



Teemu Tuovinen

VERTAILUMENETELMÄN KEHITTÄMINEN VASTA-AINESENSORILLE

VERTAILUMENETELMÄN KEHITTÄMINEN VASTA-AINESENSORILLE

Teemu Tuovinen
Opinnäytetyö
Syksy 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian sv.

Tekijä(t): Teemu Tuovinen

Opinnäytetyön nimi: Vertailumenetelmän kehittäminen vasta-ainesensorille

Työn ohjaaja(t): Marja Nissinen, Matti Nieminen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2013

Sivumäärä: 40 + 17 liitettä

Opinnäytetyö tehtiin kesällä 2013 osana BioPrint-projektin #3-sensorimallin valmistusta. Työssä kehitettiin sandwich-ELISA-menetelmä antigeenin kvantitatiiviseen määrittämiseen käyttäen HRP-leimattua vasta-ainetta.

Painettujen sensorien avulla saadaan yksinkertaistettua ja nopeutettua esimerkiksi tarkkailua tai suurta otantaa vaativia testejä. Sensorit vaativat myös vähemmän näytettä, perinteiseen menetelmään verrattuna. Sensoreilla mitatessa testin suorittaja tarvitsee vähemmän koulutusta, kuin mitä vastaavan kliinisen testin suorittaminen vaatii. Sensorin kehityksestä saatavia tietoja voidaan tulevaisuudessa käyttää toisten vasta-ainesensorien kehitykseen. Vasta-ainesensoreilla puolestaan on todella suuri potentiaali terveydenhoidossa.

Työssä titrattiin sekä kaivoon sidotun, että leimana olevan vasta-aineen määrää testeissä. Työssä käytettiin valmiiksi monoklonaalisesti tuotettuja vasta-aineita, joita käytetään vastaavassa RIA-menetelmässä.

Menetelmää pyrittiin saamaan kliinisellä alueella lineaariseksi välillä 0–250 µg/l. Työtä hankaloitti vasta-aineiden ja antigeenin välisen affiniteetin suuruus, jonka seurauksena standardisuoran käytettävä lineaarisuusalue oli hyvin matalilla pitoisuuksilla, 0-640 ng/l.

Koska menetelmässä käytetyt vasta-aineet ja antigeeni ovat toimeksiantajan pyynnöstä luottamuksellisia, joten työssä keskitytään kuvaamaan sandwich-ELISAn kehitystä yleisellä tasolla sekä työssä esiintyneitä ongelmia.

Asiasanat: Sandwich-ELISA, HRP, TMB, vasta-ainesensori, kestävä kehitys, painettu teknologia

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences, Biotechnology

Author(s): Teemu Tuovinen

Title of thesis: Development of comparison assay for Antibody sensor

Supervisor(s): Marja Nissinen, Matti Nieminen

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2013 Pages: 40 + 17 appendices

The thesis was done at summer 2013 as a part of development BioPrint-projects #3 sensor model. A sandwich-ELISA assay was developed as a comparison for Quantitative measurement of antigen. Assay used HRP as a label.

Printed sensors simplify and speed up test that require long time surveillance or large sampling. Sensors usually require less samples material when compared to traditional assays. Using printed sensors is simpler than traditional test and so less training is required for assay. Knowledge gained from development of sensors can be used for future development of similar sensors. The antibody sensors have great potential at the future of healthcare.

This thesis addresses optimization of concentrations of both label and primary antibodies. The antibodies used in thesis have been produced monoclonal and are already used at similar RIA-assay.

Assay was intended to be linear at clinic range between 0–250 µg/L. However, the affinity of antigen and antibody proved to be too great and linear range was only between 0–640 ng/L.

For the used antibodies and antigen are confidential by the request of employer, thesis describes general development of sandwich-ELISA and the problems that occurred during the development.

Keywords: Sandwich-ELISA, HRP, TMB, Antibody sensor, sustainable development, Printed technology

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
ABSTRACT	4
SISÄLLYS	5
1 JOHDANTO	8
2 ELISA-MENETELMÄT	9
2.1 Suora-ELISA	9
2.2 Epäsuora-ELISA	10
2.3 Sandwich-ELISA	10
3 PROTEIINIIN ELISA-TESTISSÄ	11
3.1 Vasta-aineiden tuottaminen ELISAA varten.	11
3.2 Kaivojen päällystys	12
3.3 Antigeenin kaappaus	13
3.4 Leimavasta-aine	14
4 ELISA-LEIMAT	15
4.1 Alkalinen fosfataasi	15
4.2 Piparjuuriperoksidaasi	15
4.3 Piparjuuriperoksidaasin substraatit	16
4.4 Entsyymillä leimaaminen	17
5 PAINETTU TEKNOLOGIA	18
6 PAINETUT SENSORIT	20
7 ELISA-MENETELMÄN OPTIMOINTI	25
7.1 Sandwich-ELISA-menetelmän perusohje	25
7.2 Vasta-aineiden leimaus	26
7.3 Ankkurivasta-aine	27
7.4 Standardisuora	28
7.5 Leimalaimennus	29
7.6 Lineaarisuuden parantaminen	30
7.7 Näytteen käsittely	32

8 TULOKSET	33
9 YHTEENVETO	37
LÄHTEET	38
Liite 1 Rochen leimausohje	
Liite 2 Mittauspäiväkirja	

SANASTO

BSA	Bovine serum albumine on naudan verestä eristetty proteiini, jota käytetään usein eri tutkimuksissa.
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay on entsyymeihin perustuva spesifinen ja kvantitatiivinen immunologinen määrittämenetelmä.
HRP	Horseradish peroxidase eli piparjuuriperoksidaasi on piparjuuresta eristetty entsyymi joka hapettaa tiettyjä yhdisteitä. Useimmiten käytetään amiini-ryhmien hapettamiseen eri yhdisteissä, kuten bensiidiini tai TMB.
IgG	Immunoglobulin G on neljän peptidiketjun muodostama Y-kirjaimen muotoinen immunoproteiini, joilla on spesifinen pään tiettyä anti-geeniä vastaan.
PBS	Phosphate buffer saline on usein neutraalissa pH:ssa käytetty fosfaattipuskuri, jossa mukana muita suoloja.
PBST	PBS, johon on lisätty Tween20 tunnettuun pitoisuuteen, esimerkiksi 0,5 %. Tween20 estää epäspesifisiä sitoutumisia ja on siten parempi pesupuskurina ja laimennoksissa ELISA-menetelmissä.
Sensori	Fysikaalista, kemiallista tai biologista muutosta havaitseva laite, joka muuttaa sen signaaliksi. Tekstissä signaali on sähkökemiallinen ja tuotettu painettavalla teknologialla.
TMB	3,3',5,5'-tetrametyyli-[1,1'-bifenyyli]-4,4'-diamini toimii yhtenä useista mahdollisista substraateista HRP:lle. Reaktio vaatii vetyperoksidin läsnäolon ja muodostaa värillisen liuoksen.

1 JOHDANTO

Painettava teknologia, tai painettava äly, on uudehko teknologianala, jossa toiminnallisten rakenteiden painaminen tehdään perinteisestä poikkeavilla materiaaleilla, kuten johtavilla musteilla ja alustana voidaan käyttää taipuisia materiaaleja kuten paperi, pahvi tai muovi. Tämä mahdollistaa tuotteen taipuisuuden. Toiminnalliset rakenteet voidaan painaa myös mekaanisiksi, jolloin niiden toiminta perustuu esimerkiksi mikrokanaviin.

Painetun teknologian alaluokkana voidaan katsoa olevan painettu elektroniikka. Painettu elektroniikkaa on yhdistettävissä perinteiseen, ”jäykkään”, teknologiaan. Verrattuna painettuihin laitteisiin perinteisillä menetelmillä päästään toistaiseksi parempaan tehokuteen ja niistä on enemmän kokemusta.

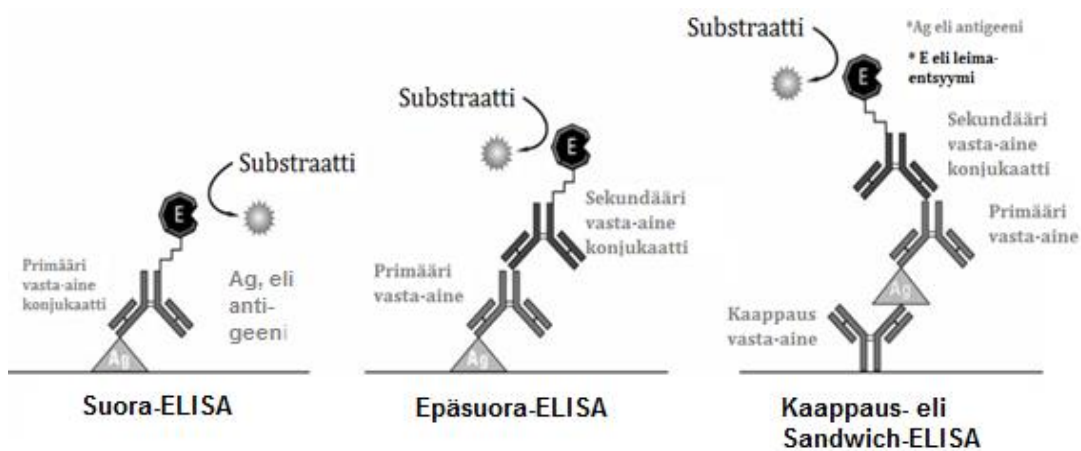
Esimerkkejä painetun teknologian mahdollisuuksista ovat painetut aurinkokennot tai diabeetikkojen käyttämät verensokeria mittaavat liuskat, biosensorit. Liuskat ovat samalla esimerkki perinteisen ja painettavan teknologian yhdistämisestä.

Diabeetikkojen käyttämät biosensorit perustuvat entsyymien spesifisyyteen, mutta sensorit voivat perustua myös immunologiseen spesifisyyteen. Immunologiset biosensorit perustuvat samaan biomolekyyliseen spesifisyyteen, kuin ELISA-menetelmät. Biomolekyylien määrän ja monipuolisuuden vuoksi, myös biosensoreita voidaan kehittää moneen tutkimukseen. Mikäli sopivia vasta-aineita tai antigeenejä voidaan tuottaa tarpeeksi, voidaan periaatteessa myös sensori valmistaa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda ELISA-menetelmä antigeenin määrittämiseksi. Kehitettyä menetelmää ja leimattuja vasta-aineita voitaisiin käyttää elektrokemiallisen vasta-ainesensorin kehittämiseen Gwent Group yhtiössä. Opinnäytetyö tehtiin osana PrintoCent-yhteisön BioPrint-projektia. PrintoCent-yhteisö on VTT:n, Oulun yliopiston, Oulun ammattikorkeakoulun, Oulun kaupungin ja Oulu Innovaatio Oy:n perustama yhteisö, jonka tehtävänä on kehittää ja edistää painattavan älyn tutkimista ja teollistamista. Työosuus tehtiin kesällä 2013 ja sen tarkimmat yksityiskohdat on salattu toimeksiantajan toivomuksesta.

2 ELISA-MENETELMÄT

ELISA, enzyme linked immunosorbent assay, perustuu antigeenin ja vasta-aineen avainlukko-periaatteeseen (1). Kun antigeeni ja vasta-aine kohtaavat, ne muodostavat sidoksen keskenään (2). Syntynyttä sidosta voidaan käyttää näytteen spesifiseen tunnistamiseen. Jokaisen sitoutumisvaiheen jälkeen sitoutumattomat huuhdellaan pois ja näytteille lisätään substraattia, josta leimaentsyymi tuottaa mitattavaa yhdistettä. (1). Näytteen luonteen, määrän sekä halutun spesifisyyden mukaan määräytyy ELISA-menetelmä kolmesta mahdollisuudesta, suora-, epäsuora- tai sandwich-ELISA. (Kuva 1)



KUVA 1 Eri ELISA-menetelmät (1)

2.1 Suora-ELISA

Suora-ELISA on yksikertaisin ELISA-menetelmä, joten se on nopein suorittaa. Menetelmä vaatii entsyymileimauksen primäärivasta-aineeseen. Leimavasta-aine sitoutuu kaivoissa olevaan antigeeniin. Leima antaa substraatin lisäyksen jälkeen reaktion, joka voidaan mitata. (Kuva 1) Leimaus voi vähentää vasta-aineen immunologista sitoutumiskykyä. (1.)

Suoraa menetelmää voidaan käyttää myös kilpailevaan sitoutumiseen. Kilpailevassa menetelmässä leima liitetään puhdistettuun antigeeniin, jota lisätään reaktioon. Näytteen sisältämä antigeeni kilpailee sitoutumispaikoista leimatun vasta-aineen kanssa. Kasvattamalla muuten vakio-määrässä näytteen määrää suhteessa leimattuun, saadaan käänteisestä verrannosta näytteen sisältämän antigeenin pitoisuus. (3.)

Suora-ELISA on nopein suorittaa sekä kilpailevana että ei-kilpailevana. Tämä onkin sen paras puoli, jos menetelmän nopeudesta saatava hyöty voittaa tarkkuuden menetyksen. Suora-ELISA vaatii paljon näytemateriaalia. (1.)

2.2 Epäsuora-ELISA

Epäsuorassa menetelmässä lisätään spesifisyyttä sekundäärivasta-aineella, johon entsyymi leimataan. Sekundäärivasta-aine toimii koettimena, joka sitoo leiman näytteeseen. (Kuva 1) Tällöin saavutetaan parempi spesifisyys, joten suoran menetelmän herkkyys jää parhaimmissakin olosuhteissa epäsuorasta menetelmästä. Lisäksi suora-ELISA soveltuu epäsuoraa huonommin pienten pitoisuuksien määrittämiseen. (1.)

Epäsuorassa-ELISAssa saattaa esiintyä kaivon lopulliseen päällystämiseen, kouttaamiseen, tai blokkaukseen käytettyjen proteiinien ja sekundäärivasta-aineen välistä sitoutumista. Mikäli ylimääräisiä sitoutumisia ei tapahdu, on epäsuora-ELISA hyvä vaihtoehto menetelmäksi. (1.)

2.3 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISAssa näytteenä oleva antigeeni kaapataan vähintään kahden vasta-aineen väliin. Koska molemmat vasta-aineet tarttuvat spesifisesti näytteeseen, menetelmän spesifisyys on kokonaisuudessaan hyvin suuri. Menetelmän spesifisyydestä johtuen näytettä ei tarvitse erikseen puhdistaa. Lisäksi sandwich-ELISAlla voidaan saavuttaa muita ELISA-menetelmiä parempi vaste. Sandwich-ELISA-menetelmän optimointi vaatii kuitenkin usein enemmän kehitystyötä kuin muut ELISA-menetelmät. (4.)

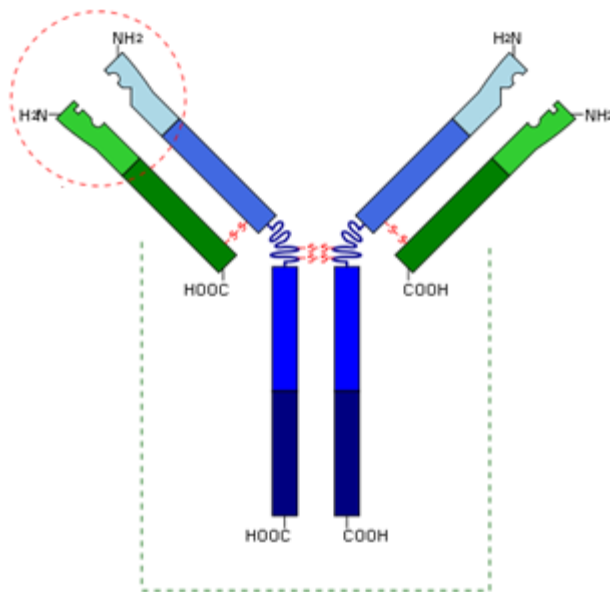
Sandwich-ELISA voi olla suora tai epäsuora. Suorassa sandwich-ELISAssa antigeeniin sitoutunut vasta-aine on samalla leimavasta-aine. Tällöin säästetään aikaa ja vasta-ainekuluja suhteessa epäsuoraan sandwich-ELISAan. (1.)

Epäsuorassa sandwich-ELISAssa (kuva 1) antigeeniin sitoutuvan vasta-aineen jälkeen lisätään spesifinen sekundäärivasta-aine (1). Spesifisyys perustuu vasta-aineen eläinspesifisyydelle kolmannen vasta-aineen etsiytyessä kakkosvasta-aineen eläinspesifisten tekijöiden mukaan (4).

3 PROTEIINIT ELISA-TESTISSÄ

ELISA-menetelmän toimivuus perustuu vasta-aineiden spesifisyyteen toistensa suhteen. Lisäksi menetelmän perustana on proteiinien epäspesifinen sitoutuminen. RIA-testeissä havaittiin proteiinien epäspesifinen sitoutuminen näyteastioiden pintaan, mikä osaltaan mahdollisti ELISA-menetelmän keksimisen. (3.)

