini-DTPA-laimennos 1:1000.

Kuviossa 24 nähdään, että signaalit heittelevät kovasti. Signaalin laskua ei juuri tapahdu alun laskun jälkeen. 3000 nM streptavidiinipitoisuuden tuloksiin ei voi luottaa viimeisten osalta, koska niissä signaalit olivat alle 200, eli aivan liian pieniä. Biotiinipitoisuudessa 1000 nM saatiin vain yksi mittaustulos, sekään ei ole luotettava. Kuvioista nähdään, että streptavidiinipitoisuuden kasvaessa ei käyrissä tapahdu muutoksia, käyrät kulkevat samoin kuin ilman streptavidiniä.



Kuvio 25. Biotiini-DTPA-laimennos 1:100.



Kuviossa 25 on jouduttu jättämään pois mittaustulokset 0 nM streptavidinipitoisuudella, koska nollanäytteen signaalit jäivät alle 200, eivätkä ole luotettavia. Kahden muun pitoisuuden kohdallakaan ei signaali laske, vaan nousee loppua kohden. Signaalit ovat muutenkin korkealla, lähellä nollanäytettä.

Taulukko 5: Fraktion SA-testi.

biotiiini-DTPA	c(SA) (nM)	c(biotiini) ( $\mu$ M)	keskiarvo	CV %	suht. sign.	
0	0	0	200477	13,1	1,00	
		10	250580	14,5	1,25	
	100	0	339202	15,5	1,00	
		10	271800	21,7	0,80	
	300	0	348159	23,3	1,00	
		10	357522	20,8	1,03	
	1000	0	375664	16,8	1,00	
		10	393349	15,0	1,05	
	3000	0	491635	47,8	1,00	
		10	525940	29,6	1,07	
	1:3000	0	0	216978	13,2	1,00
			10	217588	10,0	1,00
100		0	355107	11,0	1,00	
		10	330044	5,1	0,93	
300		0	433784	11,1	1,00	
		10	336216	10,6	0,78	
1:1000	0	0	141035	22,8	1,00	
		10	146154	17,6	1,04	
	300	0	127974	10,1	1,00	
		10	140923	6,7	1,10	
	1000	0	193134	29,3	1,00	
		10	148019	7,7	0,77	
1:300	0	0	173906	9,1	1,00	
		10	167675	1,6	0,96	
	1000	0	204294	18,8	1,00	
		10	194174	4,6	0,95	
	3000	0	355122	6,1	1,00	
		10	273004	6,0	0,77	

Taulukon 5 tulosten perusteella ei signaaleissa havaita laskua, signaalit heittelevät ylös ja alas. Yleissilmäyksellä on nähtävissä, että kaikki signaalit ovat samaa suuruusluokkaa. Näiden testien perusteella todettiin, että biotiini-DTPA ei

todennäköisesti ole puhdistunut kunnolla. Ensimmäisessä puhdistuksessa kerättiin alussa kolme fraktiota, mutta piikit olivat hyvin lähekkäin, joten fraktiossa 1 saattoi olla sekä DTPA:ta että biotiini-DTPA:ta sekaisin. Voi myös olla, että DTPA ja aminobiotiini eivät ole reagoineet keskenään kunnolla. Tehtiin uusi puhdistus eri parametreilla.

### 7.5.3 Toisen puhdistuksen testaukset

Toisessa puhdistuksessa kerättiin 13 fraktiota. Näistä tutkittiin ensin biotiinipitoisuus kuten edellisessäkin puhdistuksessa. Tulokset on myös tässä testissä esitetty varsinaisina signaaleina, koska jokaista fraktiota laimennettiin vain kerran.

Taulukko 6: Fraktioiden biotiinipitoisuuden testaus

		TRF		Nano Eu norm	
biotiini (nM)		keskiarvo	CV %	keskiarvo	CV %
0		447	9,2	394754	1,3
10		112	15,7	599050	2,0
	fraktio 1	459	9,9	387219	1,3
	fraktio 2	441	2,7	386611	2,1
	fraktio 3	476	5,9	386674	3,3
	fraktio 4	410	26,9	398298	10,5
	fraktio 5	484	7,3	340780	2,9
	fraktio 6	197	32,4	463860	8,5
	fraktio 7	470	9,0	351307	9,3
	fraktio 8	100	67,1	722952	0,0
	fraktio 9	504	9,3	471198	2,6
	fraktio 10	186	1,6	552882	5,1
	fraktio 11	239	9,6	564548	8,9
	fraktio 12	320	7,1	537128	3,8
	fraktio 13	108	18,5	707307	2,5

Taulukon 6 alussa näkyy biotiinin pitoisuuden aiheuttama signaalin lasku. Tämän perusteella nähdään, että fraktioissa 6, 8 ja 10-13 on biotiinia, sillä niiden signaalit ovat pienempiä kuin nollanäytteen signaali, joka on 447. Fraktioissa 6, 8 ja 10-13 signaalit ovat alle 200. Myös fluoresenssin mittaustulos antaa saman

vastauksen, sillä muiden fraktioiden fluoresenssit ovat matalampia samoin kuin nollanäytteen.

DTPA:n testauksessa fraktioita laimennettiin 1:350. Koska laimennoksia oli vain yksi, esitetään tulokset tässä oikeina signaaleina. Testiin ei laitettu tällä kertaa kontrollinäytettä, eli DTPA:ta, mutta tuloksia voidaan verrata aiempiin DTPA:n tuloksiin.

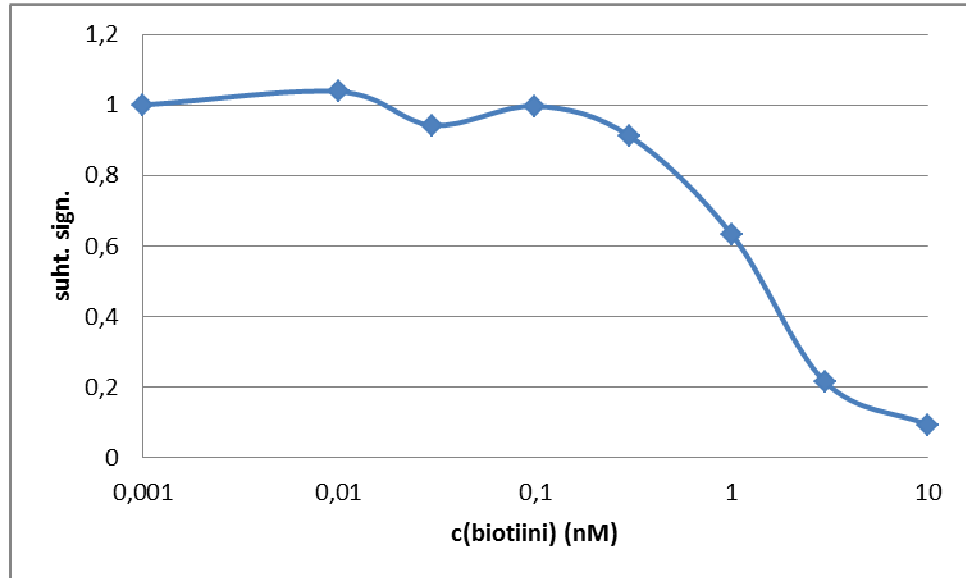
Taulukko 7: Fraktioiden DTPA-pitoisuuden testaus.

