



Anu Koistinen & Emmi Taskila

## **MONOKLONAALISTEN FOSFATIDYYLIETANOLIVASTA-AINEIDEN TUOTTAMINEN, PUHDISTAMINEN JA TESTAAMINEN**

**MONOKLONAALISTEN FOSFATIDYYLIETANOLIVASTA-AINEIDEN  
TUOTTAMINEN, PUHDISTAMINEN JA TESTAAMINEN**

Anu Koistinen  
Emmi Taskila  
Opinnäytetyö  
Syksy 2010  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijät: Koistinen, Anu & Taskila, Emmi

Opinnäytetyön nimi: Monoklonaalisten fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuottaminen, puhdistaminen ja testaaminen

Työn ohjaajat: Reponen, Paula & Aho, Hanna-Maarit

Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: Syksy 2010

Sivumäärä: 45 + 6 liitesivua

---

## TIIVISTELMÄ

Oulun yliopiston kliinisen tutkimuksen keskuksen sisätautien klinikan alaisuudessa toimivalla professori Markku Savolaisen tutkimusryhmällä on meneillään tutkimus, jonka tavoitteena on kehittää uusi määritysmenetelmä alkoholin suurkulutuksen osoittamiseen. Alkoholin läsnä ollessa elimistössä syntyvä fosfatidyylietanoli on osoittautunut spesifiseksi ja luotettavaksi alkoholin suurkulutuksen merkkiaineeksi. Kehitteillä oleva vasta-aineisiin perustuva määritysmenetelmä mahdollistaisi fosfatidyylietanolin määrittämisen myös pienissä laboratorioissa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia tutkimusryhmän valmistamien hybridomasolinjojen tuottamien vasta-aineiden tuottoaika ja puhdistusmenetelmiä ja löytää mahdollisimman tehokkaat tavat vasta-aineiden laajaa tuotantoa varten. Tutkimuksessa määritettiin hybridomasolinjojen optimaalista fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuottoaika kasvattamalla niitä kuusi vuorokautta soluviljelyssä. Lisäksi uuden proteiinivapaan solujen kasvatusliuoksen toimivuutta testattiin fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuotossa ja puhdistuksessa ioninvaihtokromatografialla. Tutkimuksessa määritettiin myös alhaisinta vasta-aineita tehokkaasti saostavaa polyetyleeniglykolikonsentraatioita. Vasta-aineiden pitoisuuden ja toimivuuden testaamiseen käytettiin ELISA-menetelmiä.

Opinnäytetyön tuloksien perusteella optimaalinen vasta-aineiden tuottoaika 2E9-solinjalla oli viisi vuorokautta. 2B1-solinjan tuottoaika oli pidempi kuin testaamamme aika, joten optimaalista tuottoaika kannattaisi määrittää pidemmällä aikavälillä. Alhaisin mahdollinen vasta-aineita saostava polyetyleeniglykolipitoisuus oli tulosten perusteella 4 %. Tulokset osoittivat, että proteiinivapaa solujen kasvatusliuos ei sovellu näille kahdelle solulinjalle, sillä molempien solulinjojen tuottamien vasta-aineiden määrä oli pienempi kuin verrattuna toisessa käyttämässämme kasvatusliuoksessa.

---

Asiasanat: fosfatidyylietanoli, monoklonaalinen vasta-aine, ioninvaihtokromatografia, polyetyleeniglykolisaostus

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

---

Authors: Koistinen, Anu & Taskila, Emmi

Title of thesis: Producing, Purifying and Testing of Monoclonal Phosphatidylethanol Antibodies

Supervisors: Reponen, Paula & Aho, Hanna-Maarit

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2010

Number of pages: 45 + 6 appendice pages

---

### ABSTRACT

Our study was commissioned by a research group from the University of Oulu. It was a part of a research project which aims to develop a new immunoassay for detecting an alcohol biomarker called phosphatidylethanol. Phosphatidylethanol is a promising new biomarker for detecting long-term alcohol abuse. It has excellent sensitivity and specificity compared to other laboratory tests used in detecting alcohol abuse. Immunological detection of phosphatidylethanol would enable screening of it in small laboratories.

The aim of our study was to help the research group to find an easy way to produce and purify monoclonal antibodies needed in the new immunoassay. We cultivated two different hybridoma cell lines in cell culture for 6 days in order to examine the optimal production time of antibodies. We tested a new protein-free growth medium in order to try its suitability for producing antibodies in it. Antibodies produced in protein-free medium were purified with ion-exchange chromatography. After purification all the collected antibodies were tested with ELISA-methods to see if they still can specifically bind to their antigen. One of our aims was to find the lowest concentration of polyethylene glycol that effectively precipitates antibodies from protein containing cell growth medium.

The results indicated that the optimal producing time of antibodies in protein containing growth medium for 2E9-cell line was 5 days. The amount of antibodies secreted by 2B1-cell line increased until the end of the test. Therefore it would be justifiable to extend the testing time in further measurements. The production of antibodies in protein-free medium was not as effective as in protein containing medium. The lowest concentration of polyethylenglycol in precipitation of the antibodies was 4 %.

---

Keywords: Phosphatidylethanol, monoclonal antibody, ion-exchange chromatography, polyethylene glycol precipitation

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	6
2	FOSFATIDYYLIETANOLI .....	8
2.1	Fosfolipidit .....	8
2.2	Fosfolipaasi D .....	10
2.3	Fosfatidyylietanolin muodostuminen .....	11
2.4	Fosfatidyylietanolin vaikutukset elimistössä .....	13
2.5	Fosfatidyylietanoli alkoholin liikakäytön merkkiaineena .....	14
3	MONOKLONAALISTEN VASTA-AINEIDEN TUOTTAMINEN .....	16
4	TUTKIMUSTEHTÄVÄT .....	18
5	TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN .....	19
5.1	Hybridomasolujen viljely .....	20
5.2	Optimaalisen fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuottoajan määrittäminen .....	24
5.3	EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuuden testaus vasta- aineiden tuotossa ja puhdistamisessa .....	26
5.3.1	Vasta-aineiden puhdistus ioninvaihtokromatografialla .....	27
5.3.2	Vasta-aineiden toimivuuden testaus ELISA-menetelmällä .....	30
5.4	Alhaisimman fosfatidyylietanolivasta-aineita saostavan polyetyleeniglykolikonsentraation määrittäminen .....	32
6	TUTKIMUKSEN TULOKSET .....	33
6.1	Optimaalisen tuottoajan määrittäminen .....	33
6.2	EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuus fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuottamiseen ja puhdistamiseen .....	34
6.2.1	Vasta-aineiden tuottaminen .....	35
6.2.2	Vasta-aineiden puhdistaminen ja toimivuuden testaus .....	36
6.3	Alhaisimman fosfatidyylietanolivasta-aineita saostavan polyetyleeniglykolikonsentraation määrittäminen .....	38
7	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	39
8	POHDINTA .....	40
	LÄHTEET .....	42
	LIITTEET .....	46

# 1 JOHDANTO

Alkoholi on yksi merkittävimmistä terveysuhan aiheuttajista yhteiskunnassa, ja sen liikkäyttö aiheuttaa suuria kustannuksia yhteiskunnalle (Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, Käypä hoito -suositus alkoholiongelmaisen hoidosta, hakupäivä 3.3.2010). Laboratoriokokeet ovat keskeinen tapa diagnosoida alkoholin suurkulutusta, mutta nykyisin käytössä olevat menetelmät eivät yksittäisinä tutkimuksina osoita luotettavasti pitkäaikaista alkoholinkäyttöä (Nissinen & Savolainen 2008, 45). Tämän vuoksi alkoholin suurkulutuksen toteamiseen kaivataan uutta, spesifistä merkkiainetta.

Fosfatidyylietanoli (PEth) on alkoholin suora aineenvaihduntatuote, ja muutoin kuin alkoholinkäytön seurauksena sitä ei ole todettu muodostuvan elimistössä (Aradottir, Lundqvist & Alling 2002, 514). Fosfatidyylietanolin pitkä puoliintumis- ja säilyvyysaika elimistössä tekevät siitä mielenkiintoisen yhdisteen alkoholin liikkäytön toteamisen kannalta. Nykyisiin rutiinikäytössä oleviin merkkiaineisiin verrattuna fosfatidyylietanoli on huomattavasti herkempi merkkiaine, ja tutkimukset ovat osoittaneet, ettei se anna vääriä positiivisia tuloksia (Aradottir, Asanovska, Gjerms, Hansson & Alling 2006, 435–436).

Oulun yliopiston kliinisen tutkimuksen keskuksen sisätautien klinikalla toimivalla professori Markku Savolaisen tutkimusryhmällä on meneillään projekti, jonka tavoitteena on kehittää uutta menetelmää alkoholin liikkäytön diagnosointiin fosfatidyylietanolia vastaan tuotettujen vasta-aineiden avulla. Nykyään fosfatidyylietanolia on mahdollista määrittää, mutta menetelmä on liian kallis ja monimutkainen kliiniseen käyttöön otettavaksi, ja sen käyttö vaatii erityisosaamista. Vasta-aineisiin perustuvalla fosfatidyylietanolin tunnistamisella pyritään siihen, että menetelmä saataisiin käyttöön myös pienempiin laboratorioihin. (Nissinen & Savolainen 2008, 47.)

Opinnäytetyömme on osa tätä suurempaa projektia. Aiheen opinnäytetyöhömme saimme syksyllä 2009 FM, tutkija Antti Nissiseltä professori Markku Savolaisen tutkimusryhmästä. Tarkoituksenamme oli testata menetelmiä monoklonaalisten fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuottamista ja puhdistamista varten. Tehtävinämmä oli määrittää tutkimusryhmän kehittämien solulinjojen optimaalista vasta-aineiden tuottoaika ja testata proteiinivapaan solujen kasvatusliuoksen toimivuutta vasta-aineiden tuotto- ja puhdistusvaiheessa. Proteiinivapaan kasvatusliuoksen käyttö helpot-

taisi vasta-aineiden puhdistusta ioninvaihtokromatografialla. Lisäksi määritimme alhaisinta fosfatidyylietanolivasta-aineita tehokkaasti saostavaa polyetyleeniglykolikonsentraatiota.

Mielenkiinto tutkimustyötä ja erityisesti tässä tutkimuksessa käytettäviä menetelmiä kohtaan sai meidät valitsemaan yhteisen opinnäytetyön aiheen, jonka avulla meidän oli mahdollista syventää taitojamme solu- ja molekyylibiologisten laboratoriomenetelmien osalta. Lisäksi aihe antoi meille hyvät lähtökohdat tutkimusryhmissä työskentelyyn.

Tutkimuksemme antaa fosfatidyylietanolin määrittämenetelmää kehittäväälle tutkimusryhmälle uutta tietoa fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuoton kehittämiseen ja optimoimiseen. Määrittämenetelmän kehittämisestä tulee olemaan hyötyä kansantaloudellisella tasolla, sillä alkoholiongelmaitten potilaiden diagnosoinnin helpottuessa voidaan potilaita ohjata hoitoon jo aikaisemmassa vaiheessa. Alkoholiongelmien havaitseminen aikaisessa vaiheessa vaikuttaa pitkällä aikavälillä pienentävästi terveydenhuollon kuormitukseen ja kuluihin.

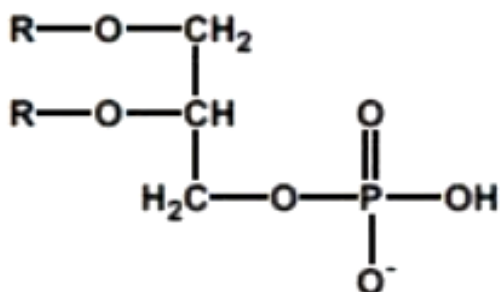
## 2 FOSFATIDYYLIETANOLI

Fosfatidylietanoli (PEth) on etanolin läsnäollessa muodostuva fosfolipidi, jota ei esiinny elimistössä ilman etanolin vaikutusta. Fosfatidylietanolia muodostuu etanolin läsnäolon vaikutuksesta transfosfatidylaatioreaktiossa, jossa fosfolipaasi D -entsyymi katalysoi fosfatidylikoliinin hajoamista. (Yang, Freer & Benson 1967, 477.)

### 2.1 Fosfolipidit

Fosfolipidit ovat joukko elimistössä esiintyviä lipidejä, joissa yhteen glyserolin hydroksyyliinryhmään on sitoutunut fosfaattiryhmä. Fosfolipidit voivat muodostua glyseroli- tai sfingosinirungosta. Glyserolirunkoisia fosfolipidejä kutsutaan fosfoglyserideiksi. Fosfoglyseridit ovat yleisimpiä nisäkkäiden solukalvolla ilmeneviä fosfolipidejä. (Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell & Weil 2009, 407–408; Stryer 1988, 285.)