Vasta-aineista yleisin on IgG (2). Työssä käytetään sitä esimerkkinä puhuttaessa vasta-aineista. Se muodostuu kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta ketjusta. Rakenne muistuttaa Y-kirjainta. Kuvassa 2 antigeenille spesifinen alue on ympyröity. Vastaava alue löytyy myös toisesta haarasta. Vasta-aine tarttuu antigeeniin spesifisellä alueellaan. Mikäli spesifisen alueen toiminta estyy, ei vasta-aine toimi menetelmässä. (2.)



KUVA 2 IgG-vasta-aineen rakenne (5)

3.1 Vasta-aineiden tuottaminen ELISAA varten.

ELISA-menetelmässä tarvittavat vasta-aineet voidaan tuottaa poly- tai monoklonalisesti. Tuotantomenetelmästä riippuu vasta-aineen puhtaus ja esikäsittelyn tarve. Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan koe-eläimillä. Koe-eläin altistetaan antigeenille ja vasta-aineet eristetään seerumista. Seerumi kuitenkin sisältää eri kohdille antigeeniä spesifisiä vasta-aineita ja haluttu vasta-aine

joudutaan yleensä puhdistamaan affiniteettisesti ennen käyttöä, jotta saavutettaisiin riittävä herkkyys ja taustan pieneneminen. Eri koe-eläinten välillä on suuria eroja vasta-aineiden välillä. (6.)

Monoklonaaliset vasta-aineet tuotetaan fuusiosoluviljelmissä. Solut tuottavat vain yhdenlaista vasta-ainetta antigeeniä vastaan, eli vasta-ainetuotanto on puhtaampaa kuin polyklonaalinen. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseen tarvittavien solujen luominen on vaikeaa, kallista ja aikaa vievää. Solujen kehittäminen on vaivan arvoista, jos vasta-ainetta tarvitaan suuria määriä, sillä ne ovat oikeissa olosuhteissa pidettyinä ”kuolemattomia”. (6.) Monoklonaaliset vasta-aineet ovat puhtautensa, tasa-laatusensa ja jatkuvan tuotantomahdollisuuden ansiosta ELISA-menetelmän vasta-aineeksi.

3.2 Kaivojen päällystys

ELISA-testiä varten kuoppalevyn kuoppiin sidotaan proteiinia tunnettu määrä, joka riippuu näytteen ja sidottavan proteiinin välisestä affiniteetistä sekä käytetyn levyn kyvystä sitoa proteiinia. Pinnoittamisesta käytetään englanninkielen termiä ”coating”. Sidottava proteiini on menetelmästä riippuen vasta-ainetta tai antigeeniä (kuva 1). (1.)

Kaivoihin voidaan sitouttaa vain tietyn verran proteiinia. PVC-muovin laadusta riippuen sitoutumismäärät vaihtelevat: ”low”- tai ”medium binding” -muovit sitovat vasta-ainetta noin 100–200 ng, kun taas sitoutumista parantavasti käsitellyt muovit, ”high binding” -muovit, sitovat noin 400–500 ng. (3.)

Sitoutuminen tapahtuu passiivisella adsorptiolla. Inkubaation aikana aminohapposivuketjujen ja kuopan seinien polymeerien hydrofobiset osat muodostavat heikkoja sidoksia. Sitoutumisen teho vaihtelee, mutta menetelmä soveltuu periaatteessa kaikille proteiineille. (1.)

Sidottava vasta-aineet laimennetaan sopivalla puskurilla, jonka pH säädetään lievästi emäksiseksi. Emäksisissä olosuhteissa suurin osa proteiineista ohittaa saostumispisteen (pI). Tällä varmistetaan sivuketjujen elektronikonfiguraatio sitoutumiselle edulliseksi pakottamalla karboksyylihap-poryhmä luovuttamaan protoni. Lievä emäksisyys suojaa proteiineja myös denaturoitumiselta. (1.)

Päällystetyt kaivot säilyvät parhaiten jättämällä päällystämiseen käytetty liuos kaivoihin. Tutkimuksissa on todettu päällystysliuokseen jätettyjen ja $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa pakastettujen levyjen säilyttävän alkuperäisen aktiivisuutensa jopa 6 kk levyjen spesifisyyden säilyessä samana. Vastaavat levyt, joita säilytettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ja 2 %:ssa BSA:ssa liuotettuna PBST-puskuriin menettivät enemmän

aktiivisuuttaan ja spesifisyyttään kuuden kuukauden aikana. Jääkaapissa ja vasta-ainepuskurissa kaivot säilyvät joitain viikkoja valmistuksesta. (7.)

Ennen käyttöä kaivojen jäljelle jääneisiin sitoutumiskohtiin tulee sitouttaa proteiineja, jottei näytettä sekä leimavasta-ainetta pystyisi sitoutumaan epäspesifisiin kohtiin kaivossa. Sitoutumispaikkojen täyttöä kutsutaan blokkaukseksi. Epäspesifinen sitoutuminen voidaan todeta, mikäli nollanäytteet antavat systemaattisesti värireaktioita. Muita syitä nollanäytteen värireaktioon ovat esimerkiksi kontaminaatiot muista kaivoista. (3.)

Epäspesifisen sitoutumisen estämiseen käytettyjä blokkauksproteiineja ovat esimerkiksi BSA, joka on yleisimmin käytetty, kaseiini tai kalangelatiini. BSA:n lisäksi käytetään satunnaisesti myös muita seerumeita. Tärkeintä on saada peitettyä muovin sitoutumisalueet. (3.)

Vaikka kaseiinin on todettu olevan joissain tilanteissa parempi blokkaja kokonsa puolesta, BSA on kuitenkin hyvä lähtökohta kokeiluun, sillä se on halpa ja helppokäyttöinen. Rasvaton maitojauhe, joka sisältää lähinnä kaseiinia, on hyvin epätasalaatuista ja saattaa inhiboida entsyymireaktiota. Gelatiini estää paremmin proteiinien keskinäistä, kuin hydrofobista -vuorovaikutusta ja muita seerumeita käytettäessä on huomioitava liuoksen muut vasta-aineet. BSA:ta käytetään yleensä 1–5-prosenttisena liuoksena. (3.)

3.3 Antigeenin kaappaus

Antigeenin annetaan sitoutua inkubaation aikana kaivoihin sidottuihin vasta-aineisiin. Sitoutuminen tapahtuu, kun vasta-aine ja antigeeni kohtaavat satunnaisesti. Kasvattamalla joko inkubaatioaikaa, vasta-aineen pitoisuutta tai antigeenin pitoisuutta saadaan parannettua heikkoa signaalia. Pienentämällä pitoisuuksia tai aikoja signaali puolestaan vähenee. Näin voidaan optimoida menetelmän signaalin tasoa. (8.)

Vasta-aine sitoutuu spesifisesti kevyiden ketjujen päissä olevan sitoutumiskohtan avulla (kuva 2). Vasta-aineet ovat rakentuneet soluissa tiettyä antigeeniä varten ja sopivat kuin avain lukkoon antigeenin kanssa. (6.)

Kun kaappausvasta-ainetta on vähemmän kaivossa, näytteille on vähemmän sitoutumispaikkoja. Sitoutumismäärät pienentyvät samassa suhteessa kaikilla standardipitoisuuksilla, kun antigeenin ja vasta-aineen kohtaamisen todennäköisyys laskee. (8.)

3.4 Leimavasta-aine

Leimattu vasta-aine toimii kuten leimaamatonkin. Se sitoutuu spesifisesti satunnaisissa kohtauksissa näytteen kanssa. Sandwich-ELISassa näyte on jo sitoutuneena kaivon pohjaan kiinnittyneeseen vasta-aineeseen. Vasta-aineet valitaan tunnistamaan eri kohdat antigeenissä. Tällöin näyte jää kahden vasta-aineen väliin, eivätkä vasta-aineet häiritse toistensa sitoutumista. Lopuksi näyte on siis ”kaapattu” kahden vasta-aineen väliin ja muistuttaakin kerrosvoileipää, mistä tulee termi sandwich ELISA. (6.)

Vasta-aineen määrän ollessa hyvin suuri tapahtuu satunnaisesti myös epäspesifistä sitoutumista. Lisäämällä toinen vasta-aine varmistetaan spesifisyys paremmin. Tällöin puhutaan sekundääri-vasta-aineesta ja epäsuorasta menetelmästä. (1.) Esimerkiksi jos tuhannesta vasta-aineesta yksi sitoisi kaivon yhden väärän proteiinin, vaadittaisiin miljoona sitoutumista, jotta tilastollisesti tapahtuisi yksi väärä sitoutuminen myös sekundääri-vasta-aineen kohdalla. Jokainen vasta-aine vaatii kuitenkin oman inkubaatioaikansa (1).

4 ELISA-LEIMAT

ELISA-menetelmässä mitattava signaali muodostuu entsyymien toiminnasta. Entsyymi sidotaan vasta-aineeseen ilman, että se vaikuttaa vasta-aineen sitoutumisalueisiin. Sidottua entsyymiä kutsutaan leimaentsyymiksi ja leimattua vasta-ainetta leimavasta-aineeksi. Valittavia leimoja on useita. Kaksi useimmiten käytettyä leimaa ovat alkalinen fosfataasi (AP) sekä piparjuuriperoksidaasi (HRP). (3.)

4.1 Alkalinen fosfataasi

Alkalinen fosfataasi on ELISA-menetelmien alusta asti käytetty entsyymi (7). AP on metalloentsyymi, joka vaatii rakenteisiinsa sinkkiä toimiakseen. Se irrottaa p-fosfaattiryhmän yhdisteestä, mikä aiheuttaa värireaktion liuoksessa. (3.)

AP on HRP:tä hitaampi entsyymi. Sen toimiessa syntyy alkoholia ja fosfaattia sen hydrolysoidessa orto-fosforisia monoestereitä. Koska mikään tuotteista ei inhiboi entsyymiä, AP kuitenkin kykenee jatkamaan toimintaansa kunnes substraatti loppuu. Näin ollen AP antaa signaalin pienissäkin määrissä, kunhan aikaa kuluu tarpeeksi. (3.)

Yleisimmin AP:n kanssa käytetty substraatti on para-nitrofenyylifosfaatti, p-NPP, jonka hajoamisesta seuraa kellertävä liuos, joka absorboi aallonpituudella 450 nm. p-NPP:n ongelmana on sen heikko säilyvyys. Se voidaan kuitenkin joko pakastaa tai käyttää tablettimuodossa säilyvyyden parantamiseksi. Toinen paljon käytetty substraatti AP:lle on liukoiseksi tehty 5-bromo-4-kloro-3-indolifosfaatti, BCIP, jolla saavutetaan jopa kaksinkertainen herkkyys pienillä määrillä mitattaessa. Lisäksi BCIP on stabiilimpi säilytettävä. (3.)

4.2 Piparjuuriperoksidaasi

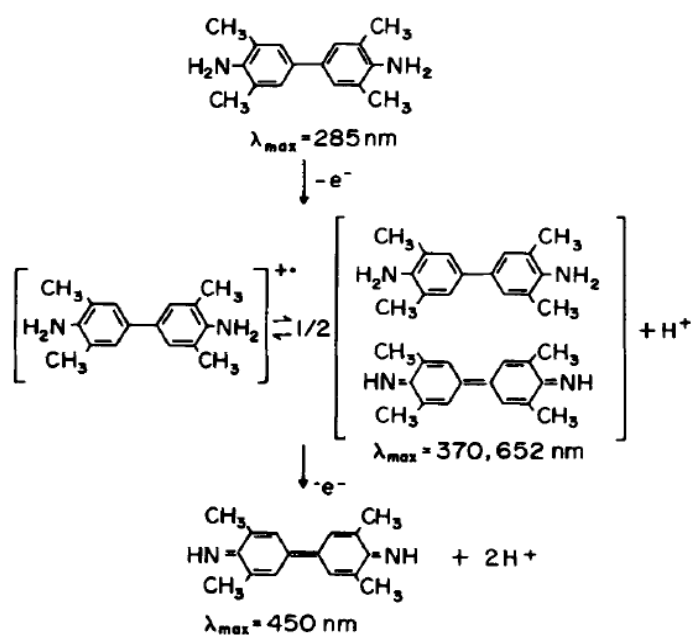
Toinen hyvin usein käytetty entsyymileima on piparjuuriperoksidaasi (HRP) (9). HRP voi käyttää useita eri fenoli- tai amiinisubstraatteja, esimerkiksi 2,2'-atsino-bis-(3-etyyllibentsotiatsoliini-6-sulfonihappoa), ABTS:ää, josta HRP hapettaa sini-vihreää liuosta, tai luminolia, jonka hapettunut muoto fluoresoi (6). Koska HRP on pieni kokoinen, herkkä ja voi käyttää suurta määrää substraatteja, HRP on yleisimmin käytetty leimaentsyymi. Substraattien suuri määrä puolestaan mahdollistaa eri spektrofotometrisiä ja sähkökemiallisia mittaamenetelmiä. (9.)

4.3 Piparjuuriperoksidaasin substraatit

TMB on yleisin käytössä oleva substraatti HRP:lle (10). TMB:n hyviin ominaisuuksiin kuuluu reaktion nopeus ja herkkyys, erityisesti kun reaktio pysäytetään rikkihapolla (3). Sen ei myöskään ole todettu aiheuttavan syöpää, toisinkuin aiemmin käytetty bentsidiini (11). Lisäksi TMB:tä voidaan käyttää kliinisiin testeihin ja sen käytöstä nanomateriaalina on tehty lupaavaa tutkimusta (10; 11).

TMB:n huonoja puolia on sen huono säilyvyys, sillä se hapettuu ilman vaikutuksesta herkästi (12). TMB:n säilyvyydestä on kuitenkin tehty tutkimusta (12). TMB:lle on saatavilla sitä suojelevia puskureita.

Kun TMB:tä käytetään substraattina, HRP-entsyymi muuttaa vetyperoksidin läsnä ollessa TMB:n ensin hapettuneeseen radikaalimuotoon. Radikaali ja lähtöaine muodostavat kompleksin. Reaktio etenee diimineksi rikkihappolisäyksen jälkeen. (Kuva 3.)



KUVA 3 TMB:n reaktio (13)

Kun reaktio lopetetaan sopivalla hapolla, esimerkiksi rikki- tai suolahapolla, absorbanssiipikki siirtyy kaksoispiikiksi aallonpituudelle 450 nm. Menetelmän signaali herkistyy samalla jopa kolminkertaiseksi lopettamattomaan reaktioon verrattuna. Myös testin lukeminen on tarkempaa, kun ajan vaikutus tuloksiin pienenee reaktion pysähtyessä. (3.)

Lopetetussa reaktiossa syntynyt väri haalistuu ajan mittaan. Haalistuminen on kuitenkin hyvin hidasta ja osana optimointia tehdyissä tutkimuksissa värireaktion intensiteetin todettiin pysyvän lähes muuttumattomana yli 4 tuntia. (Liite 2, sivu 13) Yleensä ELISA-levyjen mittaaminen suoritetaan pysäyttämisen jälkeen, mutta tämä mahdollistaa esimerkiksi saman levyn lukemisen useammalla laitteella.

4.4 Entsyymillä leimaaminen

Jotta entsyymi saadaan sitoutumaan vasta-aineeseen, pitää vähintään toinen käsitellä kemiallisesti. Eri menetelmiä on monia, mutta periaate on sama. Jokin ryhmä proteiinissa käsitellään kemiallisesti sitoutumiselle optimaaliseksi, minkä jälkeen sitoutumisen annetaan tapahtua passiivisesti. (14.)

Vasta-aineessa on useita samoja ryhmiä kuin entsyymeissä. Ryhmät saattavat reagoida käsitelyssä, jolloin syntyy vasta-aineiden välisiä sitoutumisia. Väärien sitoutumisten välttämiseksi kehitettiin menetelmiä, joissa entsyymi käsitellään erillään vasta-aineesta sitoutumisherkäksi. Kun sitoutumista aktivoiva kemikaali on poistettu, voidaan haluttu vasta-aine lisätä leimattavaksi. (14.)

Yksi hyväksi havaittu menetelmä on käyttää hyväksi HRP-entsyymin rakennetta. HRP-entsyymillä voidaan katsoa olevan kaksi osaa: HRPO I ja HRPO II. HRPO II sisältää hiilihydraatteja, eikä ole yhtä aktiivisesti osana entsyymin toiminnassa kuin HRPO I. HRPO II:n hiilihydraattiosa voidaan siten hapettaa kemiallisesti HRPO-aldehydiksi, ilman että entsyymin aktiivisuus juuri laskee. HRPO I ei sisällä hiilihydraattiosia, joten se ei hapetu ja aktiivisuus säilyy. (14.)

HRPO-aldehydien vapaat aminoryhmät voidaan täyttää käyttäen 1-fluori-2,4-dinitrobenseeniä. Tällä estetään entsyymejä muodostamasta keskinäisiä sidoksia. Kun käsitelty entsyymi lisätään vasta-aineliuokseen, ainoat vapaat aminoryhmät ovat vasta-aineilla. Entsyymi sitoutuu siten vain vasta-aineeseen hyvin tehokkaasti ilman ylimääräistä entsyymiaktiivisuuden menettämistä. (14.)

5 PAINETTU TEKNOLOGIA

Painettu teknologia tai äly on laaja käsite, johon kuuluvat painamalla valmistetut sähköisesti tai mekaanisesti toimivat laitteet. Painotekniikoilla voidaan valmistaa esimerkiksi mikrokanavia, jotka voivat esimerkiksi hydrofobisuudella tai kapillaariefektillä ohjata pieniä näytemääriä kanavia pitkin. Tällöin kyseessä on mekaaninen laite. Kanavissa voi tapahtua näytteen käsittelyä tai mittaus.