Fraktio	keskiarvo	CV %
1	93949	22,1
2	56581	19,7
3	78001	5,7
4	69899	2,3
5	67058	7,1
6	65385	9,5
7	61152	12,1
8	70864	8,3
9	73535	14,8
10	7266095	11,8
11	6208947	5,4
12	6872875	2,7
13	6609689	23,8

Taulukosta 7 nähdään, että fraktioissa 1-9 signaali on laskenut, niissä signaali on luokkaa kymmeniätuhansia, kun fraktioissa 10-13 signaalit ovat luokkaa satojatuhansia. Edellisten testien perusteella tiedetään, että DTPA laskee signaalia. Näin ollen voidaan päätellä, että fraktioissa 1-9 on DTPA:ta. Edellisessä testissä selvisi, että fraktioissa 6, 8 ja 10–13 on biotiinia. Koska fraktioissa 6 ja 8 on sekä biotiinia että DTPA:ta, otetaan nämä fraktiot jatkotesteihin.

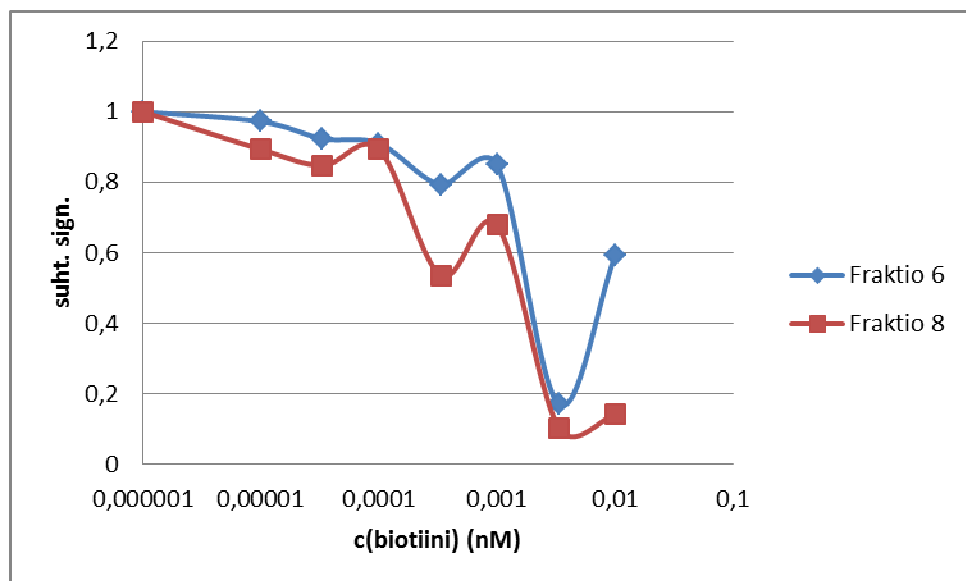
#### 7.5.4 Fraktioiden 6 ja 8 testaukset

Seuraavassa testissä määritettiin fraktioiden biotiinipitoisuutta. Tuloksissa on ensin esitetty biotiinin laimennoskäyrä ja toisessa kuviossa fraktioiden laimennosten suhteelliset signaalit.



Kuvio 26. Biotiinin laimennoskäyrä TRF:llä mitattuna.

Kuviossa 26 on esitetty biotiinin laimennoskäyrä. Biotiini laimennettiin pitoisuuksiin 0; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 ja 10 nM.

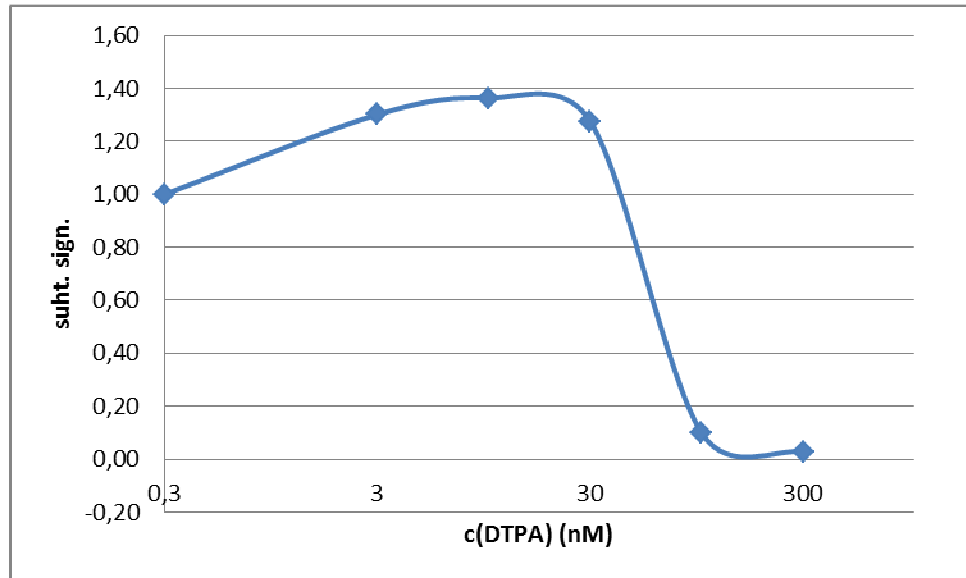


Kuvio 27. Fraktioiden 6 ja 8 biotiinimääritys aikaerotteisena fluoresenssina.