Fosfoglyseridien glyseridiosan kahteen hydroksyyliinryhmään esteröityy kahden rasvahapon karboksyyliinryhmät. Kun kolmanteen hydroksyyliinryhmään esteröityy fosforihappo, syntyy fosfatidihappo (1,2-diasyyliin glyseroli 3-fosfaatti), joka on yksinkertaisin fosfoglyseridi (kuvio 1). Alkoholin esteröityessä fosfatidihapon fosfaatin –OH (hydroksyyli)-ryhmään syntyy monimuotoisempia fosfoglyseridejä. (Stryer 1988, 285–286.) Fosfoglyseridit nimetään fosfaattihappoon liittyneen alkoholin mukaan: fosfoglyseridejä muodostavia alkoholeja ovat etanoliamiini, koliini, seriini, glyseroli tai inositoli (Murray ym. 2009, 407–408).



KUVIO 1. Fosfatidihappo (mukaillen Nissinen & Savolainen 2008, 46)

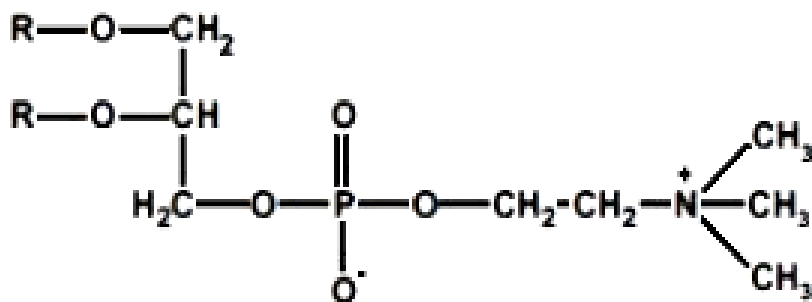


Fosfoglyseridit ovat luonteeltaan amfiifilisiä molekyyliä, eli niillä on sekä vettä hylkivä eli hydrofobinen että veteen liukeneva eli hydrofiilinen pää. Fosfoglyserideissä fosforihappoesteripää on hydrofiilinen ja rasvahapot ovat hydrofobisia molekyyliä. Amfiifilisen olomuotonsa vuoksi fosfoglyseridit pyrkivät suuntaamaan hydrofobisen päänsä vedestä poispäin. Tämän ominaisuutensa vuoksi ne muodostavat elimistössä monimuotoisia rakenteita. (Murray ym. 2009, 408–409.)

Fosfoglyseridit ovat kolesterolin ja glykolipidien lisäksi yksi solukalvojen tärkeimmistä lipideistä (Stryer 1988, 284). Ne toimivat tärkeänä perustana elimistön membraaneille, kuten solukalvolle, joka muodostuu kaksoislipidikerroksesta. Kaksoislipidikerroksessa fosfolipidien hydrofobiset päät suuntautuvat toisiaan kohden ja hydrofiiliset päät muodostavat vesiliukoisen kalvon niiden ympärille. Muita fosfoglyseridien muodostamia rakenteita ovat esimerkiksi pallomaiset kuljettajamolekyyleinä toimivat misellit, joissa hydrofobiset päät suuntautuvat misellin sisään ja hydrofiiliset osat ulospäin. (Murray ym. 2009, 408–409.)

#### Fosfatidyylikoliini

Fosfatidyylikoliini on fosfoglyserideihin lukeutuva yhdiste. Se muodostuu fosfatidihaposta, jonka fosfaattiryhmään on esteröitynyt koliini. Fosfatidyylikoliinin rakennetta on havainnoitu kuviossa 2. Fosfatidyylikoliini on solukalvon yleisin fosfolipidi, ja se sijaitsee solukalvolla lähinnä sen ulkoreunalla. Fosfatidyylikoliini sisältää suuren osan koko elimistön koliinista, joka on tärkeä yhdiste hermostollisessa viestinvälityksessä (Murray ym. 2009, 124.)

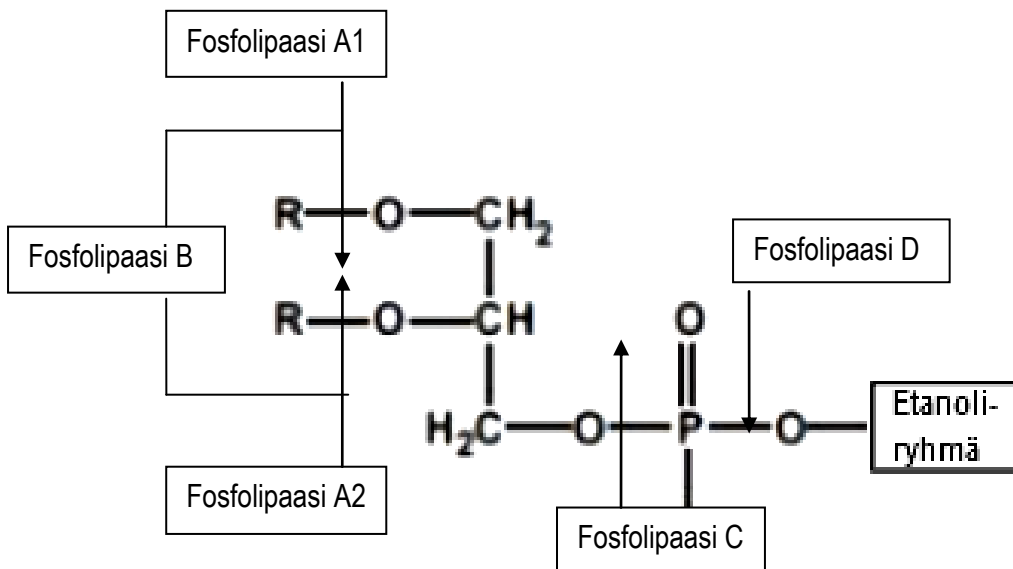


KUVIO 2. Fosfatidyylikoliinin rakenne (mukaillen Nissinen & Savolainen 2008, 46)

Fosfatidyylikoliinin biosynteesin säätelyä ohjaa vapaiden rasvahappojen määrä (Harper 2009, 207). Fosfatidyylikoliinin sisältämä koliini syntetisoidaan ravinnon sisältämästä koliinista. Fosfatidyylikoliinin muodostuksessa koliini fosforyloidaan ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) avulla fosforyylikoliiniksi, joka reagoi CTP:n (cytidine triphosphate) kanssa muodostaen CDP (cytidine diphosphodiacylglycerol)-koliinia. Kun CDP-koliini siirretään diasyylylglyserolille, syntyy fosfatidyylikoliinia. Fosfatidyylikoliinia voi muodostua myös fosfatidyylietanolamiinin metylaation kautta. (Stryer 1988, 549–550.)

## 2.2 Fosfolipaasi D

Fosfolipaasit ovat elimistössä esiintyviä entsyymejä, joiden päätehtävänä on osallistua fosfoglyseridien pilkkoutumiseen. Jokaisella fosfolipaasilla on oma katkaisukohtansa fosfoglyseridien rungossa (Stryer 1988, 552.) Erilaisten fosfolipaasien katkaisukohtat on esitetty kuviossa 3. Fosfolipaasi D:n tehtävänä on katalysoida veden avulla tapahtuvaa fosfatidyylikoliinin hydrolysoitumista, jolloin se hajoaa fosfatidihapoksi ja koliiniryhmäksi (Yang, Freer & Benson 1967, 477).

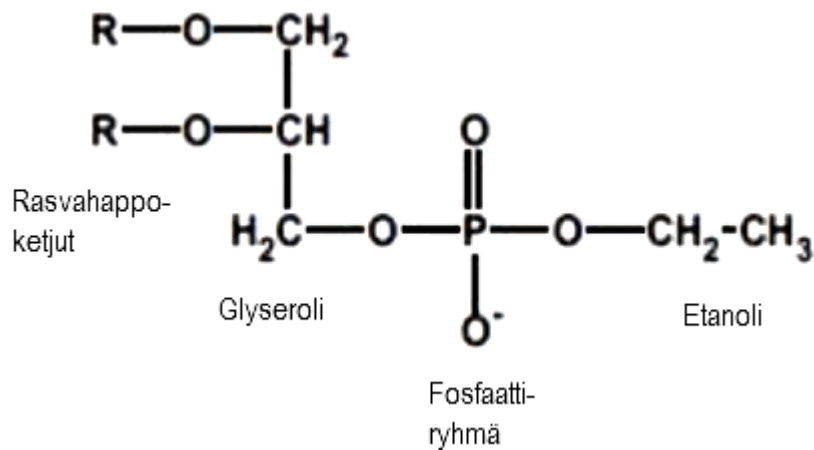


KUVIO 3. Fosfolipaasien katkaisukohtat (mukaihen Harper 2009, 209; Nissinen & Savolainen 2008, 46)

Fosfatidyylikoliinin hydrolysoitumisen seurauksena syntynyt fosfatidihappo toimii tärkeänä molekyylinä solunsisäisten signaalien välittämisessä. Tämän vuoksi fosfolipaasi D:n toiminta on solulle elintärkeää. (Stryer 1988, 552).

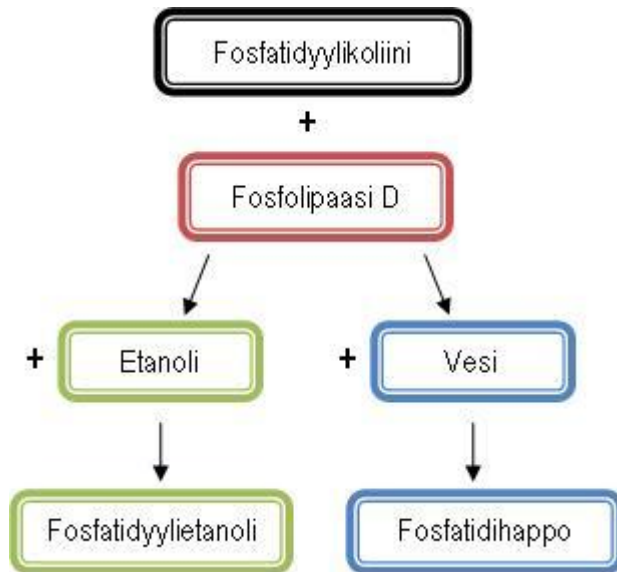
### 2.3 Fosfatidyylietanolin muodostuminen

Fosfatidyylietanoli on elimistössä etanolin läsnä ollessa muodostuva fosfolipidi, jota ei normaalisti esiinny elimistössä. Se muodostuu muiden fosfolipidien tapaan kahdesta rasvahappoketjusta, ja sen pääryhmänä toimii fosfoetanoli. Fosfatidyylietanolin rakennetta on havainnointu kuviossa 4.



KUVIO 4. Fosfatidyylietanolin rakenne (mukaillen Nissinen & Savolainen 2008, 46)

Fosfatidyylietanolin muodostuminen on riippuvainen fosfolipaasi D:n toiminnasta ja etanolin läsnäolosta elimistössä. Etanolin läsnä ollessa fosfolipaasi D saa aikaan transfosfatidylaatioreaktion, jossa fosfatidyylikoliini menettää koliiniryhmänsä ja sen tilalle fosfatidihapporunkoon liittyy etanoli (kuvio 5). (Yang, Freer & Benson 1967, 479.) Etanolin affiniteetti on veteen verrattuna jopa yli 1000-kertainen, ja näin transfosfatidylaatioreaktio tapahtuu paljon normaalia fosfatidyylikoliinin hydrolysoitumisreaktiota herkemmin etanolin läsnä ollessa. (Helander & Zheng 2009, 1395). Täten fosfatidyylietanolin muodostuminen vähentää fosfatidihapon muodostumista.



KUVIO 5. Fosfatidyylietanolin muodostuminen (mukaillen Nissinen & Savolainen 2008, 46)

Fosfatidyylietanolin muodostuminen nisäkässoluissa on osoitettu lukuisissa eläinkokeissa sekä soluviljelyolosuhteissa etanolialistuksen avulla. Fosfatidyylietanolia muodostuu useissa elimissä ja kudoksissa, ja sitä on löydetty myös valkosoluista sekä alkoholistien kokoverestä (Aradottir, Lundqvist & Alling 2002, 514). Fosfatidyylietanoli on mitattavissa verestä jopa 29 päivää viimeisimmän alkoholiannoksen nauttimisesta alkoholin suurkuluttajilla. Sen keskimääräinen puoliintumisaika on noin neljä päivää. Fosfatidyylietanolia voi muodostua jopa  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa alkoholin läsnä ollessa, mutta sen on todettu pysyvän stabiilina jopa kolme viikkoa  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa. Tämän vuoksi tutkittaessa fosfatidyylietanolin pitoisuuksia verinäytteistä on siis kiinnitettävä huomiota näytteen säilytysolosuhteisiin, jotta välttyttäisiin vääriä positiivisilta tuloksilta. (Gnann ym. 2010, 2416.) Vääriä positiivisia tuloksia voi syntyä esimerkiksi tilanteessa, jossa tutkittava verinäyte sisältää näytteenottohetkellä alkoholia. Tällöin verinäytteen pitkä säilytysaika matalassa lämpötilassa mahdollistaa fosfatidyylietanolin muodostumisen näyteputkessa. Tilanne voi syntyä esimerkiksi kun tutkittava henkilö on nauttinut runsaasti alkoholia verinäytteenottoa edeltävänä iltana. Näin ollen tutkittavan henkilön voidaan siis todellisuudesta poiketen olettaa nauttineen alkoholia runsaasti pitkällä aikavälillä. (Nissinen 11.11.2010, suullinen tiedonanto.)