Mikäli painetaan esimerkiksi johtavia musteita, voidaan puhua painetusta elektroniikasta. Perinteisesti elektroniikassa on käytetty jäykkiä piipohjaisia materiaaleja. Koska painetussa elektroniikassa piirit painetaan taipuisille materiaaleille, ne kestävät taivutusta, toisin kuin perinteinen elektroniikka, ja niitä voidaan hyvin muotoilla esimerkiksi kaareviksi (15.) Yksinkertaisimmillaan elektroniikkaa voidaan painaa silkkipainomenetelmällä. Muita jo käytössä olevia menetelmiä ovat esimerkiksi 3D-dispensointi, jossa laite annostelee kolmiulotteisen ohjelman mukaisesti materiaalia, Injet-laitteet, jotka perustuvat mustesuihkuun kuten normaalit mustesuihkutulostimet, tai rullalta rullalle menetelmät, joissa painoalusta kulkee rullien välissä. Rullat tuovat materiaalin painoalustalle. (16.)

Painomenetelmin tuotetut laitteet ovat perinteisiä laitteita halvempia valmistaa suurissa määrissä. Inkjet-laitteilla voidaan myös tuottaa muutamien kappaleiden eriä perinteistä elektroniikkaa halvemmalla, sillä perinteisen elektroniikan halpuus vaatii massatuotannon. (17.) Painetut tuotteet jäävät kuitenkin vielä tehokkuudessa perinteisellä menetelmällä tuotetuista laitteista (16).

Painettavaa teknologiaa leimaa monialaisuus, sillä toimivien tuotteiden saamiseksi tarvitaan useiden eri alojen osaamista. Monialaisuuden tarpeen uskotaan luovan tulevaisuudessa työpaikkoja korkeasti koulutettuihin maihin, joista löytyy paljon eri alojen työvoimaa. Painettu teknologia on vielä verrattain uutta, mutta sitä kohtaan on paljon kiinnostusta (17).

Painetuilla tekniikoilla tuotetut tuotteet ovat verrattain halpoja ja esimerkiksi sähkökemialliseen reaktioon perustuvien menetelmien mittalaitteet voivat olla hyvin pieniä akulla toimivia laitteita. Esimerkiksi luvussa 6 esitellyt elektrokemialliset vasta-ainesensorit voivat toimia syrjäseuduilla tautien tarkkailuun ja tutkimiseen perinteisiä menetelmiä paremmin.

Painetulla teknologialla on vielä edessään haasteita. Erityisesti valmistusmenetelmiä ja kierrätystä optimoimalla painetun elektroniikan arvioidaan olevan ympäristölle ystävällisempi kuin perinteinen teknologia, sillä optimoidussa valmistuksessa energiakustannuksissa syntyy säästöä perin-

teiseen verrattuna. Toisaalta painettujen laitteiden lyhytikäisyys ja metallin uudelleen käyttö ovat ongelmia. Verrattuna perinteiseen elektroniikkaan raaka-ainemäärät ovat kuitenkin pieniä ja alusmateriaalina voidaan käyttää biohajoavaa materiaalia. (17.)

BioPrint-projektin tavoitteena on saada aikaiseksi kolme biosensorimallia, joiden kehityksestä opittuja tietoja ja taitoja voivat alalle syntyvät yritykset hyödyntää omien tuotteiden kehityksessä ja optimoinnissa. Kaksi ensimmäistä sensoria perustuvat suoraan entsyymien spesifiseen toimintaan. Kolmas sensorimalli on vasta-ainesensori ja siinä hyödynnetään opinnäytetyön tuloksia sekä työssä leimattuja ja testattuja vasta-aineita.

6 PAINETUT SENSORIT

Painettujen sähkökemiallisten sensorien toiminta perustuu sähkövirran mittaamiseen. Hapettavat entsyymit, kuten HRP tai glukoosioksidiaasientsyymi vapauttavat toiminnassaan elektroneja, jotka muutetaan sopivalla siirtäjällä, elektrodilla, liuksesta mitattavaksi virraksi. Painettavat sensorit voidaan jakaa biokatalyyttisiin tai affiniteettisensoreihin näytteen mittaustavan mukaisesti. (18.)

Kaikissa painetuissa sensoreissa on vähintään kaksi elektrodia. Toinen elektrodeista on työelektrodi ja toinen referenssielektrodi. Yleensä mukana on myös kolmas elektrodi, sillä suuremmilla virroilla referenssielektrodi ei kykene täysin siirtämään virtaa. Tuo vastaelektrodi siirtää elektrolyysistä muodostuvan varauksen, ja siten suojelee referenssielektrodia liian suuren varauksen aiheuttamilta muutoksilta. (18.)

Biokatalyyttiset sensorit perustuvat biomolekyylien, kuten entsyymien, spesifisyyteen havaittavan näytteen suhteen. Näin ollen biokatalyyttisiin sensoreihin luetaan yksinkertaisimmat biosensorit. (18.)

Esimerkiksi glukoosin määrittämiseen biokatalyyttisellä sensorilla tarvitaan elektrodin pinnalle vain glukoosioksidiaasientsyymiä. Glukoosioksidiaasientsyymi hapettaa glukoosin δ -D-glukonolasetoniksi. Samalla entsyymi pelkistää happea vetyperoksidiksi, joka hapettuu sähkövirrassa, jolloin vapautuu elektroneja, happea sekä vapaita vetyioneja. Vapautuneet elektronit aiheuttavat virran muutosta, jota vahvistetaan välittäjillä, jotka korvaavat heikkoliukoiset happimolekyylit. (18.)

Vasta-ainesensorit puolestaan perustuvat biomolekyylien affiniteettiin havaitsemisessa. Kuten ELISA-menetelmässä, vasta-aineen ja antigeenin välinen affiniteetti on hyvin vahva ja spesifinen sidos. Samaan affiniteettiin pohjaten voidaan kehittää tuotantoon vasta-ainesensori. (18.)

Kuten perinteisestä ELISA-menetelmästä kehitettäessä myös vasta-ainesensorille siirryttäessä pitää ottaa huomioon sekä menetelmän ja leiman tyyppi että signaalin havaitsemiskeino. Verrattuna perinteiseen ELISA-menetelmään substraatista pitää entsyymien toiminnasta syntyä sähkökemiallisesti aktiivinen tuote. Toisaalta sähkökemiallisesti tarjoaa enemmän vaihtoehtoja mittaustelmisiin. (19.)

Substraatin valintaa suurempana ongelmana on yleensä vasta-aineiden sitoutuminen sensorin pinnalle. Leimavasta-aine ei saisi muodostaa epäspesifisiä sidoksia alustan kanssa, mutta kaappausvasta-aineen pitäisi sitoutua hyvin tehokkaasti, jotta saavutettaisiin riittävä tiheys sensorin toiminnalle. (18.)

Kuten ELISA-menetelmissä, myös elektrokemiallinen vasta-ainesensori voi olla kilpailuun tai kaappaukseen perustuva. Kilpailevassa menetelmässä sensorille lisätään sekä näyte antigeeniä, että leimattua antigeeniä, jolloin näytteen määrä on kääntäen verrannollinen signaalin määrään. Kaappaus toimii kuten ELISA-testissä. (19.) Mikäli käytetyt vasta-aineet ovat vaikeita tuottaa tai saatavilla on monoklonaalisia vasta-aineita näytteelle, on yleensä parempi kokeilla kaappausmenetelmää ensin.

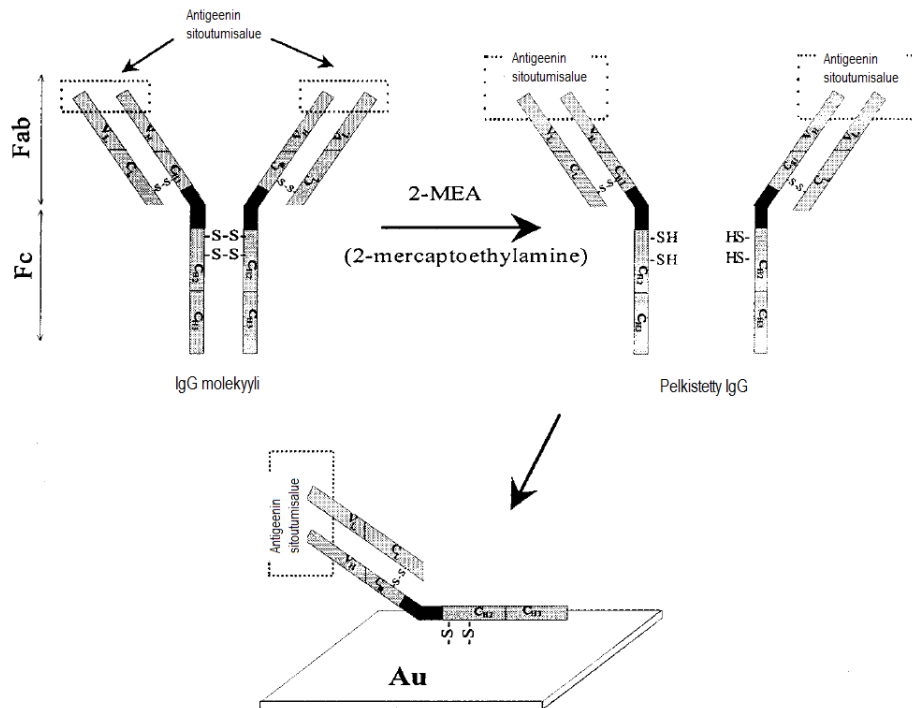
Jotta vasta-aine toimisi, se ei saa sitoutua väärästä kohtaa sensorinpinnalle. Mikäli vasta-aine sitoutuu antigeenin sitoutumisalueesta sensorille, vasta-aine ei voi toimia ankkurina antigeenille. Väärällä tavalla sitoutuneita vasta-aineita on myös ELISA-menetelmissä, mutta sensorit ovat herkempiä väärästä kohtaa sitoutuneille vasta-aineille. (18.)

Ero herkkyydessä johtuu sitoutumispinta-alan määrästä. Vasta-ainesensorilla on sitoutumisille käytössä vain yksi pinta, toisin kuin ELISA -menetelmässä, jossa vasta-aine sitoutuu kaivonpohjaan ja seinille. Sensorit ovat usein myös halkaisijaltaan kaivoja pienempiä. Koska liian tiheä sitoutuminen voi myös aiheuttaa signaalin laskua steerisisten esteiden vuoksi, sitoutumistiheyttä ei voida vain kasvattaa keinotekoisesti. (18.)

Menetelmän herkkyys väärälle sitoutumiselle on johtanut parempien sitouttamismenetelmien tutkimiseen. Menetelmät pyrkivät usein parantamaan sitoutumista spesifisyyden lisäämisellä ja lupaavalta vaikuttavilla tekniikoilla on useita. (19.)

Esimerkiksi vasta-ainemolekyylin haarojen pilkkominen erilleen parantaa spesifisyyttä (kuva 4). Optimoimalla 2-merkaptotyylilamidin väkevyys ja inkubaatioaika sopivaksi vasta-aineen määrään suhteen, reaktio saadaan spesifisimmäksi raskaiden ketjujen väliselle di-sulfididokselle. Optimoimista on mahdollista, sillä lyhyen ja raskaan ketjun välinen di-sulfididoksen on todettu olevan hieman epäspesifistä sidosta pysyvämpi. Halkaistu molekyyli koostuu näin ollen yhdestä raskaasta ja yhdestä kevyestä osasta ja vasta-aineen antigeenille spesifinen sitoutumiskohta säilyy aktiivisena. Halkaisukohdan vapaalla sulfidilla molekyyli voidaan sitoa sensorin pinnalle. (Kuva 4.) Esitellyn kaltaisella kemiallisella adsorptiolla saadaan parannettua sitoutumisen spesifisyyttä, jolla

saavutetaan potentiaalisesti jopa nelinkertainen aktiivisuus epäspesifiseen menetelmään verrattuna. (20; 21.)



KUVA 4 IgG-molekyylin sitominen tioliryhmästä (20)

Myös muilla menetelmillä voidaan käyttää hyväksi rikin ja kullan välistä sidosta. Vasta-aineelle spesifiin ryhmiin voidaan syntetisoida tioliryhmiä. Tiolien avulla yhdisteet liittyvät kultasensorin pinnalle ja kaappaavat vasta-aineet häiritsemättä vasta-aineiden toimivuutta. (19).

Edellä mainitut menetelmät vaativat kultapohjaisen sensorin. Lisäksi vasta-aineiden liittäminen elektrodin pinnalle voi vaikuttaa sensorin toimintaan paitsi syntyneen proteiinkerroksen kautta, myös pesujen irrottaessa vasta-aineita, sillä menetelmät hyödyntävät heikkoja sidoksia. Mikäli sensorin pinnoitusolosuhteet muuttuvat, voi se aiheuttaa virhettä mittauksessa. (20.)

Kultasensoria halvempia ovat erilaiset hiilipohjaiset sensorit. Hiileen sidotaan vasta-aineen epäspesifiselle alueelle sitoutumiskykyisiä ryhmiä, jolloin vasta-aineita sitoutuu aktiiviseen asentoon. Synteesi on vielä kallista, mutta sen hinta tulee todennäköisesti laskemaan kun taas kullan hinta on sidoksissa sen markkina-arvoon. Jo nyt synteesihiilipohjaiset sensorit ovat halvempia kuin kultapohjaiset. (19.)

Samoja funktionaalisia ryhmiä voidaan myös polymeroida esimerkiksi rautaoksidirakeiden pinnalle. Metallihelmet antavat enemmän sitoutumispinta-alaa vasta-aineille, eivätkä ne vaikuta sensorin toimintaan yhtä paljon kuin sensorin pinnoittaminen. Metallihelmet saadaan pysymään sensorin pinnalla vahvojen magneettien avulla. (19.) Menetelmä on kuitenkin vielä suhteellisen kallis, eikä sillä synny säästöä suhteessa kultaan.

Kuten ELISA-menetelmissä, myös immunosensorilla mitattaessa näytteen ja leimavasta-aineen epäspesifistä sitoutumista estetään lisäämällä esimerkiksi Tween20:ntä liuoksiin ja blokkamalla epäspesifiset sitoutumispaikat muilla proteiineilla, esimerkiksi BSA:lla. (6.) Epäspesifistä sitoutumista voidaan tarkkailla nollanäytteiden avulla.

Kuten todettu, entsyymit ja substraatit tuodaan elektrokemiallisissa sovelluksissa uudelleen tarkastelun alle. Siinä missä ELISA vaati herkän värireaktion, entsyymien pitää saada sensorilla aikaan elektroaktiivisia reaktioita. Entsyymeistä piparjuuriperoksidaasia (HRP) ja alkaalista fosfaataasia (AP) on käytetty immunosensoreissa vasta-aineiden leimoina. (19.)

HRP-entsyymien parhaisiin elektrokemiallisiin ominaisuuksiin kuuluu yleiskäyttöisyys. HRP voi hapettaa vetyperoksidin avulla useita eri substraatteja. Siten substraatin valitsemisella voidaan säädellä monia mittausolosuhteita. Esimerkiksi TMB antaa, puskurista ja pH:sta riippuen, jännitepiikin alueelle $-0,1 \dots +0,1$. HRP-entsyymille löytyy todennäköisesti kaupallisia leimavasta-aineita sensorien valmistamista varten. TMB:n lisäksi HRP voi käyttää elektrokemiallisissa mittauksissa myös esimerkiksi ABTS-substraattia. (19.) ABTS:n hapettunut muoto on stabiili ja soveltuu hyvin elektrokemiallisiin mittauksiin.

AP:n herkkyys on huonompi ELISA-testeissä, mutta sähkökemiallisissa mittauksissa HRP:n paremmasta entsyymiaktiivisuudesta ei ole yhtä paljon hyötyä, sillä HRP:n vaatima mittausmenetelmä vähentää herkkyyttä. AP:n kanssa voidaan käyttää herkempää mittausmenetelmää ja sille on kehitetty sähkökemiallisiin mittauksiin soveltuvia fosfaatasijohdannaisia. Siten AP:n käyttö HRP:n sijasta voi olla perusteltua. Kuitenkin, sekä AP:n käyttämä fosfaatasijohdannainen, että TMB:n hapettunut muoto passivoivat elektrokemiallisessa reaktiossa elektrodia. (19.)

Substraatit toimivat usein vasta-ainesensorilla välittäjäaineena. HRP:n tapauksessa entsyymi hapettaa vetyperoksidin avulla välittäjäainetta, joka palautuu sähkövirran vaikutuksesta pelkistyneeseen muotoon. Pelkistyessään välittäjäaine kaappaa elektroneja ja sähkövirta pienenee. (17.)

Vasta-ainesensorin kehitys on työlästä. Vasta-aine sensorit voivat kuitenkin pohjautua muiden vasta-ainemenetelmien tutkimuksiin. (18.) Vasta-ainesensorien kehittämisessä onkin katsottu olevan myös useita hyviä puolia perinteiseen menetelmään verrattuna. (22.)