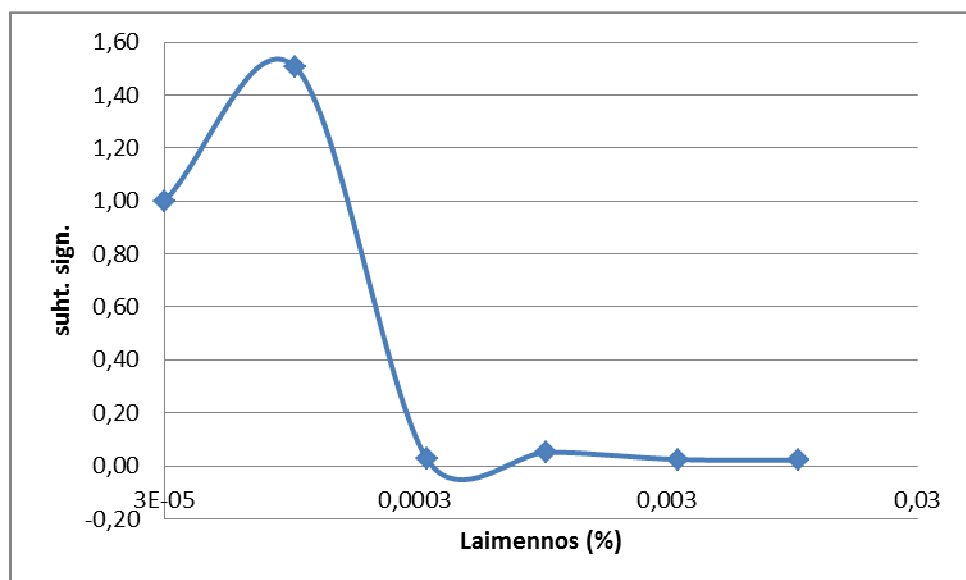
Kuviossa 27 on esitetty fraktioiden laimennosten aiheuttamat suhteelliset signaalit. Molempia fraktioita laimennettiin 1:100 000; 1:30 000; 1:10 000; 1:3000; 1:1000; 1:300 ja 1:100.

Mittaustulosten perusteella jatkotestiin otettiin fraktio 8, koska siinä näkyy signaalin muutosta. Fraktion 6 signaalit eivät juuri muutu, joten fraktio 6 ei todennäköisesti sisällä biotiini-DTPA:ta ja fraktio jätettiin lisätesteistä pois.

Seuraavassa testissä testattiin fraktion 8 DTPA-pitoisuutta. Ensimmäisessä kuviossa on DTPA:n laimennoskäyrä pitoisuuksilla 3; 10; 30; 100 ja 300 nM.



Kuvio 30. DTPA:n laimennoskäyrä.



Kuvio 31. Fraktion 8 DTPA-pitoisuuden määrittäminen.

Kuviossa 31 on esitetty fraktion 8 suhteelliset signaalit. Kuvioita 30 ja 31 vertaamalla nähdään, että fraktion 8 signaalit laskevat nopeasti ja pysyvät tämän jälkeen melko tasaisina. DTPA:n pitoisuuden kasvaessa kuvioista 30 nähdään, etteivät signaalit laske aivan yhtä nopeasti. Tulosten perusteella voidaan päätellä, ettei biotiini-DTPA toimi odotetulla tavalla. Puhdistuksessa piikit tulevat niin päällekkäin, että niitä on hankala kerätä erikseen. Parametreja muuttamalla pyrittiin erottamaan piikkejä toisistaan. Tätä yritettiin vaihtamalla TEAA TFA:ksi, jolloin DTPA jäisi paremmin kiinni pylvääseen ja biotiini-DTPA saataisiin erillään ulos. DTPA on TEAA:ssa negatiivisesti varautunut ja TFA:ssa se taas on neutraali.

#### 7.6 $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin lisätestit lisäyksen optimoinniksi

$\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin lisätesteissä testattiin erilaisia suhteita ja eri ligandeja, tarkoituksena oli pienentää keskihajontaa sekä tarkentaa lisättäviä pitoisuuksia. Tulokset on esitetty todellisina signaaleina seuraavissa taulukoissa.

Taulukko 8: Eu<sup>3+</sup>-kelaatin lisätestit

	Biotiini- ligandi	c(SA) (nM)	c(biotiini) (μM)	keskiarvo	CV %
0,3 μM Eu <sup>3+</sup> :TTA:TOPO 1:27:27	0	0	0	208	5,6
			10	271	37,3
		100	0	223	19,0
			10	215	27,7
	1:500	0	0	230	22,1
			10	180	9,3
		100	0	212	25,2
			10	209	19,3
2 μM Eu <sup>3+</sup> :NTA 1:9	0	0	0	53316	33,3
			10	60137	80,4
		100	0	147169	49,1
			10	56588	14,4
	1:500	0	0	46607	41,5
			10	28464	41,1
		100	0	77803	43,5
			10	26798	51,0
2 μM Eu <sup>3+</sup> :NTA:TBPO 1:9:9	0	0	0	280336	32,7
			10	442060	26,8
		100	0	4891025	7,4
			10	2973055	10,5
	1:500	0	0	458443	53,0
			10	367941	10,4
		100	0	4024680	17,5
			10	2957816	1,6
0,3 μM Eu <sup>3+</sup> :NTA:TOPO 1:27:27	0	0	0	3288834	7,4
			10	3537170	15,6
		100	0	3824627	35,2
			10	3847597	11,4
	1:500	0	0	662888	42,7
			10	805453	26,3
		100	0	738120	28,6
			10	701446	23,0
70 mM HCl + 0,3 μM Eu <sup>3+</sup> :NTA:TOPO 1:27:27	0	0	0	2746250	39,2
			10	2009485	23,2
		100	0	2037891	20,1
			10	2304023	2,9
	1:500	0	0	1256982	21,0
			10	1174472	28,7
		100	0	1348252	18,6
			10	1524153	9,6

Taulukossa 8 on esitetty tulokset kaikkien liuosten osalta. Liuoksessa Eu<sup>3+</sup>:TTA:TOPO 1:27:27 signaalit ovat kaikki liian matalia, luokkaa 200, ne eivät

erotu taustasignaalista, joka on tässä testissä 208, joten tämä yhdistelmä ei ole hyvä.