Fosfatidyylietanolista on tunnistettu elimistöstä 48 homologista muotoa. Fosfatidyylietanolin variantit johtuvat sen rakenneosana olevien rasvahappojen sisältämien hiiliketjun hiilien määrän vaihtelusta. Tutkimukset ovat osoittaneet, että suurin osa fosfatidyylietanolimolekyylien sisältämistä rasvahapoista ovat muotoa 16:0/18:1 sekä 16:0/18:2 (hiilien määrä: kaksoissidosten mää-

rä). Normaalisti fosfoglyserideissä on parillinen määrä hiiliä, mutta tutkittaessa fosfatidyylietanolin rakenteellisia variantteja on löydetty myös harvinaisia parittoman määrän hiiliä sisältäviä rasvahappoja. (Gnann ym. 2010, 2422.)

## 2.4 Fosfatidyylietanolin vaikutukset elimistössä

Normaaleissa elimistön olosuhteissa veden läsnä ollessa fosfolipaasi D hydrolysoi fosfatidyylikoliinin koliiniksi ja fosfatidihapoksi, joka on tärkeä solunsisäisten viestien kuljettajamolekyylä. Fosfatidihaposta voidaan edelleen muokata entsyymien avulla diasyyliiglyserolia ja lysofosfatidihappoa, jotka ovat myös elimistölle tärkeitä molekyylejä. Koska fosfatidyylietanolilla on fosfatidihappoa pitempi puoliintumisaika ja sillä on taipumus kerääntyä soluun, se saattaa häiritä solujen normaalia signaalitransduktiota. (Aradottir, Moller & Alling 2004, 8.)

Fosfatidyylietanolin pääryhmä on negatiivisesti varautunut ja paljon fosfatidyylikoliinia pienempi. Koska normaalisti solukalvolla esiintyvä fosfatidyylikoliini on positiivisesti varautunut molekyylä, voi fosfatidyylietanolin läsnäolo aiheuttaa muutoksia solukalvon normaaliin elektrokemikaaliseen tasapainoon. (Hannuksela, Rämetsä, Nissinen, Liisanantti & Savolainen 2003, 97.)

Tutkimukset ovat osoittaneet, että fosfatidyylietanolin hajoaminen punasoluista on hidas prosessi. Fosfatidyylietanolin normaali puoliintumisaika veressä on kuitenkin noin neljä päivää. Koska fosfatidyylietanolia muodostava fosfolipaasi D -entsyymi on jatkuvasti läsnä veressä, voi se johtaa fosfatidyylietanolin jatkuvaan muodostumiseen ja sitä kautta kasaantumisen soluihin. (Aradottir ym. 2004, 11; Wurst, Thon, Aradottir, Hartmann, Wiesbeck, Lesch, Skala, Wolfersdorf, Weinmann & Alling 2010, 89, 91.)

Osa etanolin aikaansaamista elimiä vaurioittavista mekanismeista on vielä epäselviä tutkijoille, vaikka etanolin haitallisia vaikutuksia elimistössä on tutkittu paljon. Nykyisin tiedetään kuitenkin, että etanoli aiheuttaa vaurioita mm. aivoihin, maksaan, sydämeen, mahalaukuun, haimaan ja luurankoliiniksi. Eläinkokein suoritettussa fosfatidyylietanolin muodostumispaikkaa selvittäneessä tutkimuksessa huomattiin, että fosfatidyylietanolinpitoisuudet olivat suuria aivoissa, maksassa, munuaisissa, sydämessä ja mahan alueella. Fosfatidyylietanolin kerääntyminen soluihin juuri näihin elimiin voisi selittää etanolin elimiä vaurioittavaa vaikutusta pitkäaikaisen ja runsaan alkoholin linkäytön seurauksena. (Aradottir, Lundqvist & Alling 2002, 514, 517.)

## 2.5 Fosfatidyylietanoli alkoholin liikkäytön merkkiaineena

Alkoholi on yksi merkittävimmistä terveysuhan aiheuttajista yhteiskunnassa. Tämän hetkisten tilastojen mukaan jopa 20–30 % kaikista sairaalapaikoista ja terveydenhuollon kuluista saattaa johduttaa alkoholin liikkäytön aiheuttamista terveydellisistä ongelmista (Niemelä 2007, 40). Sekä taloudellisten että terveydellisten näkökulmien kannalta on perusteltua ja tarpeellista kehittää menetelmiä alkoholin liikkäytön toteamiseen (Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, Käypä hoito -suositus alkoholiongelmaisen hoidosta, hakupäivä 3.3.2010).

Tätä nykyä yleisimmin käytössä olevat biologiset alkoholin liikkäytön merkkiaineet ovat alkoholin epäsuoria merkkiaineita, kuten MCV (punasolujen keski-tilavuus), GGT (gammaglutamyyliitransferaasi) ja CDT (desialotransferriini) (Aradottir, Asanovska, Gjeress, Hansson & Alling 2006, 431). Näiden merkkiaineiden syntyyn voivat siis etanolin lisäksi vaikuttaa monet muut asiat, esimerkiksi erilaiset elimistössä vallitsevat tauti- ja sairaustilat, mikä alentaa niiden spesifisyyttä alkoholin liikkäytön tutkimisessa. Itse etanolin puoliintumisaika elimistössä on todella lyhyt, ja tämän vuoksi tutkijoiden mielenkiinto on kääntynyt kohti sen suoria aineenvaihduntatuotteita. (Niemelä 2007, 41–43.)

Fosfatidyylietanoli on alkoholin suora aineenvaihduntatuote, ja muutoin kuin alkoholinkäytön seurauksena sitä ei ole todettu muodostuvan elimistössä (Aradottir, Lundqvist & Alling 2002, 514). Lisäksi sen pitkä puoliintumis- ja säilyvyysaika elimistössä tekevät siitä mielenkiintoisen yhdisteen alkoholin liikkäytön toteamisen kannalta. Nykyisiin rutiinikäytössä oleviin merkkiaineisiin verrattuna fosfatidyylietanoli on huomattavasti herkempi merkkiaine ja tutkimukset ovat osoittaneet, ettei se anna vääriä positiivisia tuloksia (Aradottir, Asanovska, Gjeress, Hansson & Alling 2006, 435–436). Tällä hetkellä fosfatidyylietanolin määrittämiseen käytetyllä LC-MS eli nestekromatografia-massaspektrometrilaitteistolla määritettynä sen spesifisyys on 100 % ja herkkyys 98–100 % (Nissinen, Mäkelä, Vuoristo, Liisanantti, Hannuksela, Hörkkö & Savolainen 2008, 926).

Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että runsaan alkoholinkäytön seurauksena fosfatidyylietanolia voi muodostua ihmisen veressä mitattaviin määriin asti. Verinäytteestä mitatun fosfatidyylietanolin pitoisuuden ja nautitun alkoholin määrän on lisäksi todettu korreloivan keskenään. Tämä tarkoittaisi sitä, että mittaamalla fosfatidyylietanolin pitoisuus verinäytteestä voidaan alkoholin liikkäytön toteamisen lisäksi arvioida tutkittavan potilaan käyttämän alkoholin määrää. Tutkimukset ovat

kuitenkin osoittaneet myös yksilöllisiä vaihteluita fosfatidyylietanolin muodostumisessa, minkä vuoksi arviot ovat lähinnä suuntaa-antavia. (Aradottir ym. 2004, 12.)

Fosfatidyylietanolin muodostuminen elimistössä mitattaviin määriin vaatii pitkäaikaista ja runsasta alkoholin käyttöä. On arvioitu, että kahden viikon aikana yhteensä noin 1000 g absoluuttista alkoholia aiheuttaisi pitoisuuden nousun mitattavalle tasolle. Tämä tarkoittaa noin 50 g:n absoluuttista alkoholiannosta päivittäin eli noin neljää ravintola-annosta (1 annos = 12 g alkoholia). Tuoreimpien tutkimusten mukaan runsaan ja pitkäaikaisen alkoholin käytön seurauksena fosfatidyylietanoli voi olla mitattavissa verestä jopa 28 päivää pitkäaikaisen ja runsaan alkoholin käytön lopettamisesta. Tämän vuoksi fosfatidyylietanolin pitoisuuksien määrittämisellä olisi suuri hyöty alkoholin liikkakäytön seurannassa. (Wurst ym. 2010, 89, 91.)

### 3 MONOKLONAALISTEN VASTA-AINEIDEN TUOTTAMINEN

Adaptatiivinen eli hankinnainen immuunipuolustus on selkärankaisten puolustusjärjestelmä elimistöön tunkeutuvia taudinaiheuttajia vastaan. Hankinnaisen immuunijärjestelmän toiminta perustuu elimistön kykyyn tunnistaa sille vieraat aineet eli antigeenit ja puolustautua niitä vastaan. Lymfosyytit huolehtivat hankinnaisen immuunijärjestelmän immuunivasteista. Osa hankinnaista immuunipuolustusta on vasta-ainevälitteinen immuunivaste. Vasta-ainevälitteisessä immuunivasteessa B-lymfosyytit tuottavat vasta-aineita kohdattuaan elimistöön kulkeutuneen antigeenin. Vasta-aineen sitoutuminen vieraaseen antigeeniin voi estää antigeenin toiminnan, ja lisäksi se saa elimistössä aikaan muiden immuunipuolustukseen osallistuvien valkosolujen aktivaation. (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter 2008, 1539–1540, 1543.)

Selkärankaisten elimistön kykyä tuottaa vasta-aineita vieraita antigeenejä vastaan voidaan hyödyntää esimerkiksi lääketieteellisessä tutkimuksessa tuottamalla monoklonaalisia vasta-aineita. Monoklonaaliset vasta-aineet ovat laboratorio-oloissa valmistettujen hybridoomasolulinjojen tuottamia vasta-aineita. Hybridoomasolulinjan jokainen solu tuottaa yhtä antigeeniä vastaan samanlaista vasta-ainetta. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa laboratoriossa immunisoimalla koe-eläin antigeenillä, jota vastaan halutaan tuottaa vasta-ainetta. Tämän vuoksi koe-eläimen immuunijärjestelmä aktivoituu ja alkaa kehittää pernan lymfosyyteissä vasta-ainetta vierasta antigeeniä vastaan. Kun koe-eläimeltä poistetaan perna ja siitä saatavat lymfosyytit fuusioidaan myeloomasolujen eli loputtomasti jakautuvien syöpäsolujen kanssa, syntyy nk. hybridoomasoluja. Solut saadaan fuusioitumaan käsittelemällä solususpensiota esimerkiksi polyetyleeniglykolilla, joka muuttaa solujen plasmamembraanin rakennetta ja siten mahdollistaa solujen fuusioitumisen. (Alberts ym. 2008, 508, 1539, G24; Freshney 2005, 493; Janeway, Travers, Walport, Shlomchik 2005, 698.)

Hybridoomasolut saadaan erotettua fuusioitumattomista soluista viljelemällä niitä HAT (hypoksantiini-aminopteriini-tymidiini)-kasvatusliuoksessa, jossa ainoastaan fuusioituneet solut kykenevät säilymään elinkelpoisina. HAT-kasvatusliuoksen sisältämä inhibiittorina eli estäjänä toimiva aminopteriini estää DNA:n tuoton normaalin synteesisireitin kautta. Myeloomasolut eivät kykene tuottamaan DNA:ta vaihtoehtoisen synteesisireitin kautta, minkä vuoksi ne eivät säily elossa HAT-kasvatusliuoksessa. Koe-eläimen lymfosyytit kykenevät käyttämään vaihtoehtoista synteesisireittiä, mutta eivät muutoin kykene säilymään elinkelpoisena soluviljelmässä muutamaa päivää pidem-



pään. Näin ainoastaan fuusioituneilla hybridoomasoluilla on sekä myeloomasolun että lymfosyytin ominaisuudet, jotka yhdessä mahdollistavat niiden jakaantumiskyvyn HAT-kasvatusliuoksessa. Fuusioituneet solut käyttävät HAT-kasvatusliuoksen sisältämää hypoksantiinia ja tymidiiniä DNA:n syntetisoimiseen. (Alberts ym. 2008, 508–509; Freshney 2005, 493.)

Solujen fuusioitumisen jälkeen viljelmä sisältää hybridoomasoluja, joista vain osa tuottaa vasta-ainetta immunisointiin käytettyä antigeeniä vastaan. Osa fuusioiduista lymfosyyteistä tuottaa kuitenkin vasta-aineita niiden aiemmin kohtaamia antigeenejä vastaan. Lisäksi immunisointiin käytettyä antigeeniä vastaan kehitty useita erilaisia vasta-aineita, joiden erona on niiden kyky tunnistaa antigeenin eri epitooppeja. Epitooppi voi olla esimerkiksi viidestä kuuteen aminohappoa sisältävä sivuketju proteiinin pinnalla. Erilaisia vasta-aineita tuottavat solut on saatava erilleen, joten solut erotetaan kasvamaan omiin kuoppiinsa 96-kuoppalevyllä. Erottelun avulla saadaan valmistettua solulinja, joka on lähtenyt jakaantumaan yhdestä solusta. Tällöin kaikki solulinjan tuottamat vasta-aineet ovat keskenään monoklonaalisia. Hybridoomasoluista valikoidaan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-menetelmien avulla ne solut, jotka tuottavat spesifisesti immunisoinnissa käytettyä antigeeniä tunnistavia vasta-aineita. (Alberts ym. 2008, 508–509; Freshney 2005, 493; Janeway ym. 2005, 698.)