Esimerkiksi perinteinen ELISA-menetelmä vaatii koulutetun työntekijän ja usein paljon välineistöä. Vasta-ainesensorilla menetelmää pyritään yksinkertaistamaan ja nopeuttamaan vähentämällä mittaukseen kuuluvia vaiheita mahdollisimman vähäisiksi. Samalla laitteistoa saadaan pienennettyä. Siten on toivottu saavutettavan jopa teolliseen käyttöön soveltuvia automatisoituja vasta-ainesensoreita. (22.) Elektrokemiallinen mittaus on optimoidulla menetelmällä herkempi ja vähemmän altis värillisten liuosten aiheuttamalle häiriölle. Elektrokemialliset mittaukset voidaan myös kutistaa nanoluokkaan, jolloin näyteliuosta tarvitaan vain nanolitroja. (19.)

Biosensoreilla katsotaan olevan paljon mahdollisia klinisiä sovellutuksia pitkäaikaisseurannan ja pikatestien osalta. Pyrkimys terveydenhuollon kustannusten vähentämiseen lisää yhä enemmän kiinnostusta painettujen sensoreiden kehitykseen. (22.)

7 ELISA-MENETELMÄN OPTIMOINTI

Koska vasta-ainesensori toimii samalla periaatteella kuin ELISA-menetelmä (18), kehitystyössä pitää ottaa huomioon testiin kuluva aika. Valittuun menetelmään vaikuttavat vasta-ainesensorin tarpeet. Näin ollen menetelmistä valittiin suora sandwich-ELISA, kahdella vasta-aineella, joista toinen sidotaan kaivoon kaappaamaan antigeenin ja toinen sitoo entsyymien antigeeneihin.

Menetelmän kehittämisen pohjaksi annettiin lisäksi standardialue, jolle kliiniset näytteet useimmiten osuvat. Valmiit vasta-aineet saatiin PrintoCent-yhteisön jäseneltä ja ne olivat monoklonaalisesti tuotettuja. Vasta-aineita kutsutaan työssä A ja B. Molemmat vasta-aineet olivat spesifiset omalle sitoutumisalueelleen antigeenissä. Vasta-aineita säilytettiin pakastimessa fysiologisessa suolaliuoksessa.

7.1 Sandwich-ELISA-menetelmän perusohje

Suora sandwich-ELISA-menetelmä alkaa kaivojen päällystämällä vasta-aineilla, joiden määrän optimoinnista kerrotaan lisää luvussa 7.3. Päällystäminen tapahtuu inkuboimalla levyjä joko huoneenlämmössä kaksi tuntia tai yön yli jääkaapissa natriumkarbonaattipuskurissa (pH 9,2). Liuoksen lopputilavuus on 100 µl/kaivo. Mikäli levyjä ei käytetä heti, voidaan vasta-aineet jättää kaivoihin käyttöön asti ja säilyttää muutamia viikkoja jääkaapissa.

Ennen käyttöä kaivot pestään useita kertoja yli 300 µl:lla PBST-puskuria, minkä jälkeen loput sitoutumiskohdat kaivossa blokataan BSA:lla. Myös BSA:ta inkuboidaan 2 tuntia huoneenlämmössä tai yön yli jääkaapissa, jonka jälkeen ylimääräiset proteiinit pestään PBST-puskurilla. BSA:ta käytettäessä tulee tarkistaa liuoksen pH, sillä BSA voi sisältää happamuutta aiheuttavia epäpuhtauksia. BSA:ta lisättiin 3-prosenttinen liuos PBST-puskurissa. Lisäyksen tilavuus oli 200 µl, jotta blokkaukset peittäisi kaivon reunoja tarpeeksi. Mikäli negatiiviset kontrollit eivät anna signaalia toimivassa menetelmässä, on blokkaukset onnistuneet.

Pesujen jälkeen lisätään leimavasta-aine tilavuudessa 100 µl, jonka pitoisuudesta ja inkubaatioajan optimoinnista puhutaan luvussa 7.5. Sitoutumattomat leimavasta-aineet pestään pois ja kaivoihin lisätään substraatti, TMB. Substraatti liuotettiin kantaliuokseksi 30-prosenttisellä asetoni-vesiliuoksella pitoisuuteen 1 mg/ml. Käyttöä varten pipetoitiin 1 ml kantaliuosta 9 ml natriumsitraattiasetaattipuskuriin (pH 6.0), johon on lisätty 2 µl väkevää vetyperoksidia. Substraattia lisättiin

kaivoihin 100 µl ja inkuboitiin 15–30 minuuttia, riippuen vahvimman standardin signaalin intensiteetistä. Reaktio lopetettiin 100 µl:lla 2M rikkihappoliuosta.

7.2 Vasta-aineiden leimaus

Leimaus suoritettiin etukäteen vasta-aineille A ja B. Leimaamisen onnistumiseksi, liuoksien vasta-ainepitoisuudet täytyi konsentroida. Konsentroiduissa käytettiin Amicon Ultra -sentrifugifiltterilaitetta, jonka käyttö perustuu suodatinaukkoihin membraanissa. Vasta-aineille sopivan laiteen membraanin suodatinaukkojen koko on 100 kDa. Koska IgG-vasta-aineen kokonaispaino on 150 kDa, se eivät pääse kulkemaan suodatinaukoista. Suodatus toimii samalla pussurin vaihtona ja puhdistusmenetelmänä, kun alle 100 kDa olevat molekyylit poistuvat liuoksesta.

Vasta-aineliuokset laimennettiin natriumkarbonaattipuskurilla (pH 9,8) lopulliseen konsentraatioon 3,8–4,2 mg/ml. Ennen leimausta pitoisuus vielä tarkastettiin spektrofotometrisesti Nanodrop-laitteella. Leimaus suoritettiin Rochen peroksidaasileimauspaketin ohjeiden mukaisesti mukana tulleiden liuosten avulla (liite 1).

Paketin liuokset liuotettiin ohjeiden mukaisesti ja annettiin asettua oikeaan käyttölämpötilaan. Leimaus aloitettiin lisäämällä HRP-konjugaatit suhteessa 1 M IgG : 5 M peroksidaasia. Sitoutumisen annettiin tapahtua yön yli jääkaapissa, minkä jälkeen reaktio lopetettiin trietanolaminilla, natriumborohydridillä ja 30 minuutin jääkaappi-inkubaation jälkeen toisella annoksella trietanolaminia. Glysiiniä lisättiin stabiloimaan tuotetta. Valmistajan leimausohjeesta poiketen leimattu vasta-aine siirrettiin säilytyspuskuriin dialyysin sijasta sentrifugoimalla Amicon-filtterin läpi. Samalla mahdolliset sitoutumattomat HRP-konjugaatit, eli leimaentsyymit, puhdistuvat liuoksesta.

Puhdistetut vasta-aineet laimennettiin lopputilavuuteen 500 µl leimauspaketin stabilointipuskurilla. Liuosten lopullista proteiinipitoisuutta ei voitu tarkistaa, koska peroksidaasiliuos oli värillinen ja stabilointipuskuri sisälsi sekä BSA:ta, että Kathon CG:tä. Arvio aktiivisen proteiinin määrästä voitiin kuitenkin tehdä laskemalla lopullisten ja alkuperäisten tilavuuksien avulla. Lisäksi otettiin huomioon valmistajan ilmoittama aktiivisuuskerroin 0,7. Laskennallinen pitoisuus vasta-aineiden aktiivisuudesta oli 1,72 mg/ml A:lle ja 1,75 mg/ml B:lle.

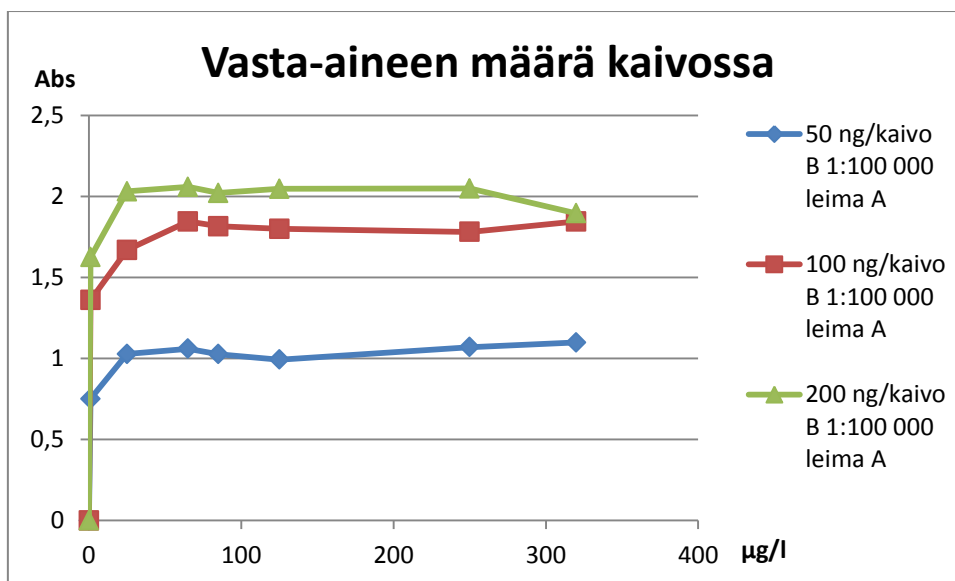
Valmistajan mukaan stabiloitu liuos voidaan säilöä jääkaapissa kaksi kuukautta tai jäädyttää nestemäisellä tyypellä ja säilöä vähintään –60 °C pakkasessa pidempiä aikoja. Pakastamisessa leimaentsyymien aktiivisuus laskee, joten liuos päätettiin säilyttää jääkaapissa.

7.3 Ankkurivasta-aine

Menetelmä testattiin käyttämällä kumpaakin vasta-ainetta ankkurina toisen ollessa leimana. Vasta-aineen A pitoisuus oli toimeksiantajan mukaan 1,92 mg/ml ja vasta-aineen B pitoisuus 1,87 mg/ml.

Kaivoihin sitomiseksi molemmat vasta-aineet laimennettiin pitoisuuteen 10 µg/ml natriumkarbonaattipuskurilla. Tällöin kaivoissa on ylimäärin vasta-ainetta ja saavutetaan maksimaalinen sitoutuminen. Tämä on hyvä lähtökohta menetelmälle. Sitoutuminen todettiin hyväksi saatujen signaalien perusteella, eikä sitouttamispuskuria tarvinnut muuttaa.

Mittauksissa todettiin myös, että vasta-aineen määrää kaivossa täytyy optimoida. Vasta-aineen B todettiin toimivan paremmin ankkurina ja sen optimaalista määrää kaivoissa titrattiin. Lopulta todettiin 50 ng/kaivo riittävän mittauksissa. (Kuva 5.) Alle 50 ng/kaivo pitoisuudet eivät antaneet absorbanssia.



KUVA 5 Vasta-aineen määrä kaivossa

Kun siirryttiin pienempiin näytelaimennoksiin, kaivoissa olevan vasta-aineen määrää nostettiin 100 ng:aan/kaivo signaalin nostamiseksi.

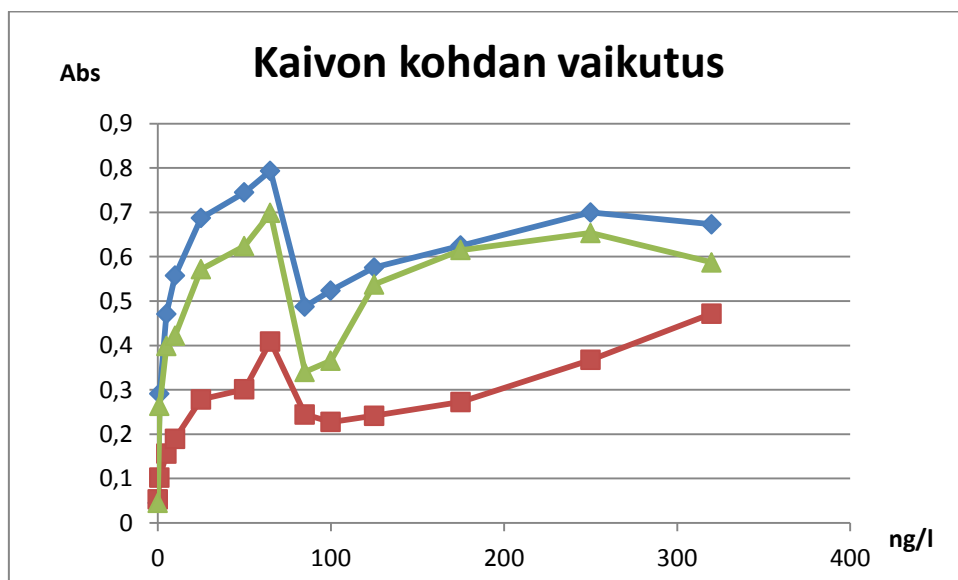
7.4 Standardisuora

Antigeenille haluttu standardisuora saatiin toimeksiantajalta. Toimeksiantajan haluama kliininen toimivuusalue oli 1–250 µg/l. Kaikki standardit laimennettiin PBST:llä, jota käytettiin myös nollanäytteenä.

Ilmoitettu antigeenin pitoisuus oli 858 µg/ml, jota käytettiin alustavasti pitoisuuksien laskemiseen. Myöhemmissä tarkastuksissa antigeenin pitoisuuden todettiin olevan pienempi. Mittauksesta saatiin tulokseksi 320 µg/ml. Tulos poikkesi huomattavasti ilmoitetusta 858 µg/ml ja saatua pitoisuutta laskettaessa seuraavia standardisuoria.

Ensimmäisissä mittauksissa käytettiin kahta rinnakkaista standardia pitoisuuksilla 1; 8,5; 85; 125; 250 µg/l. Mittausten edetessä todettiin, että antigeenin ja vasta-aineiden affiniteetti oli liian hyvän, mistä johtuen jouduttiin käyttämään standardeja myös paljon laimeammista pitoisuuksista, aina 20 ng:sta/l alkaen. Menetelmän havaittiin olevan hyvin lineaarinen pienillä pitoisuuksilla.

Menetelmän huomattiin olevan altis hajonnasta aiheutuvalle virheelle. Esimerkiksi kaivon paikan todettiin vaikuttavan tuloksiin. Epäiltiin, että vaikutus johtui joko monikanavapipetistä, tai standardien valmistuksesta. Virhe toistui systemaattisesti useammassa mittauksessa huolimatta uusien standardien valmistuksesta (kuva 6).



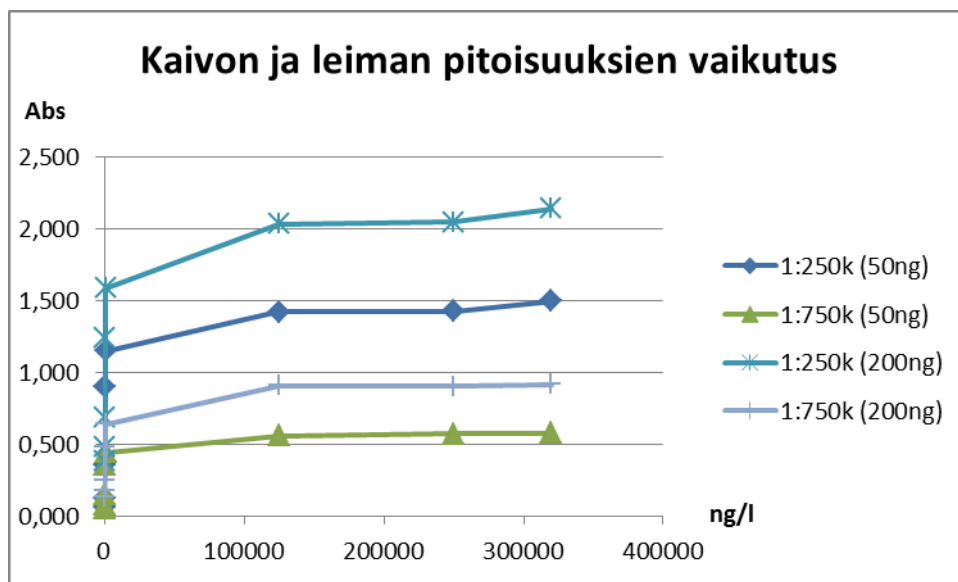
KUVA 6 Kaivon kohdan systemaattinen virhe

Pipetoinnin vaikutuksen pienentämiseksi päätettiin siirtyä standardisuorien valmistuksessa jatkuvan laimentamisen malliin, jossa standardit laimennetaan samalla pipetillä, samalla tilavuudella etenevästi edellisestä standardista laimentaen. Tätä varten haettiin sopivaa laimennusta. Standardien valmistuksessa todettiin toimivan 1:2 laimennus. Käytetyllä menetelmällä standardisuoran hajonta pieneni. Hajontaa esiintyi silti, joten rinnakkaisten määrä nostettiin kahdeksaan sen vaikutuksen estämiseksi.

7.5 Leimalaimennus

Leimavasta-aineen pitoisuutta titrattiin useita kertoja. Leiman valmistajan arvio sopivasta leimavasta-aineen laimennuksesta oli 1:4000–1:10 000, jota pidettiin lähtökohtana mittauksissa. Kuitenkaan laimeinkaan standardi ei antanut absobanssiksi alle 2,0. Lisäksi jo ennen reaktion pysäyttämistä substraatin väri vihersi. TMB:tä substraattina käyttävien menetelmien kehitysoppaat kertovat tämän johtuvan liian väkevästä leimavasta-aineesta.