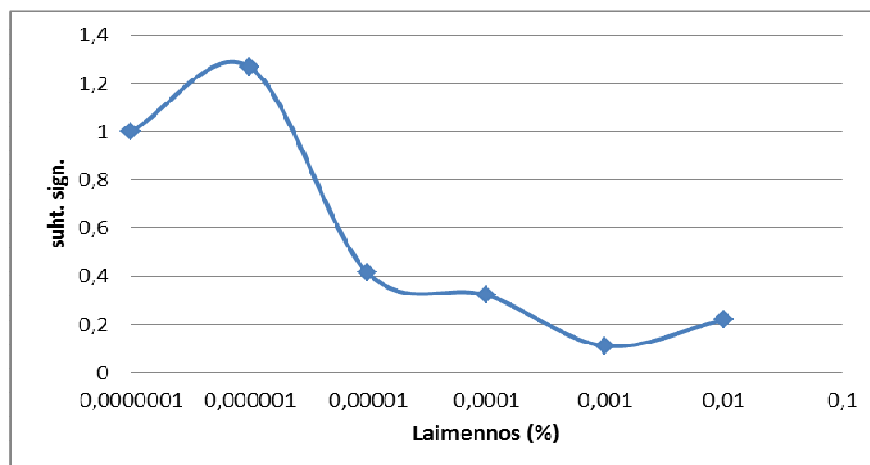
$\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA 1:9 –liuoksessa biotiiniligandin lisäys ei laske signaalia juuri ollenkaan, joten tämä liuos ei sovellu. Eroja ei saada tällä kunnolla esille, koska myös tässä testissä signaalit sekoittuvat taustaan. Signaalit ovat luokkaa kymmeniätuhansia, nollasignaali on arvoltaan 53 316.

Liuoksessa  $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TBPO 1:9:9 signaalit eivät laske biotiiniligandia lisättäessä ja lisäksi streptavidiniä lisättäessä signaalit nousevat. Tämäkään liuos ei siis sovi käyttöön. Signaalit hukkuvat edelleen taustaan, tässä testissä signaalit ovat luokkaa satojatuhansia. Streptavidini nostaa signaalit miljoonaan, mutta biotiinipitoisuudella 10  $\mu\text{M}$  signaalit laskevat, vaikka menetelmän periaatteen mukaan niiden oletetaan nousevan.

Liuoksen  $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:27:27 tuloksista näkyy, että signaalit laskevat paremmin ilman HCl:ää. Signaalit myös laskevat selkeästi biotiiniligandia lisättäessä. Tämä liuos sopii siis käytettäväksi jatkossa.

## 7.7 Biotiiniligandi

Ensimmäisessä testissä selvitettiin laskeeko puhdistettu biotiiniligandi signaalia ja millä pitoisuudella signaali laskee.



Kuvio 32. Fraktion signaalilasku.



Kuviossa 32 näkyy fraktion aiheuttamat signaalit. Edellisiin DTPA:n määrittämiin vertaamalla fraktion ligandi-pitoisuudeksi voidaan arvioida luokkaa 100 nM.

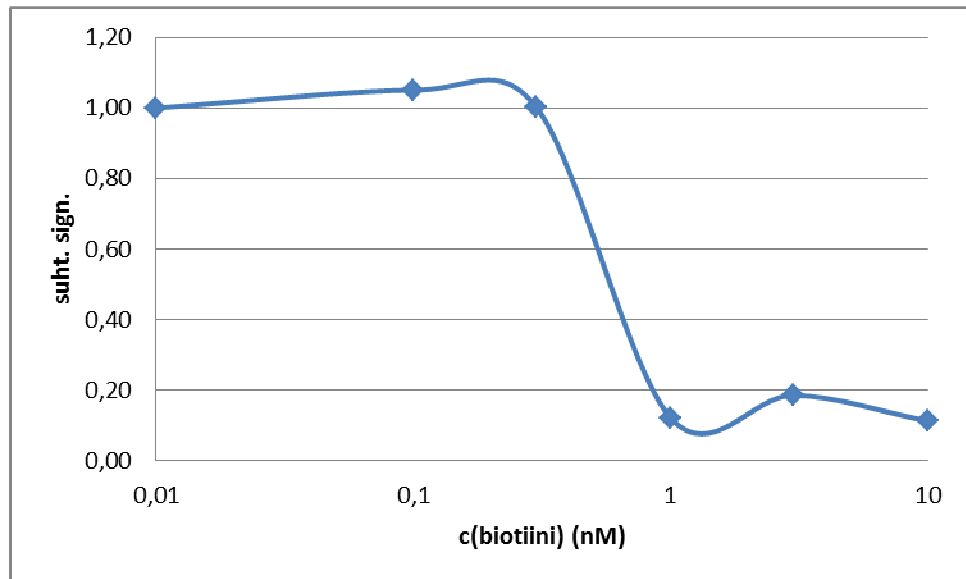
Seuraavassa testissä kokeiltiin erilaisten streptavidinipitoisuuksien vaikutusta signaaleihin. Biotiiniligandi laimennettiin 0; 1:1000 ja 1:100. Koska laimennoksia oli vain kaksi, tulokset tästä testistä esitetään varsinaisina signaaleina.

Taulukko 9: SA-pitoisuuden testaus.

c(SA) (nM)	c(biotiini- ligandi)	c(biotiini) (µM)	keskiarvo	CV %	Suht. sign.
0	0	0	3297470	22,2	1,00
		10	3910343	38,0	1,19
	1:1000	0	1361832	83,9	1,00
		10	5393877	28,4	3,96
	1:100	0	805096	58,1	1,00
		10	699079	87,2	0,87
30	0	0	2838311	45,7	1,00
		10	3098887	14,9	1,09
	1:1000	0	1886913	60,2	1,00
		10	5808514	49,6	3,08
	1:100	0	856201	80,6	1,00
		10	1784195	50,9	2,08
300	0	0	4223116	39,4	1,00
		10	4499020	45,2	1,07
	1:1000	0	1843049	61,7	1,00
		10	3852763	59,8	2,09
	1:100	0	654896	39,0	1,00
		10	1679285	72,3	2,56
3000	0	0	1803352	60,8	1,00
		10	1969419	49,9	1,09
	1:1000	0	1624668	20,1	1,00
		10	1535363	42,3	0,95
	1:100	0	516442	14,6	1,00
		10	770760	51,5	1,49