## 4 TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tutkimuksemme tarkoituksena oli määrittää kahden fosfatidyylitanolivasta-aineita tuottavan solulinjan (2B1 ja 2E9) optimaalista vasta-aineiden tuottoaika soluviljelmässä. Tutkimme proteiinivapaan hybridomasolujen viljelyyn kehitetyn EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuutta vasta-aineiden tuotto- ja puhdistusmenetelmissä. Määritimme myös alhaisinta fosfatidyylitanolivasta-aineita tehokkaasti saostavaa polyetyleeniglykolikonsentraatiota polyetyleeniglykolisaostusmenetelmään. Tutkimustulosten avulla tutkimusryhmä voi kehittää ja optimoida alkoholin liikkäytön uudessa tunnistamismenetytelmässä tarvittavien vasta-aineiden tuotto- ja puhdistusmenetelmiä. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää seuraavia asioita:

1. Kuinka pitkä on 2B1- ja 2E9-solulinjojen optimaalinen fosfatidyylitanolivasta-aineiden tuottoaika soluviljelmässä?
2. Miten proteiinivapaa EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuos soveltuu fosfatidyylitanolivasta-aineiden tuottamiseen ja puhdistamiseen?
3. Mikä on polyetyleeniglykolisaostuksessa käytettävän polyetyleeniglykoliliuoksen alhaisin fosfatidyylitanolivasta-ainetta saostava konsentraatio?

## 5 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Opinnäytetyön laboratoriotyövaihe suoritettiin professori Markku Savolaisen tutkimusryhmän laboratoriotiloissa huhtikuussa 2010. Ohjaajanamme laboratoriotyössä toimi tutkimusryhmän tutkija, FM Antti Nissinen. Tutkimusryhmä tarjosi käyttöömmme opinnäytetyön tekemiseen tarvittavat laitteet ja välineet ja kustansi laboratoriotyössä käyttämämme tarvikkeet. Laboratoriotyöhön kuului monoklonaalisia vasta-aineita tuottavien 2B1- ja 2E9-solulinjojen viljely ja muodostuneiden vasta-aineiden puhdistus ioninvaihtokromatografialla ja testaus ELISA-menetelmillä. Lisäksi vasta-aineiden polyetyleeniglykolisaostusmenetelmään määritettiin alhaisinta fosfatidyylietanolivasta-aineita saostavaa polyetyleeniglykolikonsentraatiota.

Professori Markku Savolaisen tutkimusryhmässä on kehitetty hybridoomasolulinjoja, jotka tuottavat monoklonaalisia IgM-luokan vasta-aineita fosfatidyylietanolia vastaan. Tutkimusryhmä on valmistanut hybridoomasolulinjoja fuusioimalla kaupallisia hiiren myelooma- eli syöpäsolulinjan soluja B3X63Ag8.653 (ATCC eli American Type Culture Collection) ja fosfatidyylietanolivasta-aineita tuottavia hiiren lymfosyyttejä (Nissinen, Mäkelä, Vuoristo, Liisanantti, Hannuksela, Hörkkö & Savolainen 2008, 921.) Käytimme tutkimuksessamme kahta tutkimusryhmässä kehitettyä solulinjaa (1A12-1D7-2B1 ja 2F7-3A9-2E9), joista tässä työssä käytetään vain nimien loppuosaa (2B1 ja 2E9). Tutkimusryhmä päätti itse tutkittavien solulinjojen valinnasta. Tutkimuksessamme aineistona käytimme näiden kahden solulinjan tuottamia vasta-aineita.

Aineisto kerättiin viljelemällä kahta monoklonaalisia vasta-aineita tuottavaa hybridoomasolulinjaa kuuden vuorokauden ajan kahdessa eri kasvatusliuksessa. Koska solulinjat tuottavat vasta-aineita kasvatusliukseen, saatiin tutkimusaineisto kerättyä pipetoimalla kasvatusliuosta soluviljelmästä. Kasvatusliuosnäytteitä kerättiin talteen päivittäin koko kasvatuksen ajan ja viljelyn loputtua koko kasvatusliuosmäärä kerättiin talteen.

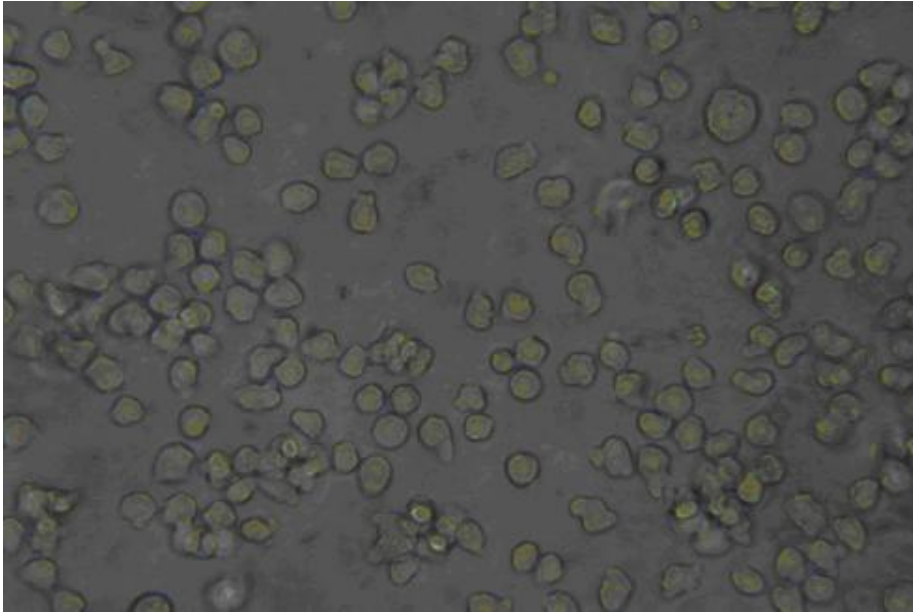
## 5.1 Hybridomasolujen viljely

Opinnäytetyömme soluviljelyosuuden tavoitteena oli viljellä soluja aseptisen työskentelyn periaatteiden mukaisesti sekä tuottaa tutkimusryhmän kehittämällä 2B1- ja 2E9-solulinjoilla monoklonaalisia vasta-aineita. Vasta-ainenäytteitä kerättiin kasvatusliuoksista soluviljelytyöskentelyn eri vaiheissa ja niitä käytettiin tutkimustehtävien suorittamisessa. Kuviossa 7 on havainnollistettu soluviljelytyöskentelyn vaiheita, kerättyjä vasta-ainenäytteitä sekä näytteiden käyttökohteita.

Aseptiset työskentelytavat soluviljelytyössä ovat kokoelma erilaisia toimintatapoja, joilla pyritään estämään soluviljelmien kontaminaatioita. Soluviljelylaboratorio pyritään pitämään erityisen puhtaana ja kulku alueella on yleensä rajoitettua. (Freshney 2005, 73.) Otimme huomioon soluviljelytilan puhtausvaatimukset käyttämällä soluviljelytilassa erillistä työvaatetusta ja huolehtimalla henkilökohtaisesta hygieniasta.

Kontaminaatioiden estämiseksi soluviljelyliuoksiin lisätään usein erilaisia antibiootteja. Siitä huolimatta soluviljelytyöskentelyn suurimpia ongelmia ovat soluviljelmien erilaiset kontaminaatiot, joita aiheuttavat erilaiset mikrobit, kuten bakteerit, sienet, hiivat, homeet, virukset ja mykoplasmat. Mikrobeja voi kulkeutua soluviljelmään esimerkiksi ilman, työntekijän, soluviljelyssä tarvittavien liuosten tai työvälineiden kautta. On tärkeää seurata soluviljelmän kuntoa ja viljelmissä tapahtuvia muutoksia jatkuvasti. Kontaminoituneet soluviljelmät yleensä tuhotaan, jotta muut samassa kasvatusliuoksessa olevat solut eivät kontaminoituisi. (Freshney 2005, 73.)

Merkkejä erilaisista kontaminaatioista ovat esimerkiksi kasvatusliuoksen samentuminen, sen päälle muodostuva kalvo tai pesäkkeet ja äkillinen pH:n muuttuminen. Useiden kasvatusliuosten sisältämän fenolipunan (pH-indikaattori) avulla pH:n muuttuminen nähdään liuoksen värin muuttumisena. Mikroskoopilla on mahdollista erottaa erilaisia kontaminaatioita soluviljelmässä. Bakteerikontaminaatioissa mikroskoopilla voi nähdä rakeista, liikkuvaa sakkaa viljelmän pohjalla ja sienikontaminaatioissa viljelmässä voi näkyä rihmastoja tai itiökasvoja. Hiivakontaminaatioissa voi mikroskoopilla nähdä erillisiä pyöreän- tai ovaalinmuotoisia soluja, joissa saattaa näkyä kuroutumassa olevia tytärsoluja. (Freshney 2005, 115, 307, 311–312.) Soluviljelmien kunto tarkistettiin silmämääräisesti ja stereomikroskoopilla soluviljelmien jakamisten ja näytteiden keräämisen yhteydessä päivittäin. Kuviossa 6 on mikroskooppinäkyvä viljelemämme 2B1-solulinjan soluista.



*KUVIO 6. Mikroskooppikuva 2B1-solulinjan soluista kasvatusalustalla*

Kontaminaatioiden välttämiseksi soluviljelmien käsittelyssä käytetään ainoastaan steriilejä tarvikkeita. Soluviljelmiä käsitellään tilassa, jossa ne eivät ole suorassa yhteydessä epästeriilin ympäristön kanssa eli useimmiten laminaarivirtauskaapissa. Laminaarivirtauskaapin työtilan pitäminen puhtaana ja hyvässä järjestyksessä on tärkeää. Työskennellessä vältetään äkkinäisiä liikkeitä, jotta laminaarivirtaus pysyisi tasaisena. Soluviljelyssä käyttämämme laminaarivirtauskaapin ilma- virtauksien tarkoituksena oli suojata soluviljelmää kontaminaatioilta ja työntekijää käsiteltävältä materiaailta. (Freshney 2005, 55–56, 73–75, 78.) Solujen käsittely laminaarivirtauskaapissa aloitettiin ja lopetettiin aina puhdistamalla kaapin pinnat ja tarvittavat välineet sekä käytettävät kertakäsineet 70 % etanolilla. Tarvittavat välineet aseteltiin kaappiin siten, että niiden käsittely oli helppoa ja tilaa työskentelyyn jäi riittävästi. Soluviljelyssä tarvittavia liuoksia pipetoitiin steriilien, yksittäispakattujen pipetinkärkien ja sähköisen pipettorin avulla. Yhtä pipetinkärkeä käytettiin vain yhdessä pipetoinnissa.