Kaivoihin sidotun vasta-aineen lisäksi leimavasta-aineen määrää titrattiin useissa mittauksissa. Laimennuksia testattiin lähtien 1:20 000:sta aina 1:1000 000:aan asti, kun leimoja inkuboitettiin kaksi tuntia huoneenlämmössä. Jopa laimennuksella 1:1000 000 saavutettiin luettavia signaaleja, muttei lineaarisuuden parantumista. (Kuva 7.)

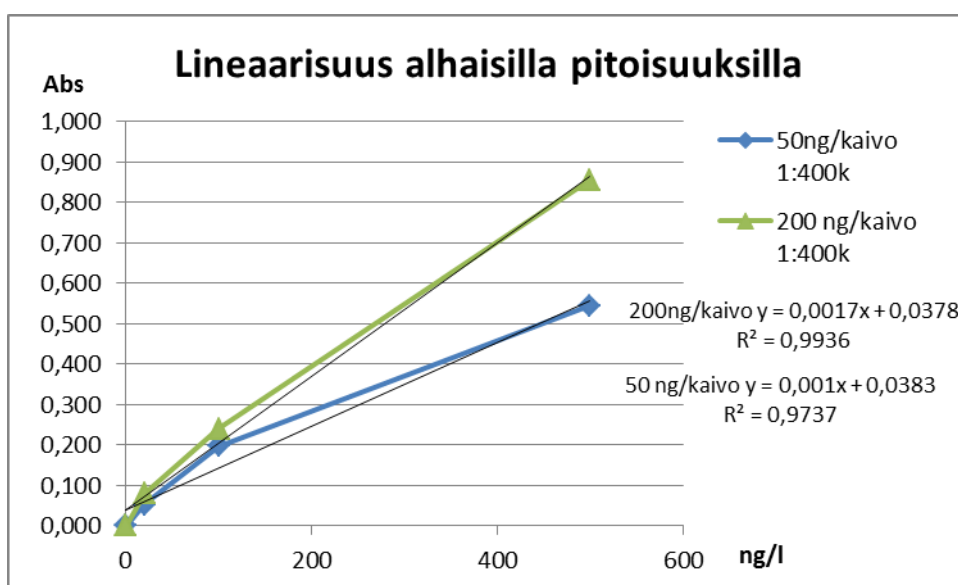


KUVA 7 Kaivon vasta-aineen ja leiman määrään vaikutus

Vasta-aineiden todettiin olevan riittävän toimivia sensorin kehitykseen. Menetelmän lineaarisuuden optimointia jatkettiin muiden tekijöiden osalta, kun 1:100 000 laimennuksen todettiin soveltuvan leimavasta-aineelle.

7.6 Lineaarisuuden parantaminen

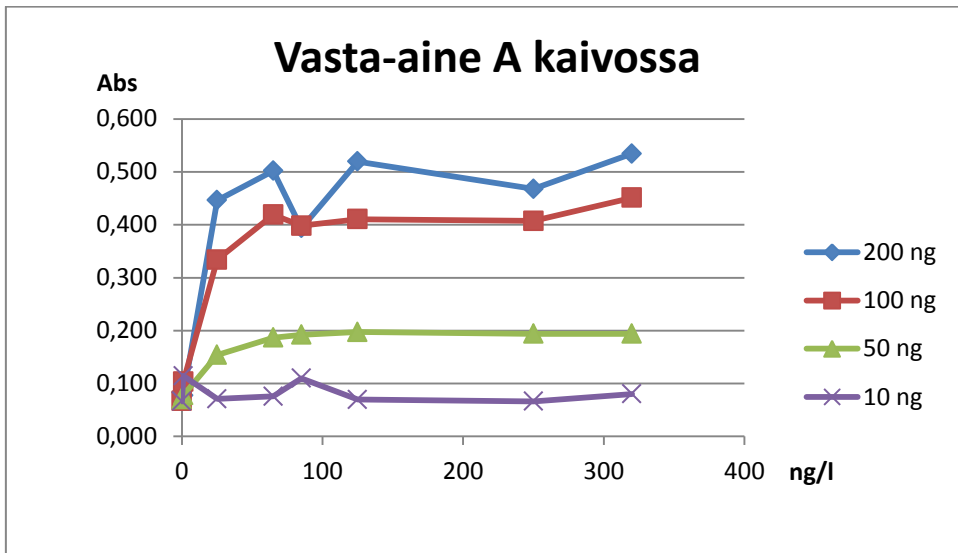
Alustavasti menetelmän lineaarisuusalue vaikutti olevan hyvin pienellä välillä, 0–500 ng/l (kuva 8). Tästä suuremmilla pitoisuuksilla oletettiin olevan hyvin loivan lineaarisuuden alue. Lineaarisuuksien vaihtumisalue vaikutti mittausten perusteella olevan kliinisellä alueella, mutta jälkimmäistä lineaarisuutta ei voitu käyttää hyväksi sen loivuuden takia.



KUVA 8 Vasteen lineaarisuus alhaisilla pitoisuuksilla

Todettiin, että käytettävissä oleva lineaarisuusalue jää alhaisille pitoisuuksille. Näin ollen lineaarisuusalueesta ei olisi hyötyä kliinisissä testeissä. Vasta-aineiden toimivuudesta menetelmä kuitenkin kertoo.

Menetelmää testattiin vielä toisella vasta-aineparilla testailemalla vasta-aine A:n pitoisuuksia kaivossa. Leimavasta-aine B laimennettiin 1:100 000, jotta tuloksia voitaisiin verrata aiempiin. Mittauksista saatiin parhaimmillaan absorbanssin 0,5 (kuva 9). Vaste jää neljännekseen siitä, mitä vasta-aineet antavat toisinpäin.

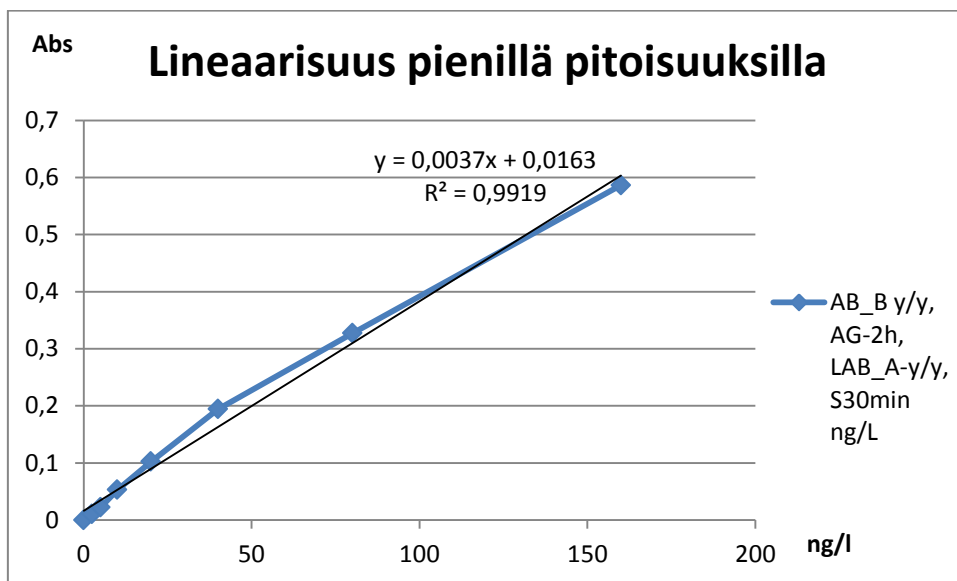


KUVA 9 Vasta-aine A määrän vaikutus kaivossa

Koska vasta-aineiden vaihtamisella ei saavutettu selkeää lineaarisuusalueen parantumista ja koska vaste oli selkeästi huonompi, todettiin olevan parempi käyttää vasta-ainetta B kaivossa ja A:ta leimana.

Eri inkubaatioaikoja kokeiltiin muuttaa, lukuun ottamatta blokkausta ja substraatin inkubaatio-aikaa. Minkään ei kuitenkaan havaittu parantavan lineaarisuutta suurilla pitoisuuksilla, joten päätettiin jatkaa tutkimuksia pienten pitoisuuksien lineaarisuusalueella.

Standardit valmistettiin aiemmin hyväksi havaitulla 1:2-menetelmällä suuren pitoisuuden alueella, josta ne laimennettiin edelleen pienelle pitoisuusalueelle 1:500 laimennuksella. Inkubaatioaikoja pyrittiin optimoimaan kokeilemalla. Substraattia jouduttiin inkuboimaan 30 minuuttia vasteen kasvattamiseksi. Paras lineaarisuus saatiin inkuboimalla näytettä yhden tunnin ja leimaa kahden tunnin ajan (kuva 10).



KUVA 10 Menetelmän lineaarisuus

7.7 Näytteen käsittely

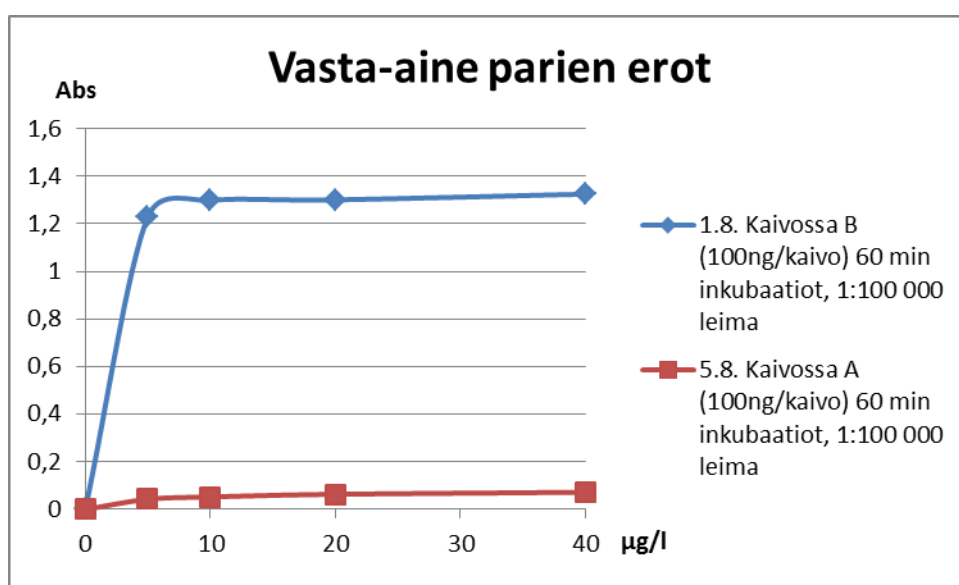
Plasmanäytteeseen lisättiin 50 µl 0,1 M sitraattia hyytymisen estämiseksi. Plasmaa ravisteltiin 10 minuuttia, saostumat sentrifugoitiin pohjaan ja supernatantti siirrettiin eppendorf-putkeen.

Plasmanäytteet mitattiin standardin lisäysmenetelmällä. Tulokset eivät kuitenkaan vastanneet odotuksia. Otannan vähäisen määrän takia ei voitu yksiselitteisesti osoittaa mistä tulosten virheellisyys johtuu. Virhe voi johtua matriisivaikutuksesta, kliinisen alueen hajonnan vaikutuksesta, plasman käsittelymenetelmästä tai pipetoinnista.

Seerumin matriisivaikutus jää tuleviin tutkimuksiin. Sitä olisi hyvä testata jo toimivalla menetelmällä määritetyllä näytteellä. Erityisesti sähkökemiallisissa mittauksissa näytematriisi tulee hyvin todennäköisesti vaikuttamaan tuloksiin. Näytteet saatiin anonyymeinä Johanna Veijolan laboratorista.

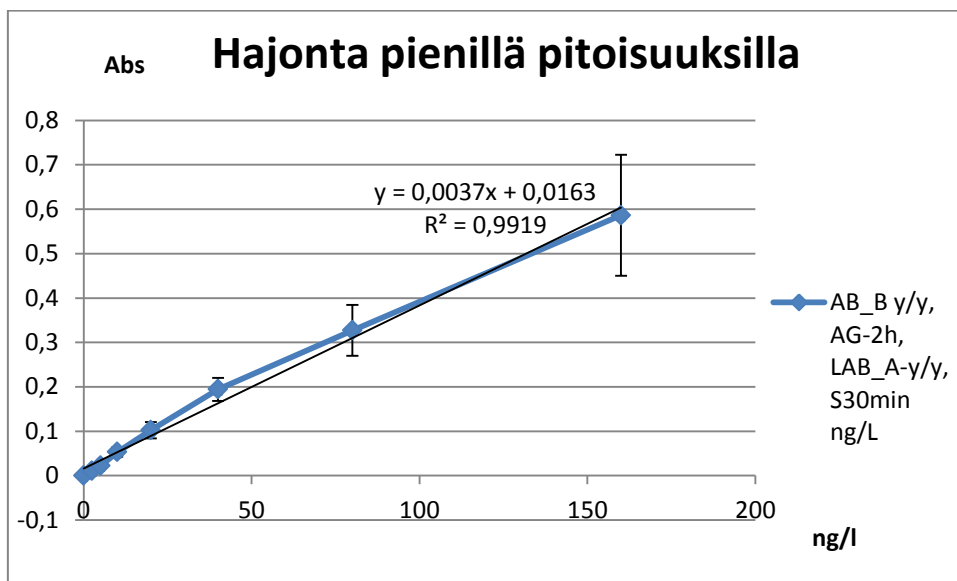
8 TULOKSET

Tutkimuksen tuloksena todettiin vasta-aineen B toimivan paremmin kaivoon sidottuna ja vasta-aineen A leimattuna. Tällä parilla vasta-aineita ja näytettä tarvitaan menetelmään vähemmän. Lisäksi lineaarisuuden laadussa ei ollut merkittäväällä kliinisellä alueella yksiselitteisesti eroa, kun vasta-aine A on kaivoon sidottuna ja B leimana. (Kuva 11) Molemmilla vasta-ainepareilla tapahtuu sama ilmiö, jossa signaali on matalilla pitoisuuksilla nopeasti nouseva, mutta korkeilla pitoisuuksilla signaali ei juuri muutu pitoisuuden kasvaessa. Lisäksi vasta-aineparilla A kaivossa–B leimana signaali on heikko matalilla pitoisuuksilla.



KUVA 11 Vasta-aineparien vertailu, 10–320 µg ei juuri muutosta signaalissa

Vasta-aine B saadaan lineaariseksi ja herkäksi hyvin pienillä pitoisuuksilla jatkamalla inkubaatio-aikaa. Lineaarinen alue vaikuttaisi olevan sidonnainen paitsi näytteen määrään, myös sen inkubaatioaikaan. Parhaan lineaarisuuden saavuttamiseksi näytteen määrä tulee pitää pienenä, jolloin näytettä tulee laimentaa standardien mukaisesti. Inkubaatioaika tulee tulosten perusteella olla tunti tai mahdollisesti vähemmän, mikäli näin havaitaan tulevilla mittauksissa. Hajonnan vaikutusta pyrittiin eliminoimaan ottamalla kustakin standardista ensin kolme, sitten kahdeksan rinnakkaista määrittystä. Tämä on erityisen tärkeää loivalla lineaarisuusalueella, jossa absorbanssin hajonta on suurta. (Kuva 12)



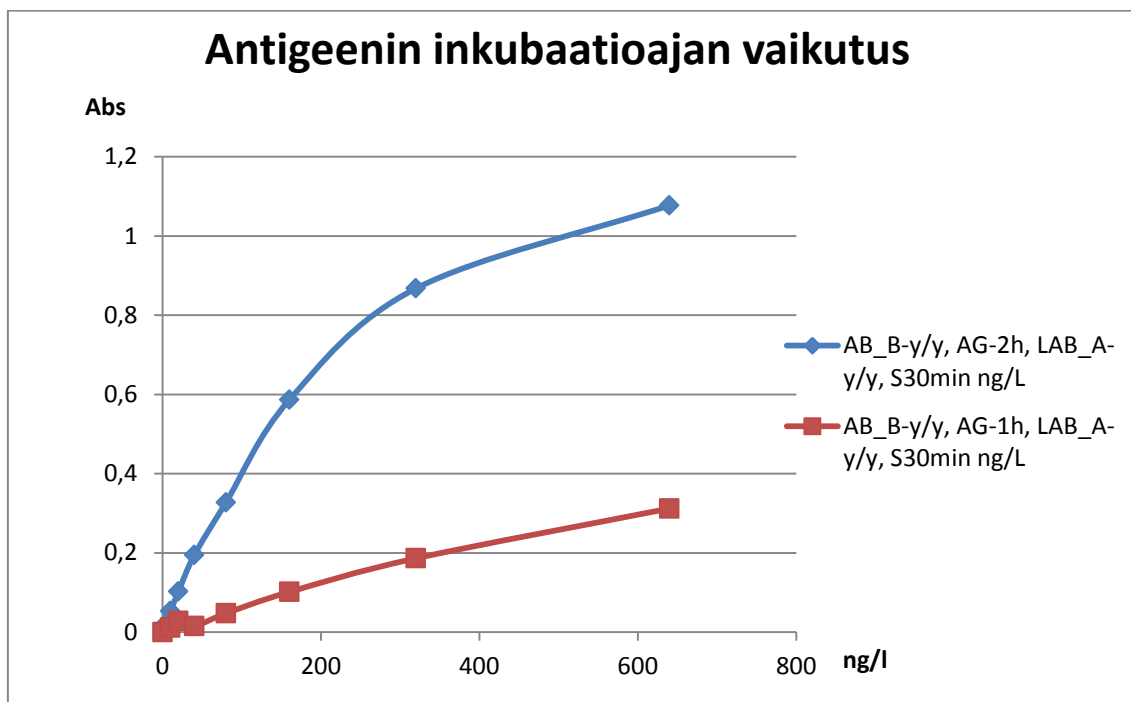
KUVA 12 Hajonta pienillä pitoisuuksilla, kaivossa B ja leimana A

On todennäköistä, että ainakin toisen vasta-aineen ja näytteen välillä on hyvin vahva affiniteetti. Alustavien arvioiden mukaan kyse olisi antigeenin ja vasta-aineen B välisestä vuorovaikutuksesta. Arvio perustuu havaintoihin näytteen inkubaatioajan vaikutuksesta lineaarisuuteen. Leimavastaa-aineen määrä tai inkubaatioaika eivät vaikuta yhtä paljon lineaarisuuteen.