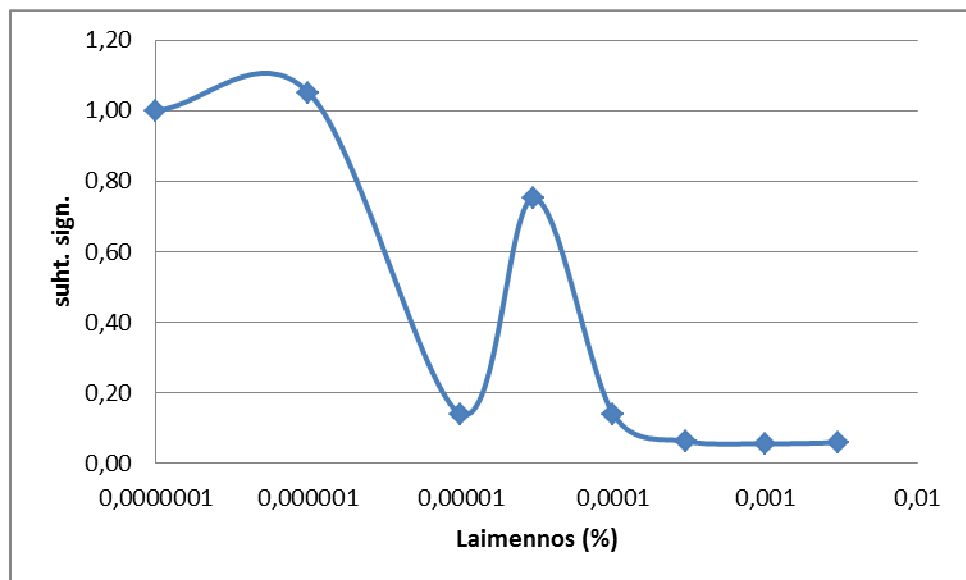
Taulukossa 9 nähdään, että signaalit eivät juuri muutu. Suhteelliset signaalit on myös laskettu ja tässä verrataan biotiinilisäyksen vaikutusta. Biotiinipitoisuuden noustessa signaalien pitäisi laskea. Tuloksista nähdään, että signaalit heittele-

vät eri laimennoksien välillä. Myös keskihajonnat ovat suuria tässäkin testissä. Keskihajontaa tulisi saada pienemmäksi, jotta tulokset olisivat luotettavia.



Kuvio 33. Biotiinin laimennoskäyrä.

Kuviossa 33 nähdään biotiinin laimennoskäyrä laimennoksilla 0; 0,1; 0,3; 1; 3 ja 10.



Kuvio 34. Biotiiniligandin biotiinipitoisuuden määrittäminen.

Koska kuviossa 34 nähdään käyrässä piikki, on biotiinipitoisuutta hankala määrittää tästä. Testissä mitattiin energiansiirtoa, jossa mitattiin biotiinin pitoisuutta biotiiniligandissa. Biotiiniligandissa ei ole muuta kuin biotiini kiinni ligandissa, näin ollen biotiiniligandin pitoisuus on yhtä kuin biotiinin pitoisuus. Karkeasti arvioiden biotiinin pitoisuus on luokkaa 10  $\mu\text{M}$ .

### 7.7.1 TFA:n haihdutus

Taulukko 10. TFA:n vaikutuksen testaus  $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO 1:3:3 -liuoksella.

		Keskiarvo	CV %
0	Biotiiniligandi	2415278	22,8
1:100		436	34,9
1:10		192150	28,4
100 nM	DTPA	1957670	47,3
1 $\mu\text{M}$		1609418	10,6
1:100	0,1 % TFA	4229	109,5
1:10		930610	15,5

Taulukossa 10 on esitetty tulokset TFA:n vaikutuksen testaukseen. TFA on happo, eli se laskee pH:ta ja siitä syystä voi destabiloida  $\text{Eu}^{3+}$ : $\beta$ -NTA:TOPO:a, jolloin signaali laskee. Tuloksista nähdään, että näin myös tapahtuu ja signaali laskee melkein yhtä paljon biotiiniligandilla, jonka liuoksessa on myös TFA:ta. Biotiiniligandiliuoksessa oleva TFA saattaa siis laskea signaalia niin paljon, että itse biotiiniligandin aiheuttaman signaalin laskun havaitseminen voi olla vaikeaa. HEPES-puskurissa pH on säädetty lähelle neutraalia, 7,8, jolloin TFA ei häiritsekään niin paljon, tätä testattiin seuraavassa testissä. Biotiiniligandi kuitenkin sitoo  $\text{Eu}^{3+}$ -ionia.

Taulukko 11. TFA:n testaus HEPES-puskurilla.

		Keskiarvo	CV %
0		2019262	44,7
1:100	Biotiiniligandi	22555	96,6
1:10		171	23,6
1:100	0,1 % TFA	340006	33,0
1:10		39931	86,3
1 $\mu$ M	DTPA	3098301	14,2
10 $\mu$ M		3414197	3,0

Taulukosta 11 nähdään, että tässäkin testissä biotiiniligandin aiheuttama signaali on huomattavasti pienempi kuin TFA:n. TFA haihdutetaan pois fraktiosta, jotta voidaan olla varmoja, että sen vaikutus voidaan sulkea pois.

Seuraavassa testissä verrattiin haihdutettua biotiiniligandia ja TFA:ta haihduttamattomaan biotiiniligandiin ja TFA:han ja tutkittiin vaikuttaako haihdutus tuloksiin.

Taulukko 12. Haihdutuksen vaikutuksen tulokset 5 mM NaCl:ssa.

		Keskiarvo	CV %
0	DTPA	297709	47,0
100 $\mu$ M		1560	45,3
1:220	Haihdutettu biotiiniligandi	20363	9,2
1:22		3059	34,5
1:220	Haihdutettu TFA	127024	88,1
1:22		118688	28,6
1:100	biotiiniligandi	8903	31,1
1:10		749	27,3
1:100	TFA	60946	13,4
1:10		6105	74,8

Taulukosta 12 nähdään, että haihdutetun biotiiniligandin aiheuttamat signaalit ovat korkeammat kuin haihduttamattoman. Samoin käyttäytyy TFA. Haihdutuksessa biotiiniligandissa ei ole enää TFA häiritsemässä signaalia.

Taulukko 13: Biotiiniligandin testaus eri SA-pitoisuuksilla.

c(SA) (nM)	Biotiini- ligandi	c(biotiini) (µM)	Keskiarvo	CV %	Suht. sign.
0	0	0	1279584	62,7	1,00
		10	898639	45,5	1,42
	1:100	0	19780	23,9	1,00
		10	28514	73,8	0,69
	1:45	0	6014	61,8	1,00
		10	7317	94,9	0,82
500	0	0	329311	36,2	1,00
		10	386817	36,9	0,85
	1:100	0	30003	16,3	1,00
		10	42277	23,7	0,71
	1:45	0	4018	9,8	1,00
		10	4075	31,6	0,99

Taulukon 13 tuloksista nähdään signaalien pysyvän melko samoina, merkittävää laskua ei nähdä missään laimennoksessa. Taulukkoon on myös laskettu suhteellinen signaali, jossa verrataan jokaisen laimennoksen kohdalla biotiinipitoisuuksia.