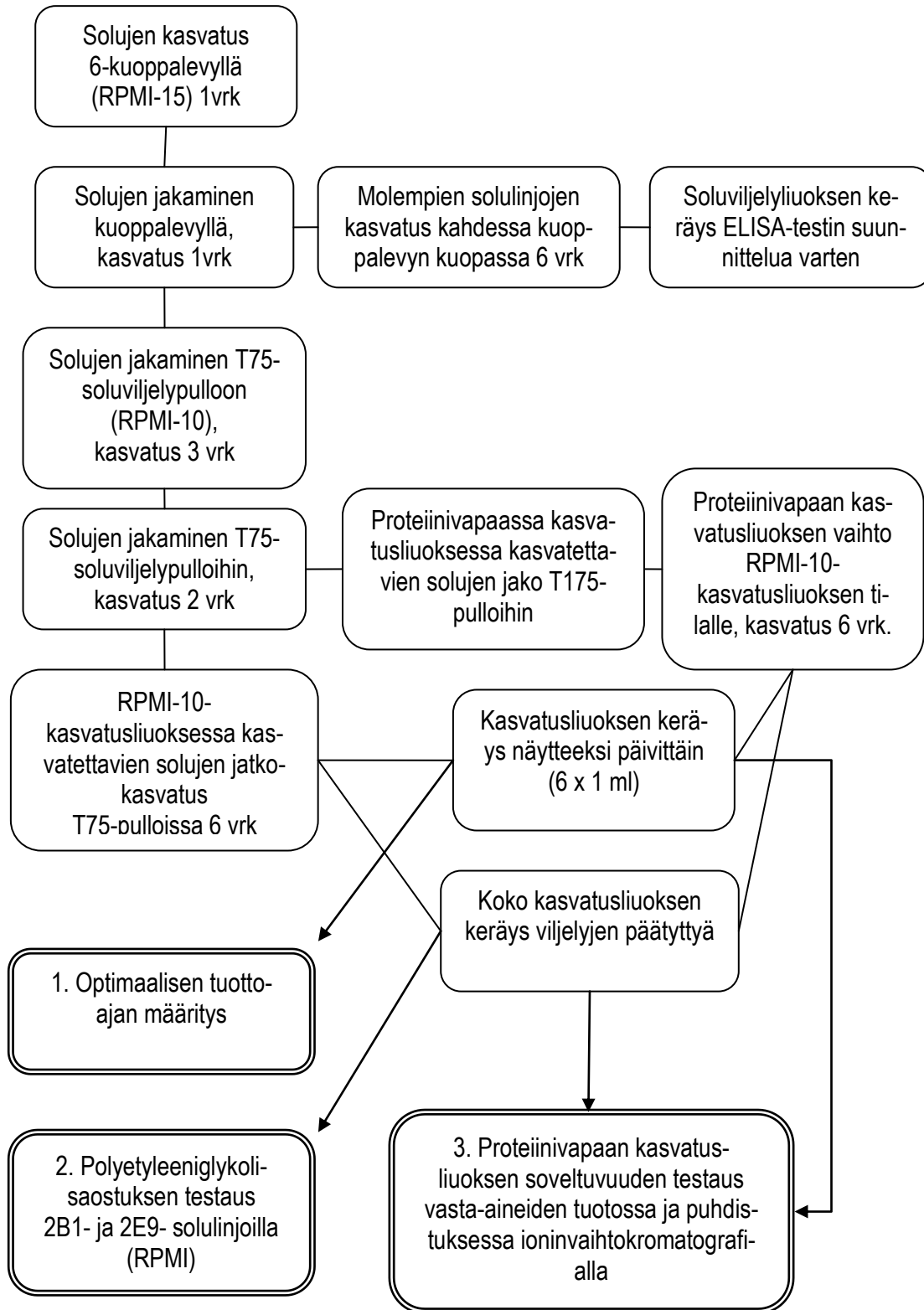
Työskenneltäessä usean erilaisen solulinjan kanssa on otettava huomioon, että solulinjan voi kontaminoida myös toisella solulinjalla. Opinnäytetyössä viljeltiin kahta monoklonaalisia vasta-aineita tuottavaa solulinjaa, joiden tuottamat vasta-aineet eroavat hieman toisistaan. Soluviljelmän kontaminointi toisen soluviljelmän soluilla johtaisi tilanteeseen, jossa olisi epävarmaa tuottaako soluviljelelmä vain yhdenlaista vasta-ainetta. Kontaminoituneiden solulinjojen tuottamia vasta-aineita ei olisi voitu käyttää tutkimuksessa. Soluviljelmiä käsiteltiin aseptisen työskentelyn peri-

aatteiden mukaisesti ja kontaminaatiot toisen solulinjan soluilla vältettiin käsittelemällä laminaari-virtauskaapissa vain yhtä solulinjaa kerrallaan. Erilaisiin kontaminaatioihin varauduttiin kuitenkin pitämällä ylimääräisiä soluviljelmiä kasvamassa koko laboratoriotyön osuuden ajan.

Soluja kasvatettiin tutkimuksen ajan soluviljelykaapissa, jonka olosuhteet oli vakioitu +37 °C:n lämpötilaan ja 5 %:n CO<sub>2</sub> (hiilidioksidi) -pitoisuuteen. Soluviljelmän kasvatuslämpötilana pidetään yleensä samaa lämpötilaa kuin eliössä, josta ne on otettu. Ihmisillä ja tasalämpöisillä eläimillä lämpötila on yleensä 37 °C. Solujen kasvatuskaapissa kasvatuspullojen korkkeja pidetään hie-man raollaan, jotta kaappiin lisättävä hiilidioksidi pääsee tasaamaan soluviljelmän pH:ta. (Freshney 2005, 117–118.)

Erilaisia solujen kasvatusliuoksia on soluviljelyn historian aikana kehitelty paljon. Nykypäivänä on tarjolla erilaisiin tarkoituksiin ja erilaisille solulinjoille optimoituja kasvatusliuoksia, kuten tutkimusryhmän käyttämä RPMI-kasvatusliuos. Erilaisilla supplementeilla eli kasvatusliukseen rikastamistarkoituksessa lisättävillä aineilla on mahdollista laajentaa kasvatusliuoksen käyttöaluetta erilaisiin solulinjoihin. RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) on paljon käytetty kasvatusliuos hybridoomasolujen kasvatuksessa. Kasvatusliuoksen koostumusta rikastetaan lisäämällä siihen naudan sikiön seerumia (FBS eli Fetal Bovine Serum), joka sisältää mm. kasvutekijöitä, mineraaleja, lipidejä ja hormoneja. Kasvatusliuoksia on myös kehitetty helpottamaan solujen tuottamien molekyylien puhdistamista kasvatusliuoksista. Tällaisia kasvatusliuoksia ovat esimerkiksi seerumittomat ja proteiinivapaat kasvatusliukset. (Freshney 2005, 115, 123; Sigma-Aldrich, RPMI-1640 Medium, hakupäivä 23.5.2010.)

Soluviljely aloitettiin RPMI-kasvatusliuoksessa, jossa oli 15 % FBS:a. Normaalista korkeampaa FBS-pitoisuutta käytetään kasvatusliuoksessa tarjoamaan enemmän ravinteita sulatuksesta toipuville soluille. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen tilalle vaihdettiin 10 % FBS:ää sisältävä kasvatusliuos, joka tarjoaa normaalitilassa riittävästi ravinteita kasvatettaville soluille. Tässä vaiheessa kasvatettiin riittävää solupopulaatiota kasvatusalustoille ennen vasta-aineiden tuottovaihetta. Solut kuluttavat kasvaessaan ja jakaantuessaan kasvatusliuoksen ravinteita, joten tilalle vaihdettiin uutta kasvatusliuosta tasaisin väliajoin ravinteiden tasaiseksi tarjoamiseksi (Freshney 2005, 205). Vasta-aineiden tuottovaiheessa solujen kasvatusliuosta ei enää vaihdettu, jotta päästiin tutkimaan vasta-aineiden määrää.



KUVIO 7. Soluviljelytyöskentelyn vaiheet ja tuotettujen vasta-aineiden käyttökohteet

## 5.2 Optimaalisen fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuottoajan määrittäminen

Opinnäytetyön ensimmäisenä tutkimustehtävänä tutkittiin solulinjojen optimaalista vasta-aineiden tuottoaikaa. Optimaalisen tuottoajan määrittämisellä pyrittiin saamaan tietoa siitä, missä vaiheessa viljelyä vasta-aineiden tuotanto saavuttaa huippunsa. Tuottoaikaa määritettiin viljelemällä soluja yhteensä kuusi vuorokautta. Yli kuuden vuorokauden kasvatuksen jälkeen solujen tuottamat vasta-aineet alkavat hiljalleen hajota kasvatusliuoksessa, minkä vuoksi ei ollut perusteltua kokeilla kasvatusa pidempään (Nissinen 3.9.2010, suullinen tiedonanto).

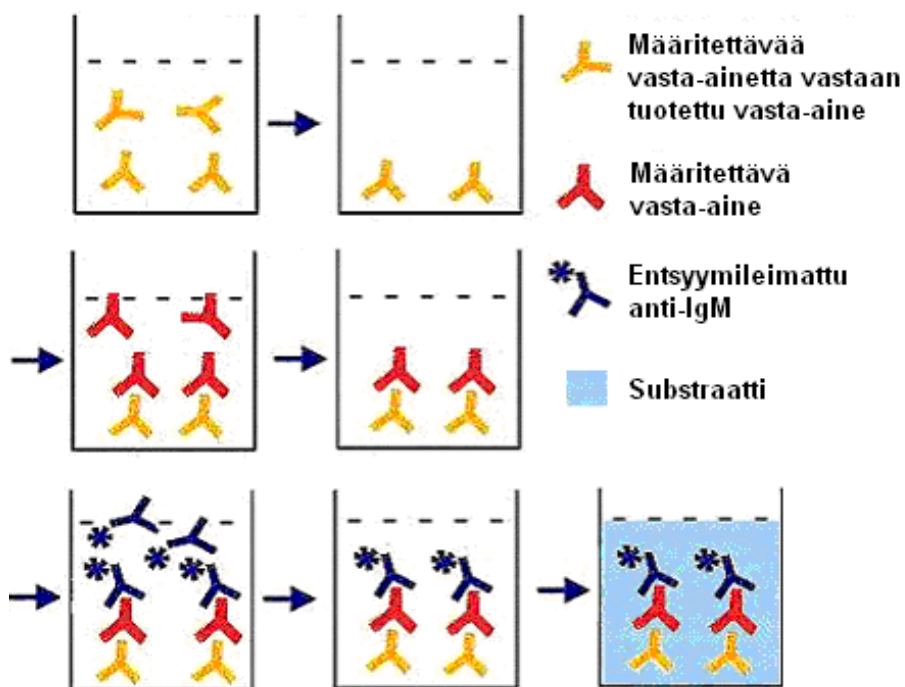
Vasta-aineiden tuotto tämän tutkimustehtävän osalta suoritettiin RPMI-kasvatusliuoksessa. Kun solut olivat jakaantuneet tarpeeksi, vaihdettiin tilalle uusi kasvatusliuos. Mittauksissa käytetyksi nollanäytteeksi otettiin kasvatusliuosta heti vaihdon jälkeen, jolloin vasta-ainepitoisuudet olivat alhaisimmillaan. Tämän jälkeen kasvatusliuosta ei enää vaihdettu vasta-aineiden määrän selvittämiseksi kuuden vuorokauden ajalta. Loput näytteet kerättiin päivittäin kuuden vuorokauden aikana. Solut erotettiin näytteistä sentrifugoimalla hitaalla nopeudella solujen hajoamisen välttämiseksi. Kerättyjä kasvatusliuosnäytteitä säilytettiin jääkaappilämpötilassa.

Optimaalista tuottoaikaa määritettiin mittaamalla solujen tuottamien vasta-aineiden määrää ELISA-menetelmällä. ELISA on yleisesti immunologian tutkimuksissa käytetty menetelmä, joka perustuu vasta-aineiden ja antigeenien spesifiseen sitoutumiseen keskenään. ELISA:ssa käytetään hyväksi entsyymileimattuja vasta-aineita, joiden avulla tutkittavan vasta-aineen määrä on mahdollista määrittää. (Janeway ym. 2005, 689.) Kasvatusliuosnäytteistä tehtiin mittauksia varten kaksi eri laimennosta (1:250 ja 1:500), joiden tuloksia vertailemalla voitiin varmistaa tulosten luotettavuus.

Vasta-aineiden ELISA-testauksen suunnittelua varten molempia solulinjoja kasvatettiin aluksi pienessä mittakaavassa kuuden päivän ajan, jotta saatiin suuntaa-antavaa tietoa vasta-aineiden määrästä. Esitestaus suoritettiin, jotta pystyttiin suunnittelemaan ELISA-testin mittausskaalaa vasta-aineiden optimaalisen tuottoajan testaukseen. Standardeina testissä käytettiin tutkimusryhmässä ioninvaihtokromatografialla puhdistettuja 2B1- ja 2E9-solulinjojen vasta-aineita. Esitestauksen työohjeet löytyvät liitteestä 1.

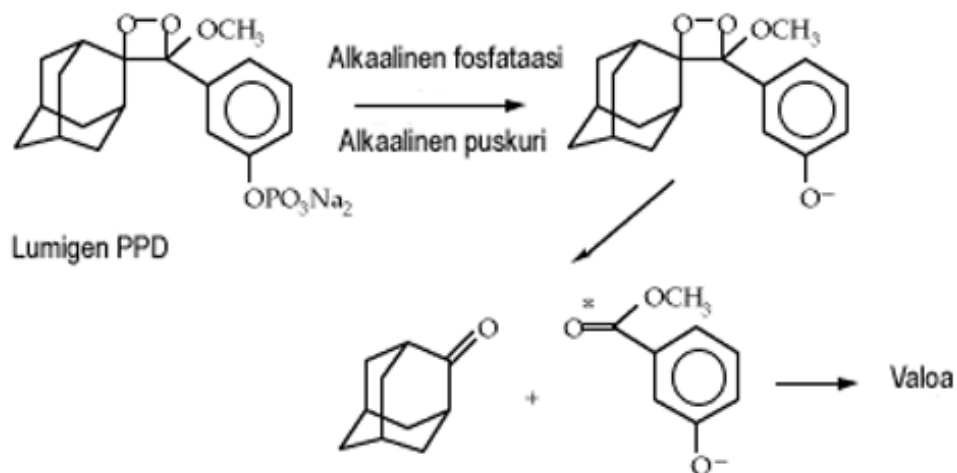


Primäärivasta-aineena kuoppalevyn kuoppien pohjalla käytettiin anti-mouse-IgM-vasta-ainetta (Sigma-Aldrich), joka on tuotettu vuohessa hiiren IgM-vasta-aineita vastaan. Kuoppiin lisättiin kuuden vuorokauden aikana kerätyt kasvatusliuosnäytteet. Kasvatusliuosnäytteiden sisältämien fosfatidyylietanolivasta-aineiden annettiin sitoutua kuopan pohjalle kiinnitettyyn vasta-aineeseen. Sitoutuneen vasta-aineen määrä saatiin mitattua entsyymileimatun sekundäärivasta-aineen ja kemiluminesenssireaktion avulla. Entsyymileimattuna sekundäärivasta-aineena käytettiin anti-mouse-IgM-ALP:a (Sigma-Aldrich), joka on rakenteeltaan primäärivasta-aineen kaltainen, mutta siihen on liitetty mittauksen mahdollistamiseksi alkaalinen fosfataasi (ALP). Käytetyn ELISA-menetelmän työohje löytyy liitteestä 2 ja menetelmää havainnollistetaan kuviossa 8.