Vasta-aine B tuntuu kaappaavan todella helposti antigeenin, kunnes reaktio saavuttaa tasapainon todella alhaisilla pitoisuuksilla. Kun tasapaino on saavutettu, antigeenin määrän lisääminen nostaa sitoutumisen määrää ja siten lopullista vastetta vain vähän. Oletettavasti tästä aiheutuu havaittu lineaarisuuden heikentyminen.

Affiniteetin vaikutusta voitaisiin menetelmän kehityksessä pyrkiä vähentämään valmistamalla huonommin leimautuneita vasta-aineita. Inkuboimalla konjugaatiossa vähemmän leimaentsyymiä suhteessa vasta-aineeseen osa vasta-ainesta jää ilman leimaa ja syntyy kilpailua sitoutumispaikoista.

Inkubaatioajan vaikutusten vuoksi lineaarisuusalueen arviointi on vaikeaa, mutta optimoiduilla inkubaatioajoilla saavutetaan hyväksyttävä signaali lineaarisuusalueella 0–640 ng/l (kuva 13).



KUVA 13 Antigeenin inkubaatioajan vaikutus

Leiman odotettua parempi tehokkuus ei aiheuttanut mittausongelmia, kun leimavasta-aineena ja kaivoihin sidotun vasta-aineen määrää laimennettiin tarpeeksi paljon. Laimeammista määristä saadaan myös säästöä reagenssikuluissa. Leiman toimivuus jopa 1:1000 000 laimennuksissa antavat positiivista odotuksia sensorin kehittämiseen.

Kehitystä tehtäessä eliminoitiin pipetoinnin vaikutus siirtymällä lasketuista pitoisuuksista eritavalla eteneviin laimennossarjoihin. Laskettaessa standardiliuksesta valmistetun näytteen palautumisesta laskennalliseen arvoon, oli haastavaa arvioida aiheutuuko virhe erilaisesta pipetoinnista, hajonnasta vai standardisuoran huonosta laadusta. Hyvin laimeilla pitoisuuksilla saatiin tässä vaiheessa kuitenkin hyväksyttäviä tuloksia näytteen palautumisesta laskennalliseen pitoisuuteen.

Näytematriisin vaikutuksen arviointia tulee jatkaa tulevaisuudessa. Alustavasti voidaan kuitenkin arvioida, että alhaisilla pitoisuuksilla matriisin vaikutus on pientä, sillä näytettä tulee laimentaa esimerkiksi 1:500, jotta saavutettaisiin sopiva pitoisuus. Laimentamattoman näytteen matriisivaikutusta oli haastavaa arvioida saatavilla olevien plasma- ja seeruminäytteiden pienen määrän takia. Myös tunnetun pitoisuuden potilasnäytteen puuttuminen vaikeutti menetelmän toimivuuden arviointia. Jatkokehityksessä näytematriisin vaikutuksen tutkiminen tunnetulla näytteellä on suositeltavaa. Tämä antaa viitteitä myös sensorin kehitykseen näytematriisin vaikutuksesta.

Opinnäytetyössä kehitetty ELISA-menetelmä toimii pohjana vasta-ainesensorin valmistamiselle. Koska toimintaperiaatteet ovat molemmissa samat, voidaan ELISA-menetelmän toimivuus rinnastaa sensorin toimivuuteen. Samalla saadaan verrattain halpa ja turvallinen menetelmä immunosensorin toimivuuden vertailemista varten. Sekä ELISA että kehitetty sensori käyttävät samoja vasta-aineita ja leimaentsyymejä näytteen pitoisuuden määrittämiseksi. Optimoitu ELISA-menetelmä, jota työssä käytettiin, on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1 Optimoitu ELISA-menetelmä

Vaihe	Lisäys	Inkubaatioaika
Päällystys	Vasta-aine B natriumkarbonaattipuskurissa (pH 9,2) (100µl)	Yön yli jääkaapissa
Blokkaus	3 % BSA-PBST-puskurissa (pH 7,4) (200µl)	Kaksi tuntia huoneenlämmössä tai yön yli jääkaapissa
Näytteen lisäys	Antigeeni PBST-puskurissa (pH 7,4), 0–640 ng/l, vähintään neljä rinnakkaista (100µl)	Yksi tunti huoneenlämmössä, tai vähemmän.
Leimavasta-aineen lisäys	Leimattu vasta-aine A, PBST-puskurissa (pH 7,4) (100µl)	Kaksi tuntia huoneenlämmössä
Substraatti	TMB 1:10 natriumsitraattipuskurissa (pH 6,0) (100µl)	15–30 minuuttia
Lopetuspuskuri	2 M rikkihappo (100µl)	Reaktion pysäytys, luku enintään neljän tunnin sisään

9 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda vertailumenetelmä ja leimattuja vasta-aineita elektrokemiallisen vasta-ainesensorin kehittämiseksi. Sensoreiden kehitystä varten menetelmän tuli kertoa jotain vasta-aineiden toimivuudesta toistensa suhteen, leimautumisen onnistumisesta, sekä vasteen voimakkuudesta. Valmistettuja leimavasta-aineita käytettiin sensorien valmistuksessa. Vaikka ELISA-menetelmän kaivossa tapahtuvan värireaktion siirtäminen painetulle elektroniikalle sähkökemialliseksi mittaukseksi on haastava kehitystyö, entsyymien toiminta ja sitoutuminen vasta-aineeseen on molemmissa menetelmissä yhtä tärkeää.

Menetelmän suuri herkkyys antaa hyviä toiveita sensorin kehitykseen. Siirryttäessä ELISA -testistä sensorille herkkyys yleensä huononee. Lopullinen sensori siis toimii todennäköisesti tarvittavalla herkkyydellä tutkituilla vasta-aineilla. Myös sensorin kehitystä koskevat alustavat tulokset ovat positiiviset. Alustavissa ELISAn ja sensorimateriaalin hybriditesteissä vasta-aine B saadaan sitoutumaan hyvin sensorille ja epäspesifistä vastetta ei ole. Epäspesifinen vaste aiheuttaa yleensä ongelmia vasta-ainesensorien kehityksessä, joten näinkin varhaisessa vaiheessa sen poissaolo on hyvin positiivista lopullisen sensorin toimivuuden kannalta.

Sensoria kehittäväällä yrityksellä on kuitenkin ollut ongelmia toistaa ELISA-testeissä mitattuja erinomaisia signaaleja. Heidän on pitänyt käyttää paljon väkevämpiä vasta-ainelaimennuksia, kuin tässä kehitetyssä menetelmässä käytettiin. Todennäköisiä syitä tuloksiin ovat substraatin erot heidän käyttäessään kaupallista substraattiliuosta, menetelmässä käytetyn kiinteästä liuotetun sijaan tai leimavasta-aineen jäätyminen kuljetuksessa. Myös lopullisen tilavuuden ero vaikuttaa tuloksiin. Muita syitä tuloksiin voivat olla kaivomateriaalin erot tai muut vähäisemmät erot yrityksen käyttäessä omaa vakiintunutta menetelmäpohjaansa.

Saadut tulokset riittävät sensorin kehitykseen, joten menetelmän kehitystä ei tarvitse toistaiseksi jatkaa. Jos ELISA-testiä haluttaisiin kehittää edelleen, olisi hyvä tutkia paremmin näytematriisin vaikutusta testissä. Lisäksi on suositeltavaa kehittää nopea leimaentsyymien aktiivisuuden mittaamis menetelmä. Leimattujen vasta-aineiden säilytystavan vaikutusta aktiivisuuteen mittaamalla glyserolin, šokkijäädätyksen sekä pakkasäilytyksen vaikutusta aktiivisuuteen voitaisiin arvioida, sillä käytetty jääkaappisäilytys on hyvä vain lyhyillä aikaväleillä.

LÄHTEET

1. ELISA technical guide and protocols. 2010. Thermo Fisher Scientific. Saatavilla: <http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf>. Hakupäivä: 25.6.2013.
2. Roitt, Ivan M. – Brostoff Jonathan–Male David K.1986. Immunology. London: Gower Medical Publishing Ltd.
3. Technical Guide for ELISA. 2013. KPL. Saatavilla: <http://www.kpl.com/docs/techdocs/KPL%20ELISA%20Technical%20Guide.pdf>. Hakupäivä: 19.8.2013.
4. Sandwich ELISA. abcam. Saatavilla: http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Sandwich_ELISA.pdf 22.11.2013.
5. File:Immunoglobulin basic unit.svg. Wikimedia Commons, vapaasti käytettävissä. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Immunoglobulin_basic_unit.svg. Hakupäivä 27.11.2013.
6. Delves P. J. – Martin S. J. – Burton D – Roitt I. M. 2011. Roitt's Essential Immunology. 12. painos. Chichester: Wiley-Blackwell.
7. Rokni MB – Aryaeipour M – Koosha S – Rahimi MT 2010. Evaluation of the Stability of Coated Plates with Antigen at Different Temperatures and Times by ELISA Test to Diagnose Fasciolosis. Iranian J Parasitol (5) 1/ 2010, s. 41 –46.
8. Engvall Eva – Perlmann Peter 1971. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. JOURNAL OF IMMUNOLOGY (109) 1972, s. 129–135.
9. Volpea G. – Compagnoneb D. – Draiscia R. – Palleschi G. 1998.3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. The Analyst. (123) 1998, s. 1303–1307.
10. Gao, Lizeng – Wu Jiamin – Gao Di 2011. Enzyme-Controlled Self-Assembly and Transformation of Nanostructures in a Tetramethylbenzidine/Horseradish Peroxidase/H2O2 System. ACSNano. 8/2011, s. 6736–6742.

11. Josephy P. David – Mason Ronald P.– Eling Thomas 1982. Cooxidation of the Clinical Reagent 3,5,3'5'-Tetramethylbenzidine by Prostaglandin Synthase. *Cancer Research* (42) 1982, s. 2567–2570.
12. Rye David B. – Saper Clifford B. – Wainer Bruce H 1983. Stabilization of the tetramethylbenzidine (TMB) reaction product: application for retrograde and anterograde tracing, and combination with immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (32) 11/1983, s. 1145–1153.
13. Josephy P David – Eling Thomas – Mason Ronald P. 1982. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *The journal of Biological Chemistry* (267) 7/1982, s. 3669–3675.
14. Nakane Paul K. – Kawaoi Akira. 1974. Peroxidase-labeled antibody, A new method of conjugation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (22) 12/1974, s. 1084–1091.
15. Perelaer Jolke – SmithPatrick J. – Mager Dario – Soltman Daniel – Volkman Steven K. – Subramanian Vivek – Korvink Jan G.– Schubert Ulrich S. 2010. Printed devices, interconnects, and contacts based on inorganic materials electronics: the challenges involved in printing. *Journal of Material Chemistry* (20) 2010, s. 8446–8453.
16. Määttä, Harri. 2013. Summer school 2013 -materiaali. Oulun seudun ammattikorkeakoulu, 20.–25.5.2013.
17. Kunnari Esa – Valkama Jani – Keskinen Marika – Mansikkamäki Pauliina 2009. Environmental evaluation of new technology: printed electronics case study. *Journal of Cleaner Production* (17) 9/2009, s. 791–799.
18. Ronkainen Niina J. – Halsall H. Brian – Heineman William R. 2010. Electrochemical biosensor. *Chemical society reviews* (39) 2010, s. 1747–1763.
19. Ricci Francesco – Adornetto Gianluca – Paleschi Giuseppe 2012. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta* (84) 2012, s. 74–83.
20. Presnova Galina V. – Rubtsova Maya Yu. – Egorov Alexey M. 2000 Oriented Immobilization of Antibodies onto the Gold Surfaces via Their Native Thiol Groups 16/2000 *Analytical Chemistry* (72) 2000, s. 3805–3811.

21. O'Brien Janese C. – Jones Vivian W. – Porter Marc D. 2000. Immunosensing Platforms Using Spontaneously Adsorbed Antibody Fragments on Gold. *Analytical Chemistry* (72) 4/2000, s. 703–710.
22. Ghindilis Andrey L. – Aranasov Plamen – Wilkins Michael – Wilkins Ebtisam 1998. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosensors & Bioelectronics* (13) 1/1998, s. 113–131.

For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.



Peroxidase Labeling Kit

Kit for the labeling of primary amino groups of biomolecules with activated peroxidase (POD) from horse radish

Cat. No. 11 829 696 001

Kit for 5 labeling reactions

Version 05

Content version: December 2005

Store at +2 to +8° C

Number of Reactions

8 mg activated peroxidase for labeling of approx. 6 mg protein in 5 reactions

Kit contents

Bottle	Kit contents	Amount	Color code
1	Peroxidase (activated) (POD), stabilized lyophilizate	8 mg	white cap
2	1 M Sodium Carbonate/hydrogencarbonate-buffer, pH 9.4	100 ml	blue cap
3	Sodium Borohydride	6 tablets	white cap
4	2 M Triethanolamine Buffer, pH 8.0	0.5 ml	violet cap
5	1 M Glycine Solution, pH 7.0	0.5 ml after reconstitution	yellow cap
6	Dialysis Buffer, 20 × conc. pH 6.5	2 × 100 ml	green cap
7	Stabilizing Agent with BSA and Kathon CG	3 ml	black cap

Advantages of the kit

- **fast** (the whole labeling procedure can be performed in one day)
- **easy** (only 5 simple working steps)
- **complete** (all necessary buffers and reagents are supplied with the kit)

1. Application

The kit is designed for labeling water-soluble biomolecules with reactive and accessible primary amino groups (e. g. peptides or proteins) with peroxidase for use in analytical methods.

It is particularly suitable for the coupling of antibodies with peroxidase, as the resulting conjugate is optimal for use in immunochemical detection systems like ELISA, immunohistochemistry and immunoblotting.

2. Kit characteristics

2.1 Capacity

The quantity of kit reagents is sufficient to conjugate approx. 6 mg immunoglobulin G (IgG). We recommend to aliquot the total quantity to be conjugated into 5 portions. Each portion will then provide 0.5 – 1 ml of conjugate from approx. 1.2 mg IgG, a quantity that can be diluted 1 : 4 000 – 1 : 10 000 for ELISA and blotting applications

2.2 Specification of the peroxidase

Specific activity: 800 U/mg protein at +25°C and pH 5.0 with ABTS* and H₂O₂ as substrates. Purity number: (A_{405nm}/A_{275nm}): 3.0 – 3.5. Isoenzyme distribution: > 90% homogeneous isoenzyme C.

2.3 Stability

The kit is stable until the expiration date printed on the label if stored at +2 to +8° C. For stability of working solutions see chapter 3.1.2.

3. Labeling procedure

The following procedure has been specially developed for the coupling of peroxidase to immunoglobulin G (IgG). It can however be as well used for IgG, Fab and F(ab')₂ fragments from rabbit, mouse, sheep and goat (see chapter 4. notes). The test procedure describes the conjugation using 1/5 of the total quantity of the kit reagents, sufficient to label 1.2 mg of IgG.

If other proteins are to be conjugated, we would recommend beginning with this procedure and checking the results with gel chromatography on HPLC with TSK 3000. If necessary, the procedure can then be adapted to individual requirements by altering the stoichiometry and the concentration of reactants used for incubation.

3.1 Preparation of solutions

All necessary reagents for performing the coupling are contained in the kit. Redist. water should always be used for reconstitution and dilution purposes.

Additional required materials: dialysis tube (boiled water treated)

3.1.1 Preparation of working solutions

To avoid confusion, we recommend to mark each solution with the appropriate number. The volumes listed are sufficient to label a portion of 1.2 mg IgG.

Solution 1: Peroxidase (activated)

Reconstitute the lyophilizate of bottle 1 in 0.5 ml redist. water (peroxidase concentration = 16 mg/ml)

Solution 2: Sodium Carbonate/-hydrogencarbonate Buffer (100 mM, pH 9.4)

Equilibrate bottle 2 to +15 to +25° C. Be sure that all buffer components are dissolved. Add 10 ml of bottle 2 to 90 ml redist. water; mix well.