### Biotiiniligandin testaus liuoksilla $\text{EuCl}_3$ + erilaisilla molekyyileilla

Liitteessä 1 olevien taulukoiden 19-23 tulosten perusteella liuoksessa  $1 \mu\text{M}$   $\text{EuCl}_3$  +  $1 \mu\text{M}$  EDTA näkyy signaalin laskua. Tämä testi toistettiin vielä myöhemmin, mutta toistettaessa signaalin laskua ei enää tapahtunut. Näin ollen ensimmäisen testin osoittama signaalin lasku johtui luultavasti suuresta hajonnasta.

## 7.8 Detergenttien ja puskurien testaus

Taulukko 14:  $\beta$ -NTA:TOPO-testi.

	Biotiini- ligandi	c(biotiini) ( $\mu$ M)	Keskiarvo	CV %
0	0	0	1797655	7,1
		10	1762128	13,3
	1:100	0	1113915	42,1
		10	1304518	10,3
3000 nM $\beta$ -NTA:TOPO 1:1	0	0	3607783	5,8
		10	2923271	53,5
	1:100	0	2074301	9,0
		10	1962958	11,1
300 nM $\beta$ -NTA:TOPO 1:1	0	0	2361042	9,6
		10	2356370	9,8
	1:100	0	1838532	16,2
		10	1375497	38,8

Taulukossa 14 näkyy detergenttien testauksen tulokset. Minkään detergentin kohdalla ei näy selkeää signaalien laskua, joitain laskuja kuitenkin näkyi. Mittausten väli oli kuitenkin niin pitkä, että päätettiin toistaa testi lyhyemmällä mittausvälillä.

Taulukko 15: Detergenttien testi.

	Biotiini- ligandi	c(biotiini) ( $\mu\text{M}$ )	Keskiarvo	CV %
0,1 mM Triton X-100	0	0	1103506	20,8
		10	1068791	8,5
	1:100	0	839401	15,1
		10	760230	9,7
5 mM SDS	0	0	2130402	19,1
		10	2042871	5,4
	1:100	0	1920814	4,1
		10	1532998	2,8
1 mM CTAB	0	0	1974663	10,9
		10	2161436	1,5
	1:100	0	1877223	6,2
		10	1964561	2,8
0,1 g/l BSA	0	0	2494096	29,2
		10	2122691	1,8
	1:100	0	2218242	2,2
		10	1730632	21,3

Taulukko 16:  $\beta$ -NTA:TOPO:n uusintatesti.

	Biotiini- ligandi	c(biotiini) ( $\mu\text{M}$ )	Keskiarvo	CV %
0	0	0	18566	40,8
		10	49319	31,5
	1:100	0	16086	15,1
		10	45093	10,6
3000 nM $\beta$ -NTA:TOPO 1:1	0	0	140606	12,0
		10	447866	133,7
	1:100	0	158929	22,7
		10	127217	24,3
300 nM $\beta$ -NTA:TOPO 1:1	0	0	3188906	20,5
		10	3503923	8,6
	1:100	0	3296357	3,2
		10	3465829	5,0

Taulukossa 16 detergenttien uusintatestissä SDS:n kohdalla nähdään selvä signaalin lasku, muiden kohdalla ei kuitenkaan näy selkeää eroa. Kuitenkin, myöhemmin toistettaessa ei signaalin laskua enää tapahtunut SDS:n kohdallaan, joten todennäköisesti ensimmäisen näennäisen signaalin laskun aiheutti suuri hajonta. Keskihajontaa saatiin hieman pienenemään, mutta koska signaalin laskua ei näy, ei tästä ole paljon hyötyä.

Taulukko 17: Detergenttien uusintatesti.

	Biotiini- ligandi	c(biotiini) ( $\mu\text{M}$ )	Keskiarvo	CV %
0,1 mM Triton X-100	0	0	2594	16,1
		10	1040	21,0
	1:100	0	3061	88,3
		10	2006	4,6
5 mM SDS	0	0	168999	27,0
		10	39885	27,2
	1:100	0	192537	2,3
		10	38453	35,7
1 mM CTAB	0	0	773	20,0
		10	923	30,8
	1:100	0	912	28,5
		10	1218	33,0
0,1 g/l BSA	0	0	87234	9,8
		10	50836	7,8
	1:100	0	78736	2,0
		10	63488	6,6

Taulukoissa 18 ja 19 on esitetty NaCl- ja HEPES-puskurien testien tulokset. HEPES-puskuri pienentää hieman keskihajontaa. Myös  $\beta$ -NTA:TOPO-liuoksen valmistaminen Tritoniin näyttää pienentävän keskihajontaa. Testeissä päätettiin siis käyttää HEPES-puskuria, koska sillä saatiin keskihajonta pienemmäksi ja näin ollen tulokset vertailukelpoisemmiksi.



Taulukko 18: 5 mM NaCl-testi.

	c(SA) ( $\mu\text{M}$ )		c(biotiini) ( $\mu\text{M}$ )	Keskiarvo	CV %
$\beta$ -NTA:TOPO in MQ PF	0	0	0	1385065	14,9
			1	1133182	38,0
		1:100	0	72021	32,2
			1	201047	56,8
		1:10	0	47342	55,8
			1	20983	16,5
	300	0	0	1663196	8,0
			1	1352512	51,8
		1:100	0	118827	54,2
			1	235530	110,9
		1:10	0	26530	36,2
			1	27697	38,3
$\beta$ -NTA:TOPO in Triton X- 100	0	0	0	5000878	20,8
			1	4871698	29,1
		1:100	0	1197010	16,2
			1	1090770	19,4
		1:10	0	300149	18,1
			1	244619	20,9
	300	0	0	5868259	10,9
			1	5178490	3,2
		1:100	0	766184	21,5
			1	760666	11,3
		1:10	0	171124	11,5
			1	195801	40,2

Taulukko 19: 5 mM HEPES-testi.

c(SA) ( $\mu\text{M}$ )		c(biotiini) ( $\mu\text{M}$ )	Keskiarvo	CV %
0	0	0	1977310	8,4
		1	1491347	59,8
	1:100	0	486944	7,4
		1	486621	19,8
	1:10	0	143307	39,5
		1	205901	22,8
300	0	0	1770340	7,0
		1	1807505	17,5
	1:100	0	452027	8,3
		1	499230	19,9
	1:10	0	135544	4,4
		1	131523	18,1

Mahdollisia syitä, miksi menetelmä ei toiminut, on esimerkiksi  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin pieni koko. Ioni saattaa olla niin pieni, että se löytää modifioidun biotiinin, vaikka biotiini on sitoutunut streptavidiniin. Kokoa yritettiin suurentaa lisäämällä  $\text{Eu}^{3+}$ -ioni yhdessä  $\beta$ -NTA:n kanssa, mutta tästäkään testistä ei saatu toivottuja tuloksia. Suurentamalla lisättävän  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin kokoa voitaisiin saada menetelmä toimimaan.