KUVIO 8. ELISA-menetelmä IgM-vasta-aineiden pitoisuuden mittauksessa (mukaillen Decker 2006, hakupäivä 8.1.2010).

Kaikkien tutkimuksessa suoritettujen ELISA-testien kemiluminesenssireaktioissa käytettiin LumiPhos 530 -reagenssia (Lumigen Inc.). LumiPhos sisältää Lumigen PPD-yhdistettä (4-methoxy-4-(3-phosphatephenyl)spiro[1,2-dioxetane-3,2'-adamantane] disodium salt), jonka avulla voitiin mitata sekundäärivasta-aineeseen liitetyn ALP:n määrää (alkaalinen fosfataasi). Kuviossa 9 on kuvattu Lumigen PPD:llä aikaan saatava kemiluminesenssireaktio, jossa leima muokkaa substraattia siten, että se tuottaa valoa. (Lumigen Inc., Lumigen PPD, hakupäivä 15.5.2010.)



KUVIO 9. Kemiluminesenssireaktion kulku (mukaillen Lumigen Inc., Lumigen PPD, hakupäivä 15.5.2010).

### 5.3 EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuuden testaus vasta-aineiden tuotossa ja puhdistamisessa

Toisena tutkimustehtävänä oli testata proteiinivapaan EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuutta tuottaessa vasta-aineita 2B1- ja 2E9-solulinjoilla. Tutkimusryhmän tavoitteena on löytää vasta-aineiden tuottovaiheeseen mahdollisimman vähän proteiineja sisältävä kasvatusliuos, sillä se helpottaisi vasta-aineiden puhdistamista kasvatusliuoksista ioninvaihtokromatografialla. Soveltuvuutta testattiin viljelemällä solulinjoja proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa ja puhdistamalla solulinjojen tuottamia vasta-aineita ioninvaihtokromatografialla.

EX-CELL® CD Hybridoma Medium (SAFC Biosciences) on kehitetty erityisesti vasta-aineiden tuottamiseen soluviljelyolosuhteissa, ja ainoa sen sisältämä proteiini on rekombinantti-insuliini. Sen lisäksi kasvatusliuos sisältää epäorgaanisia suoloja, välttämättömiä ja ei-välttämättömiä aminohappoja, vitamiineja, rasvahappoja, natriumbikarbonaattia ja HEPES-puskuria (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Proteiinivapaan kasvatusliuoksen käytön etuna on vasta-aineiden puhdistamisen helpottuminen, koska tällöin päästään erottelemaan kasvatusliuoksesta insuliinin lisäksi vain solujen tuottamia proteiineja. Kasvatusliuos ei sisällä eläinperäisiä komponentteja, mikä mahdollistaa liuoksen tasaisen laadun. (Sigma-Aldrich, EX-CELL® CD Hybridoma Medium, Chemically Defined, hakupäivä 23.9.2010; Sigma-Aldrich, Product information: Hybridoma medium, hakupäivä 15.9.2010.)

2B1- ja 2E9-solulinjoja kasvatettiin rinnakkain proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa yhteensä kuusi vuorokautta kasvatusliuoksen soveltuvuuden testaamiseksi fosfatidyylietanolivasta-aineiden tuotannossa. Soluviljelmistä kerättiin päiväkohtaisesti kasvatusliuosta näytteiksi, joista testattiin vasta-ainepitoisuuden kohoamista. Mittauksissa käytetyksi nollanäytteeksi otettiin kasvatusliuosta heti kasvatuksen alussa, jolloin vasta-ainepitoisuudet olivat alhaisimmillaan. Vasta-ainepitoisuuksien mittaukset suoritettiin ELISA-menetelmällä, jonka työohje löytyy liitteestä 2. Mittaukset suoritettiin kahdella eri näytelaimennoksella (1:250 ja 1:500), joiden tuloksia vertailemalla voitiin varmistaa tulosten luotettavuus. Kuuden päivän kasvatuksen jälkeen soluviljelmien kasvatusliuokset kerättiin talteen ja niistä testattiin vasta-aineiden puhdistusta ioninvaihtokromatografialla.

### **5.3.1 Vasta-aineiden puhdistus ioninvaihtokromatografialla**

Proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa kasvatettujen 2B1- ja 2E9-solulinjojen tuottamien vasta-aineiden puhdistamista testattiin ioninvaihtokromatografialla. Ioninvaihtokromatografiassa käytetään kiinteää faasia eli ainetta, joka sisältää positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita yhdisteitä. Kiinteä faasi on yleensä pakattu pylvääseen, jonka läpi näyte ajetaan liikkuvassa faasissa eli sopivassa puskurissa. Näytteen proteiinit sitoutuvat pylvään sisältämien vastakkaisen varauksen omaavien yhdisteiden kanssa olosuhteissa, joissa proteiinien nettovaraus on nolla (isoelektrinen piste). Kun pylvään läpi lasketaan pH-arvoltaan tai suolakonsentraatioltaan muunneltu puskuri, ionisidokset hajoavat ja näyte eluoituu eli huuhtoutuu pylväästä pois. (Yamamoto, Nakanishi & Matsuno 1988, 4-6.)

Vasta-aineiden puhdistuksessa käytettiin Amersham Pharmacia Resource Q-ioninvaihtopylvästä. Pylvääseen on pakattu SOURCE™ 15 Q -nimistä materiaalia, joka on kiinnitetty 15 µm:n kokoisista partikkeleista koostuvaan tiiviiseen polystyreeniä ja divinyylibentseeniä sisältävään väliaineeseen. Pylväs kestää korkeimmillaan 15 bar:n painetta ja 10 ml/min virtausta lävitseen. Tutkimuksessamme tehdyissä kromatografia-ajoissa ei ylitetty näitä raja-arvoja pylvään toimintakyvyn takaamiseksi. (Amersham Biosciences, RESOURCE Q, 1 ml, hakupäivä 24.5.2010.)

Kromatografialaitteistona käytettiin Pharmacia Biotec:n ÄKTA Exploreria. ÄKTA:n ajo-ohjelmat suunnitellaan tietokonepohjaisella UNICORN-ohjelmalla. Ohjelma piirtää ajosta reaaliaikaisesti kromatogrammin, jossa näkyy laitteen tekemien mittausten tiedot koko ajosta. Laitteiston sisällä

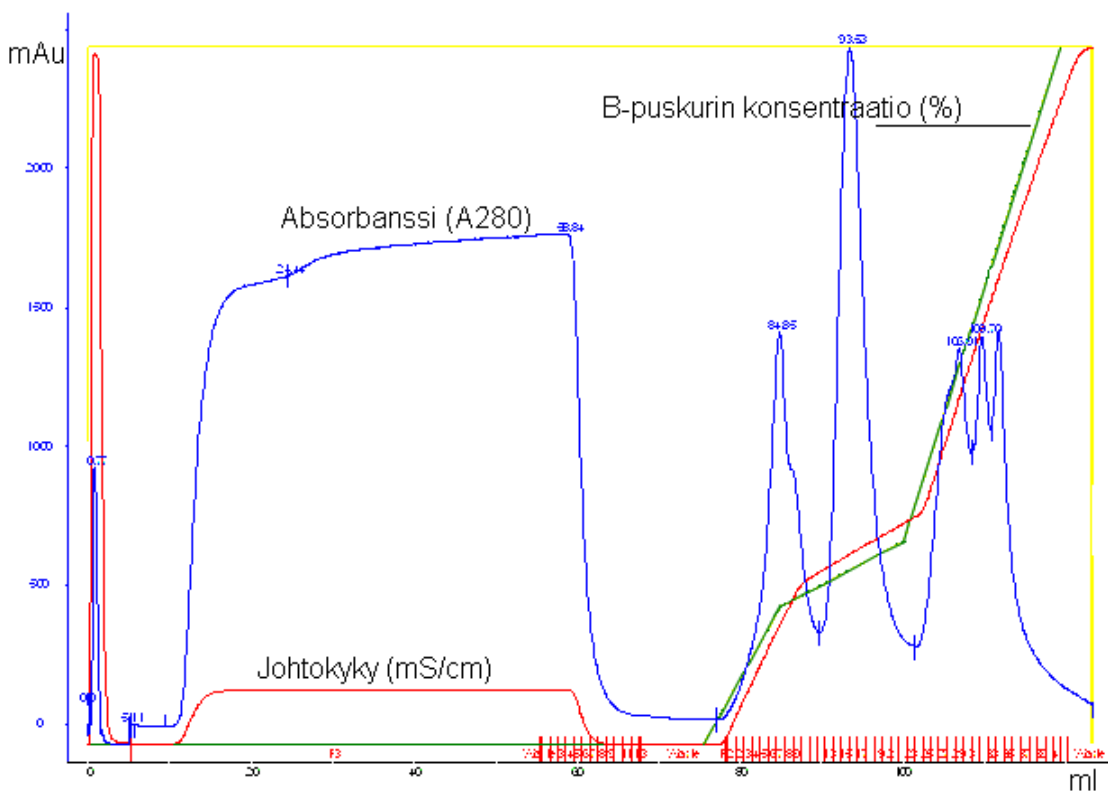
on spektrofotometri, joka mittaa pylvään läpi kulkeutuneen nesteen absorbanssia halutulla aallonpituudella ja ilmaisee mittauksen tulokset mAU:na (milli absorbance unit). Spektrofotometri säädettiin mittaamaan absorbanssia aallonpituudella 280 nm, jolloin se mittaa proteiinien eli tässä tapauksessa IgM-vasta-aineiden pitoisuutta. Laitte mittaa myös ajettavan näytteen johtokykyä (conductance, mS/cm) ja ajon aikana vallitsevaa painetta (bar). (GE Amersham Pharmacia, ÄKTA Explorer 100 Chromatograph, hakupäivä 24.5.2010.)

ÄKTA:lla suoritettavaa puhdistusta varten valmistettiin proteiineja sitovana puskurina toimiva puskuri A (20 mM Tris-HCl) ja proteiineja eluoivana puskurina toimiva puskuri B (20 mM Tris-HCl/1M NaCl). Kaikki käytetyt liuokset ilmastettiin alipaineen avulla, jotta pylvääseen ei kulkeutuisi ilmaa. Liuokset ja näytteet suodatettiin epäpuhtauksien poistamiseksi 0,22 µm:n suodattimen läpi ennen ÄKTA:lla ajamista.

Ennen näytteiden ajojen aloittamista ÄKTA:n linjastoista huuhdottiin steriilillä vedellä linjastoissa käyttötaujan ajan ollut 20-prosenttinen etanoli pois. Etanolia käytetään laitteistossa käyttötaukojen aikana mikrobikasvustojen ehkäisemiseksi. Vesihuuhtelun avulla laitteistosta saatiin myös poistettua mahdolliset ilmakuplat. Pylväs stabiloitiin huuhtelemalla se ensin puskuri A:lla. Toinen huuhtelu suoritettiin puskuri B:llä, jonka voimakas suolapitoisuus regeneroi eli elvyttää pylvääseen pakatun aineksen. Tämän käsittelyn avulla pylvään puhdistuskykyä parannettiin ennen näytteiden ajojen aloittamista. Lisäksi puskuri eluoi korkean suolakonsentraation vuoksi pylvääseen aiemmin jääneitä proteiineja pois. (Amersham Biosciences, RESOURCE Q, 1 ml, hakupäivä 24.5.2010.) Huuhteluiden aikana laitteiston johtokykyä, paineita ja absorbanssilukemia seurattiin tarkasti, sillä niiden vaihtelun tasaannuttua voitiin olettaa pylvään olevan puhdas. Lopuksi pylvään sisältämä materiaali tasapainotettiin ajamalla sen lävitse vielä puskuria A.