Solution 3: Sodium Borohydride Solution (200 mM)

We recommend to wear gloves when working with sodium borohydride. Prepare the solution immediately prior to use and keep cold on ice. Add 1 tablet of bottle 3 to 130 ml cold, redist. water; mix well.

Solution 4: Triethanolamine Buffer (2 M, pH 8.0)

Bottle 4, ready-to-use. Equilibrate the bottle to +15 to +25° C. Be sure that all buffer components are dissolved.

Solution 5: Glycine Solution (1 M, pH 7.0)

Reconstitute the lyophilizate of bottle 5 in 0.5 ml redist. water (glycine concentration = 1 M)

Solution 6: Dialysis Buffer (1 × conc.)

Equilibrate bottle 6 to +15 to +25° C. Be sure that all buffer components are dissolved. Add 30 ml of bottle 6 to 570 ml redist. water; mix well.

Solution 7: Stabilizing Agent

Bottle 7 is ready-to-use. Equilibrate the bottle to +15 to +25° C.

- 3.1.2 Stability of solutions**
- Solution 1 is stable for 3 months at +2 to +8° C. The solution can be aliquoted, shock-frozen at -60° C or below and then stored at -15 to -25° C; however, a loss of activity of 10 - 20% may be observed.
 - Solutions 2,5 and 6 are stable for 1 week at +2 to +8° C, respectively for 6 months at -15 to -25° C, if stored frozen in aliquots.
 - Solution 3 should always be prepared immediately before use.
 - Solution 4 and 7 are stable at +2 to +8° C until the expiry date stated on the kit.

3.2 Preparation of the immunoglobulin solution

The IgG concentration of the antibody solution should be approx. 4 mg/ml (3.8 - 4.2 mg/ml). This concentration is critical for the coupling and should hence be checked photometrically before every coupling and adjusted if necessary: 1 mg/ml = 1.40 at $A_{280\text{ nm}}$ and 1 cm path length. 0.3 ml of this solution are required for each labeling reaction.
Note: Do not use preservatives like sodium azide and stabilizers like albumin or detergents.

3.2.1 Lyophilized immunoglobulin, salt-free Weigh 1.6 mg into a suitable vessel and dissolve in 0.4 ml solution 2. Check the concentration and pH and adjust if necessary.

3.2.2 Immunoglobulin in buffer If the immunoglobulin is dissolved in phosphate buffered saline (PBS) without additional proteins or preservatives: adjust the pH to 9.8 with 1 M sodium carbonate buffer (bottle 2). If necessary dilute with solution 2 to obtain an IgG concentration of 4 mg/ml.

If the immunoglobulin is dissolved in a buffer with organic salts: Dialyse immunoglobulin with solution 2 and adjust the concentration to 4 mg/ml with solution 2.

3.2.3 Stability of IgG solution The solutions should always be prepared immediately for use.

3.3 Labeling protocol

3.3.1 Conjugation Pipette exactly 0.3 ml antibody solution into a suitable 1 - 2 ml vial and add 0.1 ml solution 1 (peroxidase); mix well. Reaction ratio = 1 M IgG : 8 M POD. Incubate for 2 h at 25°C in a water bath or for 16 h overnight at +2 to +8° C.

3.3.2 Stopping the reaction Add 40 µl solution 4 (triethanolamine) to the incubation solution, mix, pipette 50 µl solution 3 (sodium borohydride) to the mixture, mix again and incubate for 30 min at 2-8°C. Add a further 25 µl of solution 4 and incubate again for 2 h at +2 to +8° C.

3.3.3 Stabilizing the conjugate Pipette 10 µl of solution 5 (glycine solution) into the incubation solution and mix well.

3.3.4 Transfer of conjugate to storage buffer Place the incubation solution in a dialysis tube and allow to dialyse extensively (e.g. overnight) with 3 changes of 200 ml solution 6 (1 x dialysis buffer).

3.3.5 Stabilizing the product for storage Place the conjugate from the dialysis tube in a suitable vial, determine the volume and add the same volume of solution 7 to the conjugate; mix gently. The conjugate is stable for at least 2 months at +2 to +8° C. For longer storage the conjugate can be aliquoted, shock-frozen in liquid nitrogen and then stored at -60° C or below.

4. Notes

4.1 Sodium azide

Sodium azide should never be added as a preservative, because it inhibits the peroxidase activity.

4.2 Purification and fractionation of the conjugate

During the reaction more than 75% of the IgG is conjugated and only 20% of the immunoglobulin remains uncoupled (see Fig.3). The conjugate needs therefore not be purified for normal immunoassay procedures. Residual amounts of free peroxidase after conjugation do normally not interfere with such procedures.

If the conjugate is to be used for special applications like highly sensitive ELISA procedures or measurements in problematic matrices, it can be purified further subsequent to dialysis and prior to stabilization with solution 7 by gel permeation chromatography (e.g. on Sephacryl S300 from Pharmacia). The fractions can then be tested for their suitability for the planned application.

4.3 Re-buffering of antibody and conjugate

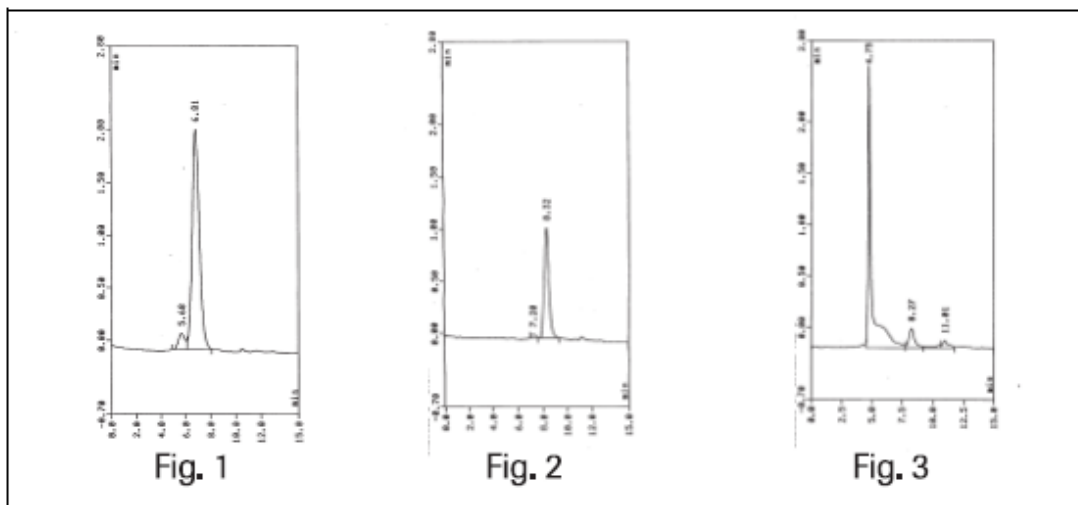
The antibody can be re-buffered into solution 2 either using Sephadex G25 or PD-columns (Pharmacia) or other suitable material. The conjugate can be re-buffered subsequently to step 3.3.3 by using column chromatography instead of the described dialysis (step 3.3.4)

4.4 Reaction ratio IgG to POD

The conjugation of IgG and Fab-fragments is optimized for the above reaction ratio. Other stoichiometric proportions can be considered for special applications, but it must be stressed that the protein concentration indicated in the test procedure should be held constant and that a molecular sieve fractionation should be carried out in order to separate out residual amounts of IgG or POD that may be present.

4.5 Immunoglobulin

The procedure is optimized for the coupling of immunoglobulin from rabbit; IgG from sheep and goat can likewise be conjugated. If Fab or F(ab)₂ fragments of these species or immunoglobulin G from mouse are used, a reaction time of 3 h at +25° C is recommended.



4.6 Reaction temperature and reaction time

The procedure is developed for a reaction temperature of +25° C. At +25° C the reaction time should be 2 h but it can be extended to 3 h without influencing the results. Alternatively, the reaction can be carried out at +2 to +8° C with a reaction time of 18 h up to 24 h.

4.7 Influence of pH

During the conjugation reaction (step 3.3.1) the pH should never drop below 9.8 and must be kept constant to ensure a proper coupling. The maximally allowable pH is 10.8.

4.8 Influence of NaCl and potassium phosphate concentration

NaCl concentrations of 50 – 400 mM and simultaneous phosphate concentrations of 10 – 20 mM have only a marginal effect on the reaction. If the potassium phosphate concentration is in the range of 30 – 100 mM, the NaCl concentration should not exceed 150 mM.

4.9 HPLC chromatography

If high reproducibility is required, the reaction should be carried out under HPLC-TSK 3000 control. Figures 1 – 3 show the TSK 3000 profiles of the starting material (Fig. 1: immunoglobulin G from rabbit), of POD (Fig. 2) and the final product (Fig. 3). During reaction, the IgG is completely bound in the conjugate, as can be seen in the TSK 3000 separation profile of Fig 3.

Changes to previous version

Regulatory Disclaimer updated.

Trademarks

ABTS is a trademark of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owner.

Regulatory Disclaimer

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

* available from Roche Applied Science

Contact and Support

To ask questions, solve problems, suggest enhancements or report new applications, please visit our **Online Technical Support Site** at:

www.roche-applied-science.com/support

To call, write, fax, or email us, visit the Roche Applied Science home page, www.roche-applied-science.com, and select your home country. Country-specific contact information will be displayed. Use the Product Search function to find Instructions for Use and Material Safety Data Sheets.



Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany

A	0,292	0,264	1,145	1,075	1,267	1,149	1,149	1,092	1,025	1,047	0,220	0,573
B	0,523	0,456	1,082	1,114	0,922	0,970	1,019	1,016	0,941	1,018	0,460	0,480
C	1,016	1,030	1,120	1,019	1,095	1,117	1,115	1,362	1,251	1,297	0,728	1,128
D	1,359	1,373	1,519	1,406	1,576	1,572	1,576	1,508	1,473	1,485	1,647	1,446
E	1,453	1,482	1,468	1,946	1,949	1,915	1,925	1,931	1,999	2,105	2,097	0,042
F	1,447	1,258	1,918	1,926	2,032	2,005	1,999	2,087	2,070	2,290	2,085	0,044
G	1,406	1,403	1,934	1,970	2,036	2,031	2,013	2,103	2,039	2,111	2,363	0,042
H	1,516	1,412	1,894	1,870	1,957	1,915	1,796	1,861	1,966	2,038	2,234	0,042

4.7. 500 ng/kaivo CAB-B LAB-A määrä vaihtelee

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,094	0,085	0,089	0,065	0,086	0,064	0,043	0,044	0,044	0,044	0,045	0,052
B	2,825	3,334	3,244	2,805	3,050	3,106	0,046	0,046	0,046	0,049	0,046	0,048
C	2,908	3,584	3,584	3,446	3,341	3,446	0,048	0,051	0,057	0,055	0,057	0,055
D	3,083	4,109	4,109	3,842	3,842	3,967	0,046	0,053	0,056	0,058	0,058	0,062
E	2,956	3,433	3,361	3,271	3,271	3,299	0,045	0,042	0,044	0,046	0,043	0,045
F	3,476	4,095	4,095	3,954	4,095	4,095	0,043	0,043	0,044	0,045	0,046	0,049
G	0,091	0,154	0,131	3,841	3,665	3,841	0,043	0,043	0,044	0,044	0,045	0,047
H	0,111	0,237	0,157	0,130	0,085	0,203	0,045	0,046	0,047	0,048	0,050	0,051

5.7. 200ng/kaivo CAB-B, 1:60k leima LAB-A

	1	2	3
A 0	0,044	0,045	0,047
B 20 pg	0,324	0,349	0,368

C 100 pg	0,986	0,997	1,102
D 500 pg	0,053	0,061	0,064
E 1ug	1,848	1,924	2,267
F 125 ug	1,900	1,917	2,216
G 250 ug	1,948	1,920	2,214
H 320 ug	2,013	1,910	1,992

5.7. 200ng/kaivo CAB-B, 1:60k leima LAB-A, 1h myöhemmin			
	1	2	3
A	0,045	0,046	0,048
B	0,328	0,350	0,373
C	1,000	0,998	1,100
D	0,053	0,060	0,065
E	1,804	1,918	2,226
F	1,916	1,908	2,163
G	1,935	1,870	2,133
H	1,944	1,851	1,914

5.7. LAB-A 1:125k, 1:100k, 1:80k (0; 0,02; 0,1; 0,5; 1; 125; 250 ja 320) 200 ng/kaivo CAB-B													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,055	0,055	0,052	0,055	0,090	0,089	0,067	0,066	0,064	0	0	0	
B	0,145	0,151	0,146	0,312	0,217	0,456	0,202	0,306	0,204	0	0	0	
C	0,424	0,469	0,487	0,787	0,720	1,044	0,696	0,771	1,198	0	0	0	
D	1,114	1,471	1,510	2,173	2,059	2,143	2,038	2,238	2,131	0	0	0	

E	1,642	1,932	1,825	2,791	2,673	2,870	2,881	2,995	2,724	0	0	0	
F	2,204	2,597	2,681	3,174	3,199	3,526	3,526	3,827	3,526	0	0	0	
G	2,317	2,492	2,663	3,140	3,140	3,162	3,211	3,362	3,162	0	0	0	
H	2,660	2,478	2,887	3,313	3,313	3,392	3,614	3,614	3,614	0	0	0	

15.7. Myöhemmin sama LAB-A 1:125k, 1:100k, 1:80k; 1:60k LAB-A (0; 0,02; 0,1; 0,5; 1; 125; 250 ja 320 µg/l AG) 200 AB B
ng/kaivo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,075	0,047	0,049	0,047	0,066	0,045	0,048	0,054	0,074	0,049	0,051	0,061
B	0,140	0,114	0,103	0,260	0,163	0,194	0,147	0,276	0,198	0,292	0,319	0,347
C	0,344	0,366	0,415	0,239	0,210	0,377	0,294	0,234	0,334	0,794	0,776	0,478
D	0,639	0,327	0,329	0,318	0,419	0,405	0,436	0,346	0,319	0,053	0,061	0,074
E	0,424	0,330	0,357	0,416	0,413	0,412	0,391	0,401	0,367	0,981	0,670	0,576
F	0,444	0,398	0,371	0,506	0,421	0,503	0,420	0,488	0,490	0,979	0,751	0,638
G	0,331	0,406	0,415	0,459	0,522	0,497	0,422	0,489	0,480	0,908	0,981	0,702
H	0,328	0,418	0,397	0,442	0,493	0,443	0,519	0,525	0,466	0,706	0,726	0,660

17.7. CAB-B 50ng/kaivo LAB-A 1:250k; 1:400k; 1:750k; 1:1G

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,043	0,042	0,088	0,049	0,044	0,044	0,051	0,046	0,045	0,045	0,048	0,042
B	0,149	0,128	0,079	0,106	0,099	0,089	0,072	0,071	0,078	0,060	0,065	0,051
C	0,378	0,324	0,356	0,233	0,242	0,254	0,155	0,148	0,152	0,124	0,118	0,085
D	0,913	0,875	0,915	0,578	0,590	0,601	0,356	0,343	0,354	0,263	0,257	0,172

E	1,159	1,137	1,151	0,757	0,749	0,787	0,448	0,447	0,429	0,324	0,294	0,223
F	1,413	1,449	1,405	0,954	0,937	0,975	0,540	0,571	0,571	0,394	0,399	0,303
G	1,438	1,431	1,409	0,974	0,952	0,994	0,568	0,587	0,566	0,387	0,417	0,301
H	1,570	1,461	1,469	1,026	0,998	0,987	0,595	0,584	0,558	0,412	0,443	0,340

17.7. CAB-B 200ng/kaivo LAB-A 1:250k; 1:400k; 1:750k; 1:1G												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,381	0,391	0,382	0,079	0,062	0,105	0,141	0,125	0,134	0,047	0,042	0,043
B	0,487	0,463	0,486	0,149	0,168	0,169	0,171	0,173	0,197	0,084	0,093	0,085
C	0,691	0,685	0,680	0,306	0,330	0,327	0,249	0,241	0,250	0,164	0,160	0,162
D	1,148	1,320	1,263	1,150	0,880	0,783	0,486	0,477	0,486	0,350	0,341	0,353
E	1,579	1,578	1,607	1,153	1,071	1,045	0,639	0,641	0,635	0,471	0,478	0,474
F	2,038	2,048	2,023	1,438	1,517	1,450	0,918	0,897	0,906	0,693	0,690	0,640
G	2,080	2,050	2,015	1,446	1,478	1,463	0,888	0,912	0,916	0,685	0,685	0,671
H	2,174	2,119	2,140	1,506	1,566	1,502	0,918	0,479	0,045	0,727	0,723	0,833

19.7. CAB-B 50 ng/kaivo LAB 1:100 000												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,040	0,045	0,042	0,044	0,044	0,047	0,044	0,045	0,045	0,047	0,052	0,049
B	0,283	0,309	0,266	0,281	0,314	0,295	0,464	0,514	0,471	0,533	0,484	0,460
C	0,492	0,524	0,468	0,465	0,384	0,493	0,548	0,491	0,661	0,513	0,486	0,442
D	0,552	0,546	0,533	0,517	0,602	0,593	0,529	0,517	0,760	0,564	0,585	0,498
E	0,682	0,710	0,683	0,704	0,650	0,693	0,583	0,647	0,715	0,647	0,594	0,565