## 7.9 QRET

Seuraavassa on esitetty QRET-testin tulokset esimerkkinä menetelmän toimivuudesta, menetelmä testattiin molemmilla biotiini-Eu:lla, 7-hampaisella ja 9-hampaisella.

Taulukko 20. QRET-testin tulokset.

c(biotiini-Eu) (nM)	c(SA) ( $\mu$ M)	c(biotiini) ( $\mu$ M)	Keskiarvo	CV %
100 7-hampainen	0,1	0	22525	5,4
		10	7657	4,0
	1	0	18625	6,2
		10	5124	12,4
100 9-hampainen	0,1	0	65074	5,6
		10	12198	5,8
	1	0	58309	4,1
		10	12842	1,4

Taulukosta 9 nähdään, että QRET-menetelmä toimii hyvin molemmissa tapauksissa, signaalit laskevat noin puolella jokaisessa kohdassa, jolloin signaali-tausta-suhde on tarpeeksi suuri ja signaali erottuu taustasta. Signaaleja verrataan biotiinin pitoisuuden mukaan.

## 8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyössä pyrittiin kehittämään leimaamatonta menetelmää vasta-aineanalyysille. Nykyisin suoritettavat vasta-ainemääritykset sisältävät useita pesuvaiheita ja ne vaativat kalliita fluoresoivia leimoja. Leimaamaton menetelmä jättäisi pois ylimääräiset pesuvaiheet ja yksinkertaistaisi huomattavasti vasta-ainemäärityksiä. Leimaamattomassa menetelmässä käytetään epäspesifisiä värimolekyyleja, mutta niitä ei ole mitenkään kiinnitetty käytettyihin määrittyskomponentteihin.

Menetelmä pohjautuu Biofysiikan laboratorion kehittämään QRET-menetelmään. Menetelmät ovat toisiaan vastaavat ja tämän vuoksi voitiin olettaa, että menetelmä toimii sopivalla molekyylillä. Tässä menetelmässä QRET:n liukoisen sammuttajan tilalla käytettiin epästabiilia  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaattia, joka sisälsi  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin sekä  $\beta$ -NTA-ligandin ja TOPO-yhdisteen, jotka kelatoivat  $\text{Eu}^{3+}$ -ionin, ja QRET:n stabiilin 7-hampaisen  $\text{Eu}^{3+}$ -kelaatin tilalla vastaavaa ligandia, josta oli dissosioitu  $\text{Eu}^{3+}$ -ioni.

Työssä testattiin erilaisia modifioituja biotiiniyhdisteitä, kuten biotiini-NTA, biotiini-DTPA ja biotiiniligandi. Pelkällä EDTA:lla ja DTPA:lla testattaessa signaali laski odotetusti luokasta miljoona luokkaan tuhat. Tämän perusteella pääteltiin, että modifioidun biotiinin tulisi sisältää vähintään neljä karboksyyli ryhmää.

Eri molekyyleja ja olosuhteita testattiin, mutta missään ei saatu toistettavasti toivottuja tuloksia. Myös keskihajonnat olivat niin suuria, ettei tuloksia voinut pitää luotettavina. Keskihajontaa pyrittiin pienentämään erilaisilla detergenteilla ja puskureilla. Parhaita tuloksia saavutettiin biotiiniligandilla, jolla signaali saatiin laskemaan luokkaan tuhat, kun ensin oli haihdutettu häiritsevä TFA pois. Biotiiniligandi ei kuitenkaan ole paras mahdollinen vaihtoehto menetelmälle, sillä sen valmistamiseksi joudutaan hajottamaan kallis biotiini-Eu-kelaatti. Menetelmän tavoitteena oli löytää molekyyli, joka tulisi myös edulliseksi, joten kalliin kelaatin hajottaminen ei tue tätä tavoitetta.

Menetelmä vaatii vielä lisää kehitystä, koska se ei toiminut minkään molekyylin kanssa toistettavasti. Tulokset viittaavat siihen, että  $\text{Eu}^{3+}$ -ioni on niin pieni ioni, että se pääsee sitoutumaan modifioituun biotiiniin, vaikka modifioitu biotiini on sitoutunut streptavidiniin. Testeissä saatiin selville, että modifioidussa biotiinissa tulee olla vähintään neljä karboksyyliiryhmää, jotta se sitoutuu streptavidiniin. Myös  $\text{Eu}^{3+}$ - ionin lisäys erikseen auttoi, koska tällöin  $\text{Eu}_{3+}$ -ioni pääsi sitoutumaan ensin modifioituun biotiiniin ja  $\beta$ -NTA- ja TOPO-ligandit eivät päässeet tähän väliin.