Proteiinivapaat vasta-aineiden kasvatusliuokset ajettiin pylvään läpi ja näytteiden välissä laitteisto huuhdeltiin ajamalla sen läpi puskuria A. Vasta-aineiden puhdistus eli erottaminen kasvatusliuoksen sisältämistä muista komponenteista tehtiin kolmiosaisella gradienttiajolla. Gradienttiajon aikana laitteisto nosti hiljalleen läpi ajettavan puskuri B:n pitoisuutta tietokoneelle ohjelmoidun ohjelman mukaisesti. Ensimmäisessä vaiheessa puskuri B:tä ajettiin pylvään läpi kymmenen pylvään tilavuuden verran siten, että puskuri B:n pitoisuus ajoliuoksessa nousi 20 %:iin. Toisessa vaiheessa puskurin pitoisuus nostettiin viidentoista pylvään tilavuuden aikana 29 %:iin ja kolmannessa vaiheessa kahden pylvään tilavuuden aikana 100 %:iin.

Gradienttiajon aikana fraktionkerääjä keräsi vasta-aineita pylvästä eluoineen puskuri B:n 1 ml:n fraktioihin. Laitteisto ohjelmoitiin aloittamaan fraktioiden kerääminen laitteen mittaamien absorbanssien ollessa sellaisella tasolla, että pylvästä voitiin olettaa tulevan ulos vasta-aineita. Ohjelma kirjasi kromatogrammiin, missä vaiheessa fraktioiden keräys oli alkanut ja kromatogrammin tietojen avulla voitiin fraktionkerääjältä poimia näytteet haluttujen piikkien kohdalta. Kuviossa 10 on esimerkki kromatogrammista 2B1-solulinjan kasvatusliuoksen ÄKTA-ajosta. Ensimmäinen leveä piikki piirtyi kromatogrammille, kun näytteen pylväseen sitoutumattomat komponentit ohittivat pylvään jälkeen olevan absorbanssinmittauspisteen. Kapeammat piikit piirtyivät kromatogrammille näytteen eluoinnin aikana.



KUVIO 10. Kromatogrammi 2B1-kasvatusliuoksen ÄKTA -ajosta. mAu = milli absorbance unit. Absorbanssikäyrä kuvaa pylvään läpi ajetun puskurin proteiinimäärää. Ensimmäisen leveän piikin kohdalla näyte ajettiin laitteeseen. Kapeammat piikit kuvaavat näytteen eluotumista ulos pylvästä. Puskuri B:n konsentraatiota kuvaava käyrä ilmaisee gradienttiajon vaiheita.

Ioninvaihtokromatografiassa vasta-aineiden sitoutuminen perustuu liuoksen optimaaliseen happamuusasteeseen (pH) ja ionivahvuuteen. Ensimmäisen proteiinivapaan 2B1-solulinjan kasvatusliuoksen ajon aikana ilmeni, että testaamassamme proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa suolakonsentraatio oli sellaisenaan liian korkea ajettavaksi tällä menetelmällä. Tämän vuoksi vasta-aineet eivät sitoutuneet odotetusti, joten seuraavia ajoja varten näytteistä tehtiin 50-prosenttinen laimennos puskuriin A.

Ioninvaihtokromatografialla puhdistetuista näytteistä valittiin ELISA-menetelmällä tutkittaviksi fraktiot niiden kromatogrammin piikkien alueelta, joissa IgM-vasta-aineiden oletettiin olevan. Ohjajamme FM, tutkija Antti Nissinen arvioi, että kromatogrammin ensimmäisen tai toisen piikin kohdalla näytteen syötön jälkeen on IgM-vasta-aineita (Nissinen 14.4.2010, suullinen tiedonanto). ELISA-menetelmän avulla varmistettiin mikä kromatogrammin piikeistä sisälsi IgM-vasta-aineita ja kyseiset fraktiot yhdistettiin näytekohtaisesti. Mittaustulosten varmistamiseksi näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista määrittystä. ELISA-menetelmän työohje löytyy liitteestä 2.

Varsinaisten puhdistettujen näytteiden lisäksi talteen kerättiin läpimenofraktiot eli näytteen sisältämät komponentit, jotka eivät sitoutuneet pylvääseen. Mittaamalla läpimenofraktioiden sisältämien proteiinien määrä voitiin varmistaa, ettei vasta-aineita jäänyt sitoutumatta pylvääseen. Proteiinit mittaamme käyttämällä DC Protein Assay -reagenssipakettia (BioRad).

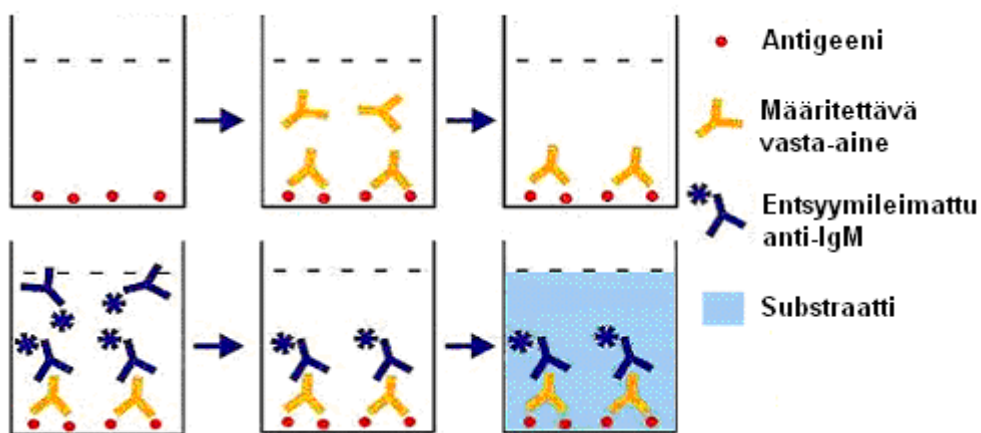
### **5.3.2 Vasta-aineiden toimivuuden testaus ELISA-menetelmällä**

Proteiinivapaista kasvatusliuoksista ioninvaihtokromatografialla puhdistettujen vasta-aineiden toimivuutta eli kykyä sitoutua antigeeniinsä testattiin ELISA-menetelmällä, jossa antigeeninä käytettiin fosfatidylietanolia. Näin voitiin varmistaa, että tuotettu vasta-aine edelleen sitoutuu fosfatidylietanoliin eli molekyyliin, jota vastaan vasta-aineet oli hiiressä tuotettu, eikä esimerkiksi puhdistaminen ioninvaihtokromatografialla ole muuttanut vasta-aineiden kykyä sitoutua.

Sitoutumiskykyä mittaavassa testissä käytettiin puhdistamatonta 1:10 laimennettua kasvatusliuosta, 1:10 laimennettua läpimenofraktiota ja puhdistetuista fraktioista valmistettua 5 µg/ml vastaainetta sisältävää näytettä. Puhdistettujen fraktioiden sisältämien vasta-aineiden konsentraatio arvioitiin mittaamalla niiden sisältämien proteiinien pitoisuus DC Protein Assay -reagenssipakettia käyttäen. 5 µg/ml on riittävän korkea konsentraatio antamaan korkeat signaalit mittauksessa, mi-

käli se todellisuudessa sisältää tutkittavaa fosfatidylietanolivasta-ainetta (Nissinen 14.4.2010, suullinen tiedonanto).

Vasta-aineiden sitoutumiskykyä mittaavassa ELISA-menetelmässä käytettiin fosfatidylietanolivesikkeleitä (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol (sodium salt)) eli lipidimuotoisia fosfatidylietanolimolekyylejä, joita säilytetään kloroformiliuoksessa (Avanti polar lipids, 18:1 Phosphatidylethanol, hakupäivä 24.9.2010). Fosfatidylietanolivesikkelit kuivattiin typpivirran avulla puhtaan eppendorf-putken seinämille, josta ne liuotettiin PBS-puskuriin. Liuoksen fosfatidylietanolivesikkelit kiinnitettiin gelatiinilla päällystettyjen 96-kuoppalevyjen kuoppien pohjalle, johon molekyylit tarttuivat. Ioninvaihtokromatografialla puhdistetut näytteet lisättiin kuoppalevylle ja vasta-aineiden annettiin sitoutua fosfatidylietanolivesikkeleihin. Mittaustulosten varmistamiseksi näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista määrittystä. Kuoppalevylle lisättiin entsyymileiman sisältävä sekundääri-vasta-aine. Sitoutuneen vasta-aineen määrä saatiin mitattua kemiluminesenssireaktion avulla. Kuviossa 11 on kuvattuna käyttämämme ELISA-menetelmä. Menetelmän työohje löytyy liitteestä 3.



KUVIO 11. ELISA-menetelmä vasta-aineiden pitoisuuden ja sitoutumiskyvyn määrittämisessä (mukailen Decker 2006, hakupäivä 8.1.2010).

#### 5.4 Alhaisimman fosfatidylietanolivasta-aineita saostavan polyetyleeniglykolikonsentraation määrittäminen

Kolmantena tutkimustehtävänä oli selvittää alhaisin fosfatidylietanolivasta-aineita tehokkaasti saostava polyetyleeniglykolikonsentraatio. Testaus suoritettiin 2B1- ja 2E9-solulinjojen RPMI-kasvatusliuokseen tuottamalla vasta-aineilla. Testasimme polyetyleeniglykolisaostusta suoraan kasvatusliuoksista eri polyetyleeniglykolipitoisuuksilla välillä 1–10 % selvittääksemme, mikä on alhaisin fosfatidylietanolivasta-aineita tehokkaasti saostava pitoisuus.

Polyetyleeniglykolisaostus on yksinkertainen mutta epäspesifinen puhdistusmenetelmä, joka perustuu proteiinien erotteluun niiden liukoisuuden perusteella (Fahie-Wilson & Halsall 2008, 233). Polyetyleeniglykolisaostus toimii hyvin IgM-luokan vasta-aineilla, ja se on melko hellävarainen menetelmä, joka aiheuttaa vain vähäistä vasta-aineiden denaturaatiota eli proteiinirakenteen tuhoutumista (Page & Thorpe 2002, 991).

Polyetyleeniglykoliliuos muodostaa sakan näytteen sisältämien IgM-vasta-aineiden kanssa. Koska sakan liuottaminen vaatii enemmän työvaiheita, suoritettiin vasta-aineiden pitoisuuden mittausta näyteputkien sisältämästä supernatantista eli näytteen liukoisesta osasta sentrifugoinnin jälkeen. Siinä supernatantissa, jossa on vähiten vasta-ainetta, polyetyleeniglykolisaostus on onnistunut parhaiten ja kyseisen näytteen saostamiseen käytetty polyetyleeniglykolikonsentraatio (%) on ollut optimaalinen.

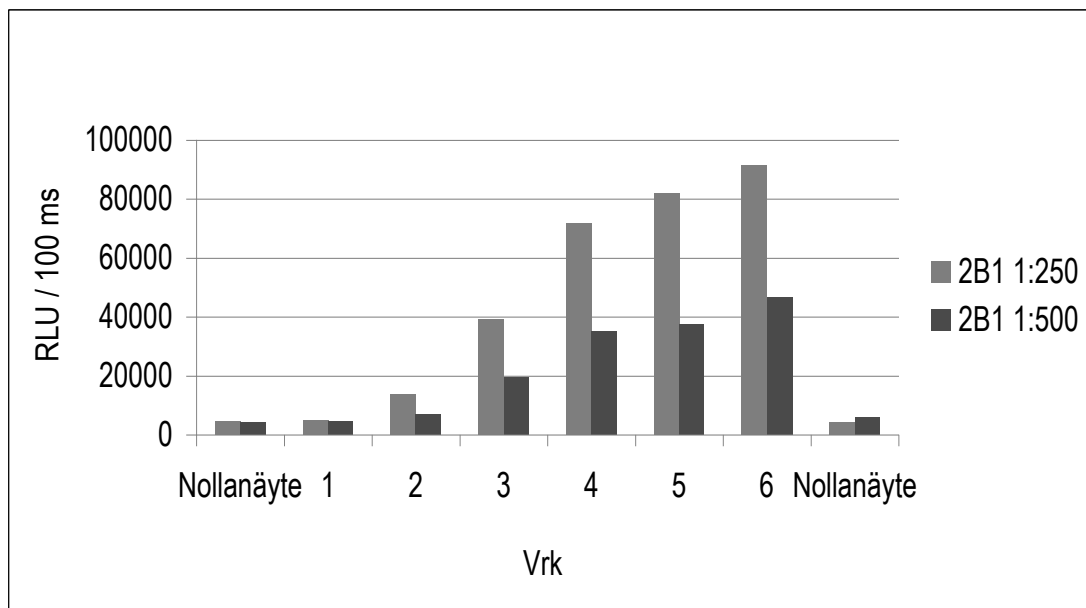
Jokaiseen saostettavaan näytteeseen käytettiin sama tilavuus fosfatidylietanolivasta-aineita sisältävää kasvatusliuosta. Polyetyleeniglykolin konsentraatiota vaihdeltiin laimentamalla sitä PBS-puskurilla. Lisäksi testissä käytettiin yhtä vertailunäytettä, johon polyetyleeniglykolia ei lisätty. Näytteet sentrifugoitiin ja supernatanteista tehtiin 1:250 ja 1:500 laimennokset gelatiiniin. Näytteiden todellisiksi laimennoksiksi saatiin 1:500 ja 1:1000 ottaen huomioon näytteiden laimeneminen saostusvaiheessa. Laimennoksista saatujen mittaustulosten avulla kyettiin arvioimaan tulosten luotettavuutta. Supernatantinäytteet pipetoitiin anti-mouse-IgM-vasta-aineella päällystetylle 96-kuoppalevylle, jonka jälkeen kuoppalevylle lisättiin sekundäärivasta-aine ja LumiPhos-reagenssi kemiluminesenssireaktion aikaansaamiseksi. Menetelmän työohje löytyy liitteestä 4.