F	0,735	0,724	0,769	0,769	0,751	0,720	0,720	0,710	0,729	0,765	0,632	0,643
G	0,719	0,784	0,765	0,833	0,842	0,818	0,767	0,696	0,815	0,758	0,735	0,267
H	0,643	0,683	0,719	0,774	0,781	0,856	0,866	0,689	0,725	0,695	0,705	0,838

22.7. CAB-B 50 ng/kaivo LAB 1:100 000

	7	8	9	10	11	12
A	0,050	0,052	0,053	0,053	0,055	0,053
B	0,100	0,106	0,099	0,228	0,261	0,152
C	0,165	0,132	0,171	0,212	0,243	0,189
D	0,212	0,186	0,171	0,226	0,257	0,182
E	0,297	0,275	0,263	0,265	0,280	0,201
F	0,259	0,334	0,310	0,427	0,308	0,186
G	0,347	0,450	0,430	0,501	0,442	0,205
H	0,519	0,527	0,581	0,631	0,595	0,256

23.7. CAB-B 50 ng/kaivo LAB 1:100 000

	1	2	3	4	5	6
A	0,047	0,044	0,043	0,042	0,047	0,045
B	0,273	0,238	0,280	0,243	0,386	0,392
C	0,357	0,360	0,478	0,402	0,375	0,320
D	0,414	0,425	0,427	0,490	0,541	0,581
E	0,563	0,524	0,628	0,583	0,596	0,666
F	0,746	0,512	0,614	0,650	0,580	0,731
G	0,793	0,622	0,681	0,680	0,601	0,480

H	0,639	0,641	0,778	0,801	0,894	0,765
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Sama muutama minuutti

	1	2	3	4	5	6
A	0,047	0,044	0,043	0,042	0,047	0,045
B	0,269	0,236	0,281	0,244	0,386	0,393
C	0,359	0,361	0,479	0,405	0,376	0,321
D	0,415	0,427	0,429	0,494	0,543	0,583
E	0,567	0,527	0,630	0,587	0,597	0,670
F	0,750	0,514	0,615	0,652	0,581	0,735
G	0,797	0,626	0,683	0,680	0,604	0,481
H	0,641	0,643	0,781	0,803	0,897	0,766

sama 30min

	1	2	3	4	5	6
A	0,048	0,044	0,043	0,042	0,048	0,045
B	0,268	0,236	0,281	0,245	0,388	0,393
C	0,362	0,364	0,481	0,407	0,379	0,322
D	0,418	0,430	0,428	0,498	0,553	0,587
E	0,567	0,532	0,634	0,592	0,607	0,677
F	0,749	0,519	0,614	0,653	0,586	0,735
G	0,794	0,627	0,684	0,691	0,599	0,480
H	0,639	0,649	0,786	0,802	0,902	0,769

Sama 1h

	1	2	3	4	5	6
A	0,049	0,045	0,044	0,043	0,048	0,046
B	0,271	0,238	0,283	0,249	0,395	0,396
C	0,370	0,372	0,487	0,411	0,384	0,323
D	0,423	0,433	0,430	0,503	0,573	0,596
E	0,574	0,537	0,638	0,597	0,631	0,684
F	0,755	0,529	0,615	0,657	0,599	0,743
G	0,801	0,630	0,686	0,676	0,601	0,484
H	0,645	0,657	0,792	0,809	0,909	0,776

24.7.2013 CAB-B 50 ng/kaivo LAB 1:100 000

	1	2	3	5	6
A	0,052	0,047	0,046	0,047	0,046
B	0,141	0,128	0,131	0,117	0,133
C	0,234	0,234	0,192	0,183	0,232
D	0,233	0,215	0,227	0,231	0,261
E	0,321	0,244	0,216	0,234	0,289
F	0,446	0,316	0,258	0,281	0,308
G	0,339	0,361	0,300	0,324	0,246
H	0,398	0,368	0,329	0,347	0,318

Vasta-aine A-leima A Pe 26.7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,089	0,096	0,063	0,063	0,064	0,074	0,064	0,063	0,083	0,052	0,076	0,071

B	0,409	0,452	0,478	0,307	0,378	0,317	0,147	0,158	0,157	0,060	0,059	0,094
C	0,394	0,476	0,533	0,386	0,406	0,430	0,210	0,199	0,173	0,063	0,071	0,065
D	0,459	0,508	0,539	0,400	0,455	0,402	0,188	0,193	0,179	0,072	0,082	0,073
E	0,511	0,511	0,536	0,413	0,431	0,388	0,204	0,197	0,191	0,064	0,077	0,068
F	0,517	0,543	0,543	0,453	0,463	0,437	0,178	0,227	0,177	0,064	0,103	0,074
G	0,356	0,421	0,404	0,374	0,397	0,424	0,176	0,189	0,212	0,102	0,122	0,106
H	0,054	0,123	0,055	0,144	0,095	0,071	0,057	0,064	0,113	0,094	0,118	0,131

30.7. Vasta-aine B (50-100-200ng/kaivo)-Leima A (1:100 000), 0,1,25,65,85,320,250,125

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,031	0,029	0,031	0,047	0,048	0,047	0,050	0,049	0,048	0,048	0,043	0,049
B	0,033	0,037	0,031	0,795	0,871	0,728	1,427	1,477	1,323	1,770	1,695	1,551
C	0,037	0,033	0,031	1,138	1,051	1,034	1,907	1,645	1,602	2,076	2,087	2,069
D	0,030	0,044	0,034	1,158	1,107	1,056	2,004	1,843	1,835	2,105	2,140	2,072
E	0,033	0,030	0,026	1,140	1,047	1,034	1,930	1,865	1,798	2,100	2,118	1,985
F	0,045	0,049	0,032	1,125	1,193	1,118	1,993	1,870	1,819	2,092	1,783	1,951
G	0,041	0,044	0,029	1,121	1,142	1,089	1,916	1,743	1,831	2,154	2,126	2,005
H	0,037	0,033	0,034	1,021	1,063	1,037	1,949	1,735	1,863	2,115	2,166	2,000

30.7. Vasta-aine B (50-100-200ng/kaivo)-Leima A (1:100 000) 0,2,3,6,4,5,7,1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,029	0,030	0,032	0,078	0,084	0,087	0,079	0,077	0,084	0,073	0,071	0,072
B	0,029	0,030	0,034	0,973	1,037	1,096	2,096	1,848	2,068	2,537	2,479	2,308
C	0,030	0,031	0,028	0,955	0,842	0,940	1,985	2,008	1,965	2,206	2,182	2,035

D	0,028	0,028	0,028	0,130	0,151	0,141	0,281	0,278	0,292	0,095	0,087	0,097
E	0,031	0,029	0,031	0,613	0,764	0,795	1,618	1,753	1,733	0,877	0,875	0,872
F	0,030	0,031	0,028	0,389	0,372	0,367	0,840	0,872	0,891	0,229	0,231	0,228
G	0,032	0,036	0,036	0,100	0,098	0,078	0,115	0,119	0,120	0,078	0,072	0,090
H	0,030	0,033	0,034	1,092	1,117	0,840	1,996	1,945	1,944	2,263	2,334	2,274

1.8. Vasta-aine B (100ng/kaivo) 30 min inkubaatiot, 1:100 000 leima, A ylös, Riveittäin: 0, 0, x, 320, 160, 80, 40,20 , 10, 5, 192

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,046	0,049	0,877	0,913	0,920	0,841	0,906	0,921	0,931	0,901	0,722	0,998
B	0,045	0,042	0,840	0,738	0,931	0,837	0,901	0,848	0,879	0,880	0,710	0,593
C	0,041	0,043	0,862	0,913	0,904	0,780	0,840	0,853	0,835	0,894	0,725	0,628
D	0,042	0,043	0,921	0,941	0,945	0,937	0,870	0,887	0,891	0,857	0,721	0,582
E	0,035	0,044	0,881	0,916	0,929	0,907	0,902	0,878	0,928	0,839	0,698	0,596
F	0,037	0,041	0,883	0,946	0,913	0,869	0,941	0,889	0,910	0,948	0,759	0,600
G	0,038	0,046	0,906	0,874	0,861	0,826	0,886	0,916	0,923	0,880	0,759	0,626
H	0,036	0,044	0,942	0,969	0,982	1,003	0,970	0,924	0,905	0,927	0,770	0,648

1.8. Vasta-aine B (100ng/kaivo) 60 min inkubaatiot, 1:100 000 leima A, H ylös, Riveittäin: 0, Plasma+0, Plasma+N, 320, 160, 80, 40,20 , 10, 5, 192/96

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,639	1,445	1,454	1,457	1,349	1,393	1,393	1,327	1,383	1,321	1,529
B	0,038	0,642	1,386	1,340	1,405	1,364	1,379	1,280	1,328	1,332	1,238	1,454
C	0,037	0,635	1,387	1,366	1,342	1,394	1,402	1,359	1,226	1,361	1,225	1,439
D	0,042	0,663	1,398	1,372	1,391	1,357	1,303	1,381	1,287	1,348	1,155	1,404
E	0,045	0,634	1,419	1,358	1,364	1,378	1,378	1,364	1,333	1,349	1,275	1,381

F	0,048	0,643	1,451	1,382	1,437	1,355	1,364	1,397	1,351	1,331	1,306	1,327
G	0,035	0,659	1,386	1,432	1,397	1,390	1,348	1,368	1,334	1,340	1,321	1,422
H	0,043	0,667	1,471	1,413	1,391	1,407	1,409	1,388	1,382	1,394	1,324	1,513

5.8. Vasta-aine A (100ng) kaivo, 60 min inkubaatiot, 1:100 000 leima B, Riveittäin: 0; 0,626; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320;
N

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,048	0,044	0,058	0,083	0,075	0,100	0,111	0,111	0,116	0,131	0,097
B	0,044	0,041	0,051	0,070	0,089	0,098	0,111	0,118	0,125	0,131	0,134	0,129
C	0,042	0,049	0,059	0,074	0,088	0,097	0,115	0,116	0,118	0,133	0,142	0,160
D	0,039	0,046	0,059	0,074	0,089	0,102	0,106	0,110	0,125	0,140	0,144	0,145
E	0,041	0,050	0,057	0,071	0,083	0,090	0,103	0,101	0,111	0,115	0,126	0,121
F	0,037	0,048	0,060	0,066	0,082	0,091	0,093	0,097	0,104	0,118	0,107	0,121
G	0,040	0,044	0,054	0,060	0,071	0,080	0,086	0,093	0,092	0,101	0,098	0,092
H	0,040	0,042	0,047	0,047	0,055	0,079	0,084	0,055	0,083	0,088	0,092	0,096

5.8. Vasta-aine A (100ng)kaivo, 30 min inkubaatiot, 1:100 000 leima B, Riveittäin: 0; 0,626; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320;
N

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,045	0,042	0,059	0,052	0,059	0,072	0,070	0,079	0,082	0,084	0,082	0,078
B	0,039	0,046	0,049	0,054	0,063	0,074	0,081	0,077	0,083	0,080	0,088	0,078
C	0,036	0,048	0,047	0,042	0,059	0,071	0,071	0,078	0,078	0,085	0,099	0,091
D	0,040	0,042	0,045	0,052	0,063	0,069	0,077	0,079	0,086	0,087	0,092	0,091
E	0,039	0,039	0,040	0,050	0,056	0,063	0,068	0,072	0,083	0,080	0,083	0,079
F	0,040	0,038	0,044	0,052	0,058	0,070	0,072	0,076	0,075	0,077	0,081	0,093

G	0,036	0,045	0,045	0,051	0,057	0,061	0,066	0,069	0,072	0,070	0,066	0,074
H	0,039	0,041	0,040	0,049	0,050	0,044	0,043	0,064	0,074	0,062	0,055	0,061

6.8. Vasta-aine B 100ng/kaivo, 1 h inkubaatiot, 1:100 000 leima A, 30min substraatti, 0, 2, 50, 130, 170, 250, 500, 640 (ng/l), N

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,045	0,046	0,047	0,053	0,062	0,095	0,141	0,144	0,050	0,053	0,060
B	0,040	0,052	0,043	0,046	0,053	0,065	0,091	0,142	0,142	0,051	0,051	0,057
C	0,045	0,044	0,044	0,050	0,050	0,050	0,086	0,120	0,133	0,048	0,058	0,057
D	0,043	0,044	0,051	0,054	0,052	0,055	0,082	0,112	0,133	0,051	0,067	0,062
E	0,045	0,042	0,045	0,050	0,048	0,053	0,080	0,121	0,145	0,049	0,050	0,048
F	0,052	0,046	0,044	0,048	0,050	0,054	0,074	0,140	0,136	0,053	0,047	0,048
G	0,039	0,046	0,047	0,057	0,054	0,062	0,083	0,136	0,126	0,051	0,046	0,049
H	0,049	0,050	0,062	0,063	0,052	0,067	0,077	0,142	0,124	0,054	0,060	0,057

7.8. Vasta-aine B 100ng/kaivo, 1 h "näyte", 2h leima (A-1:100 000), 15 min substraatti, 0, N+P 1:500, N/P/B, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, N, N

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,048	0,048	0,218	0,332	0,226	0,098	0,099	0,062	0,082	0,062	0,723	0,071
B	0,052	0,040	0,246	0,333	0,213	0,136	0,088	0,061	0,076	0,061	0,054	0,070
C	0,054	0,039	0,159	0,389	0,213	0,138	0,092	0,064	0,072	0,057	0,055	0,073
D	0,048	0,066	0,178	0,292	0,208	0,130	0,090	0,065	0,071	0,066	0,061	0,081
E	0,044	0,051	0,390	0,397	0,214	0,179	0,089	0,066	0,072	0,051	0,051	0,073
F	0,047	0,045	0,411	0,381	0,225	0,164	0,115	0,061	0,074	0,059	0,059	0,086
G	0,046	0,045	0,046	0,378	0,277	0,187	0,092	0,062	0,082	0,056	0,055	0,159
H	0,045	0,064	0,052	0,380	0,300	0,164	0,100	0,068	0,080	0,061	0,062	0,157

9.8. Vasta-aine B, 100 ng/kaivo, 2h AG, y/y Leima A, 1:100 000, 30 min substraatti, 0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320; 640; N ; 0												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,051	0,061	0,064	0,093	0,173	0,225	0,308	0,506	1,016	0,809	0,259	0,072
B	0,048	0,058	0,069	0,092	0,144	0,219	0,354	0,743	0,903	1,183	0,345	0,064
C	0,047	0,056	0,070	0,093	0,138	0,227	0,334	0,788	0,937	1,189	0,250	0,061
D	0,049	0,060	0,075	0,109	0,150	0,256	0,403	0,700	0,932	1,141	0,224	0,072
E	0,048	0,065	0,076	0,120	0,177	0,273	0,434	0,794	1,031	1,249	0,254	0,075
F	0,057	0,062	0,076	0,112	0,155	0,264	0,457	0,654	0,971	1,136	0,228	0,078
G	0,051	0,063	0,075	0,111	0,165	0,281	0,428	0,458	0,758	1,179	0,237	0,064
H	0,049	0,061	0,071	0,094	0,117	0,209	0,299	0,447	0,794	1,133	0,233	0,055

= 4 h myöhemmin lähes samat absorbtiot												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,053	0,064	0,069	0,097	0,185	0,235	0,328	0,549	1,046	0,871	0,273	0,076
B	0,051	0,062	0,073	0,097	0,152	0,229	0,367	0,804	0,972	1,022	0,361	0,070
C	0,051	0,060	0,075	0,096	0,148	0,237	0,356	0,845	0,980	1,068	0,264	0,065
D	0,053	0,064	0,080	0,112	0,155	0,264	0,428	0,734	0,963	1,063	0,236	0,075
E	0,051	0,070	0,080	0,123	0,187	0,284	0,468	0,847	1,033	1,040	0,268	0,078
F	0,061	0,067	0,080	0,116	0,164	0,275	0,487	0,707	0,991	1,061	0,243	0,081
G	0,055	0,067	0,082	0,116	0,175	0,295	0,457	0,487	0,811	1,061	0,253	0,069
H	0,052	0,087	0,076	0,098	0,125	0,217	0,324	0,471	0,845	1,123	0,245	0,060

AB B 100ng y/y-AG 2h- LaAB A 2h 1:20 000 (0, 20, 40, 80, 160, 320, 640, N, N+P, P										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0,043	0,045	0,044	0,049	0,054	0,056	0,073	0,054	0,045	0,042
B	0,041	0,042	0,043	0,050	0,052	0,068	0,059	0,056	0,044	0,040
C	0,040	0,046	0,045	0,047	0,055	0,072	0,082	0,062	0,049	0,045
D	0,051	0,053	0,052	0,059	0,066	0,077	0,082	0,067	0,053	0,047
E	0,045	0,056	0,055	0,057	0,072	0,086	0,085	0,069	0,048	0,048
F	0,045	0,050	0,050	0,067	0,068	0,072	0,086	0,057	0,050	0,042
G	0,041	0,048	0,053	0,057	0,061	0,066	0,070	0,053	0,056	0,041
H	0,049	0,047	0,050	0,067	0,064	0,073	0,089	0,057	0,047	0,052