## LÄHTEET

- 1 Davies, C., (1994), Principles. Kirjassa: Wild, D. (toim.), The Immunoassay Handbook, Macmillan Press LTD, Lontoo, Iso-Britannia, ss. 3-6
- 2 Structure of the Antibody IgG [online, viitattu 20.4.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/u1fig26l.html](http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/u1fig26l.html)
- 3 Valeur, B., (2002), Molecular Fluorescence, WILEY-VCH, Federal Republic of Germany
- 4 Hemmilä, I.A., (1991), Applications of fluorescence in immunoassays, A series of monographs on analytical chemistry and its applications, **117**, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA ss 51-53
- 5 Fluorescence [online, viitattu 10.5.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.art.ca/en/preclinical/optical-molecular-imaging/fluorescence.php](http://www.art.ca/en/preclinical/optical-molecular-imaging/fluorescence.php)
- 6 Hemmilä, I.; Harju, R. (1994), Time-resolved fluorometry. Kirjassa: Hemmilä, I.; Ståhlberg, T.; Mottram, P. (toim.), Bioanalytical applications of labelling technologies, Wallac Oy, Turku, Suomi, ss. 86
- 7 Eftink, M.R., (1991), Fluorescence Quenching: Theory and Applications. Kirjassa: Lakowicz, J.R (toim.), Topics in Fluorescence Spectroscopy, **2**, Plenum Press, New York, USA, ss. 53-54
- 8 Huttunen, R. *et al.* (2011), Single-label time-resolved luminescence assay for estrogen receptor-ligand binding, Analytical Biochemistry, ss 28
- 9 Avidin-biotin Interaction [online, viitattu 11.4.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4A957146-5056-8A76-4E97-81995432210B](http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4A957146-5056-8A76-4E97-81995432210B)
- 10 Hemmilä, I. *et al.* (1984), Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays, Analytical Biochemistry, **137**, ss. 335
- 11 EDTA – A molecule with a complex story [online, viitattu 3.5.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edta.htm](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edta.htm)
- 12 DTPA [online, viitattu 8.5.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.avachemicals.net/dtpa.html](http://www.avachemicals.net/dtpa.html)
- 13 Penetic Acid – Diethylene Triamine Pentaacetic Acid (DTPA) Chemical Structure [online, viitattu 8.5.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---P/Penetic-Acid---DTPA.htm](http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---P/Penetic-Acid---DTPA.htm)
- 14 High Performance Liquid Chromatography – HPLC [online, viitattu 3.5.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html](http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html)
- 15 N<sub>ε</sub>-(N-(+)-Biotinyl-6-aminohexanoyl)-N<sub>α</sub>, N<sub>α</sub>-bis(carboxymethyl)-L-lysine tripotassium salt [online, viitattu 20.4.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/51410?lang=fi&region=FI](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/51410?lang=fi&region=FI)
- 16 N-(+)-Biotinyl-3-aminopropylammonium trifluoroacetate [online, viitattu 8.5.2012] Saatavilla [www-muodossa: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/71776?lang=fi&region=FI](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/71776?lang=fi&region=FI)

- 17 Stryla, Z. *et al.* (1995), Measurements of the luminescence lifetimes of Europium (III) ion in NTA aqueous solution system, Proceedings of SPIE, **2202 (1)**

Taulukko 21:  $\text{Eu}^{3+}$ -testi EDTA- ja DTPA-lisäyksillä.

	c(SA) (nM)	Bioligandi	c(biotiini) ( $\mu\text{M}$ )	Keskiarvo	CV %	+ 1mM HCl	Keskiarvo	CV %	+ 10mM HCl	Keskiarvo	CV %	
1 $\mu\text{M}$ $\text{Eu}^{3+}$	0	0	0	872567	90,0		516408	121,0		11672	37,1	
			10	539640	11,1		260886	28,1		9257	51,7	
		1:100	0	55649	18,3		35363	8,3		3755	14,8	
			10	29213	16,4		21395	23,1		2402	41,7	
		500	0	0	1086913		104,5	395997		43,6	57635	26,5
				10	473244		29,5	314927		34,7	35371	62,1
	1:100		0	47792	14,7		26119	15,3		5057	23,9	
			10	41769	31,6		26592	31,9		2225	49,3	
	1 $\mu\text{M}$ $\text{Eu}^{3+}$ + 1 $\mu\text{M}$ EDTA	0	0	0	342206		49,4	172831		61,5	14879	112,8
				10	569036		75,9	397543		121,6	22223	178,2
			1:100	0	43949		46,4	34571		49,8	4169	24,0
				10	45402		66,7	35686		72,0	9893	132,3
500			0	0	444618	21,6	263904	29,5	43968	41,4		
				10	1143616	96,2	848029	96,1	104345	89,3		
		1:100	0	1043534	169,0	510661	160,8	36748	126,0			
			10	32427	16,0	20208	13,2	1957	30,6			
1 $\mu\text{M}$ $\text{Eu}^{3+}$ *+ 1 $\mu\text{M}$ DTPA		0	0	0	175818	71,4	52917	74,5	19830	170,4		
				10	112204	54,9	41858	55,6	1750	70,7		
			1:100	0	32217	19,2	20365	46,6	5816	103,8		
				10	13100	16,7	7471	34,3	783	56,8		
	500		0	0	224765	7,5	117613	13,0	11316	27,7		
				10	210317	13,9	129246	13,2	6062	22,4		
		1:100	0	32757	7,9	20413	19,8	3291	31,9			
			10	21774	22,0	17073	47,6	3729	140,3			



Taulukko 22: Eu<sup>3+</sup>-testit β-NTA:TOPO-lisäyksillä.

				Ei β-NTA:TOPO		β-NTA:TOPO		+ 1mM HCl		+ 10mM HCl	
	c(SA) (nM)	Bioligandi	c(biotiini) (μM)	Keskiarvo	CV %	Keskiarvo	CV %	Keskiarvo	CV %	Keskiarvo	CV %
1 μM Eu <sup>3+</sup> + 1 μM β-NTA	0	0	0	4317	58,7	548316	47,2	242679	67,5	12758	52,2
			10	7080	161,1	496238	49,9	260570	60,9	13790	144,3
		1:100	0	541	33,1	36778	23,8	23252	16,8	2835	36,5
			10	714	40,8	25163	24,8	18057	15,2	1759	26,6
	500	0	0	2383	49,1	420691	13,0	224258	13,4	20338	24,0
			10	1563	32,4	307133	13,6	198386	14,0	7067	25,8
		1:100	0	1101	61,3	39305	12,6	26546	14,1	4427	45,1
			10	676	40,0	22544	8,3	17843	12,7	1808	33,5
0,3 μM Eu <sup>3+</sup> -β- NTA:TOPO 1:03:03	0	0	0	618281	9,7	815	29,3	428	27,8	155	4,7
			10	526260	6,4	955	14,9	653	6,5	160	7,1
		1:100	0	44548	33,1	471	6,8	353	9,4	156	7,5
			10	91744	23,8	749	23,2	652	24,2	278	22,1
	500	0	0	524193	14,2	10188	42,7	4534	43,7	426	37,9
			10	727375	5,4	29314	14,6	15164	17,8	1009	21,8
		1:100	0	64291	52,0	506	18,7	383	15,1	190	10,3
			10	146085	25,9	988	18,4	772	9,7	305	8,0