## 6 TUTKIMUKSEN TULOKSET

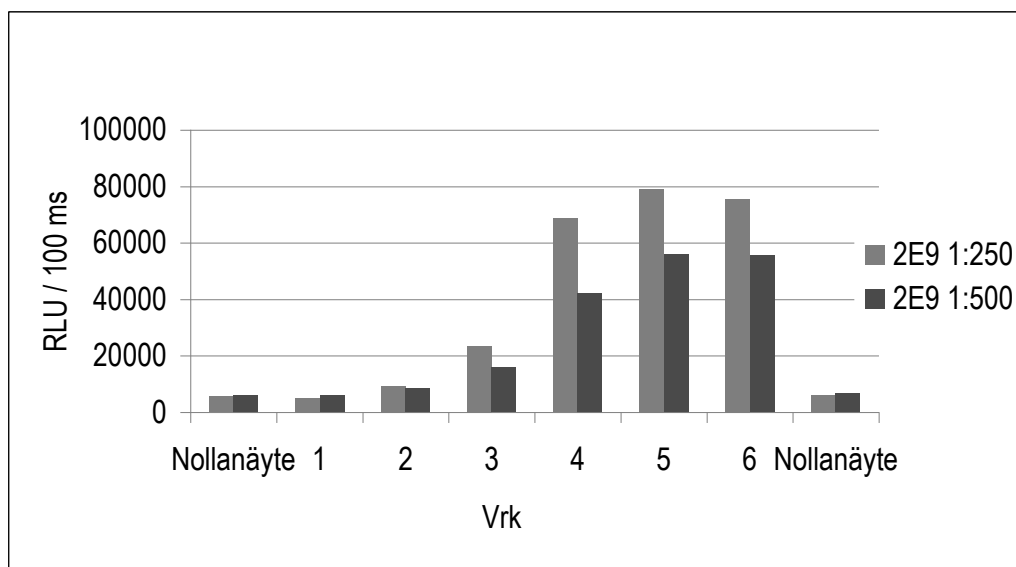
### 6.1 Optimaalisen tuottoajan määrittäminen

Ensimmäinen tutkimustehtävämme oli määrittää tutkimusryhmän kehittämien hybridomasolinjojen optimaalista fosfatidylietanolinivasta-aineiden tuottoaika. Tutkimme tuottoaika käytösämme olleilla 2B1- ja 2E9-solulinjoilla, joita kasvatimme yhteensä kuuden vuorokauden ajan RPMI-10-soluviljelyliuoksessa. Kasvatusliuosta kerättiin näytteeksi päivittäin, jonka jälkeen niiden sisältämien vasta-aineiden pitoisuudet mitattiin ELISA-menetelmällä. Mittaustulokset on esitetty alla olevissa kuvioissa 12 ja 13. Mittauksissa käytettiin yhtä nollanäytettä, jota lisättiin kuoppalevyille kahteen kohtaan. Kuvioissa 12 ja 13 esitettyjen nollanäytteiden mittaustulokset on siis saatu samasta näytteestä.



KUVIO 12. 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuuden määrittäminen ELISA-menetelmällä. RLU / 100 ms = Relative Light Unit / 100 milliseconds.

Kuviossa 12 ilmenevien mittaustulosten perusteella 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden määrä on maksimissaan kuudentena eli viimeisenä vuorokautena. Tulokset molemmista mittauksessa käytetyistä näytelaimennoksista ovat hyvin samankaltaiset ja suhteessa toisiinsa.



KUVIO 13. 2E9-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuuden määrittäminen ELISA-menetelmällä. RLU / 100 ms = Relative Light Unit / 100 milliseconds.

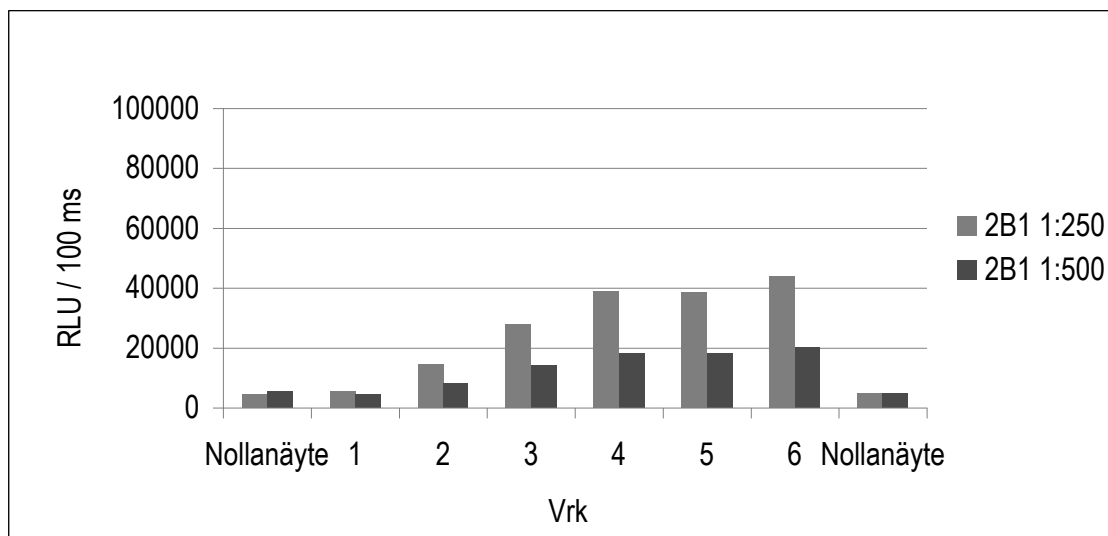
Kuviossa 13 esitettyjen tulosten perusteella 2E9-solulinjan maksimaalinen vasta-aineiden tuottoaika on selvästi viisi vuorokautta. Viiden vuorokauden kasvatuksen jälkeen vasta-aineiden pitoisuudet alkavat tulosten perusteella laskea. Molemmista näytelaimennoksista suoritettavat mittaukset antavat hyvin samankaltaiset tulokset, mutta ne eivät ole suhteessa toisiinsa. Ero saattaa johtua menetelmän epätarkkuudesta.

## 6.2 EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuus fosfatidyylietanoli-vasta-aineiden tuottamiseen ja puhdistamiseen

Toisena tutkimustehtävänäimme oli testata uuden EX-CELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuoksen soveltuvuutta vasta-aineiden tuottoon kahdella eri hybridomasolulinjalla. Kasvatimme solulinjoja yhteensä kuusi vuorokautta proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa, josta keräsimme päiväkohtaiset näytteet koko tuottoajalta. Tämän jälkeen testasimme vasta-aineiden puhdistamista kasvatusliuoksesta ioninvaihtokromatografian avulla ja varmistimme vasta-aineiden toimivuuden testaamalla niitä ELISA-menetelmällä.

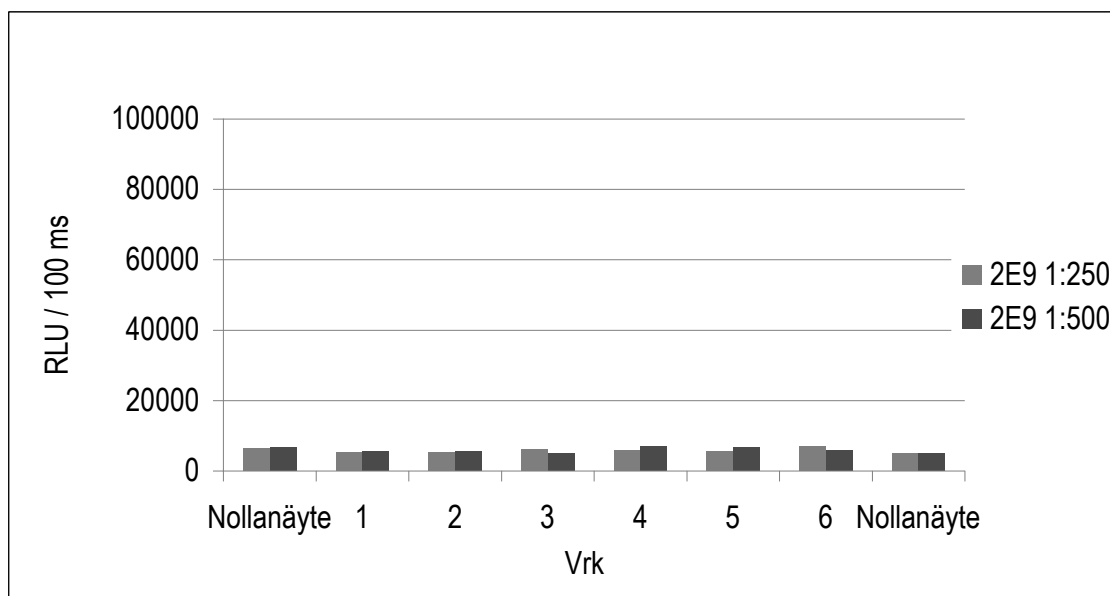
### 6.2.1 Vasta-aineiden tuottaminen

Kuvioissa 14 ja 15 on koottuna proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa kasvatettujen 2B1- ja 2E9-solulinjojen tuottamien vasta-aineiden määrät päiväkohtaisesti kerätyistä näytteistä. Mittaukset suoritettiin kahdella eri laimennoksella valmistetuista vasta-ainenäytteistä mittaustulosten varmistamiseksi. Molemmista kuvioista selviää, että laimennoksilla on saatu hyvin samankaltaiset tulokset. Mittauksissa käytettiin yhtä nollanäytettä, jota lisättiin kuoppalevyille kahteen kohtaan.



KUVIO 14. 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuus proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa ELISA-menetelmällä mitattuna. RLU / 100 ms = Relative Light Unit / 100 milliseconds.

Verrattaessa RPMI-10-kasvatusliuoksessa (kuvio 12) ja proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa kasvatettujen 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuuksia voidaan selvästi huomata, että proteiinivapaan kasvatusliuoksen sisältämien vasta-aineiden pitoisuus oli matala RPMI-10-kasvatusliuoksen pitoisuuksiin nähden. Ero näkyy selvästi tuottoajan viimeisten päivien osalta, jolloin proteiinivapaan kasvatusliuoksen vasta-ainepitoisuus jää jopa alle puoleen RPMI-kasvatusliuoksen pitoisuuksiin verrattaessa. 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuus proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa näyttää pysyvän suhteellisen tasaisena kasvatuksen neljännenä vuorokaudesta eteenpäin.



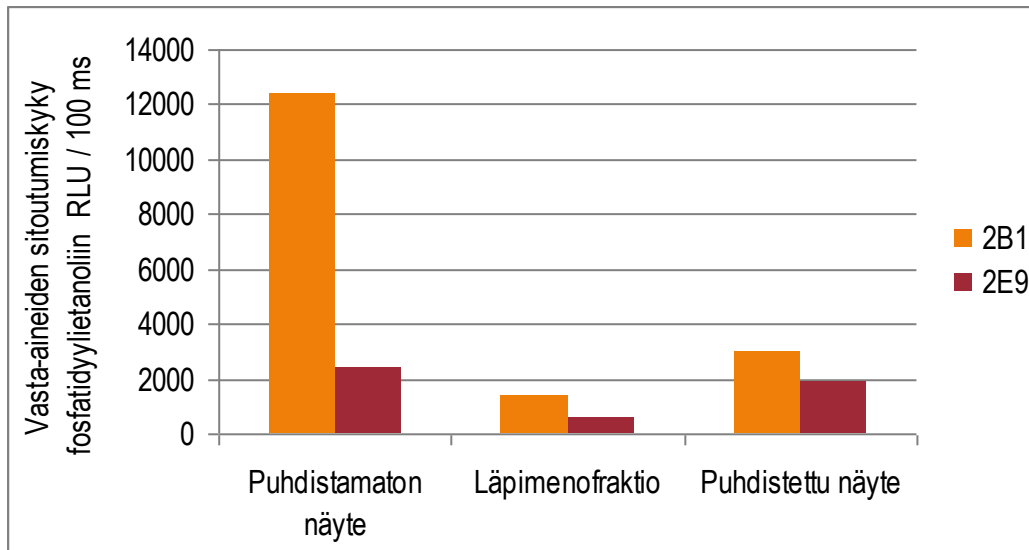
KUVIO 15. 2E9-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuus proteiinvapaassa kasvatusliuoksessa ELISA-menetelmällä mitattuna. RLU / 100 ms = Relative Light Unit / 100 milliseconds.

Kuviosta 15 selviää, että proteiinvapaassa kasvatusliuoksessa kasvatetun 2E9-solulinjan tuottamien vasta-aineiden pitoisuudet ovat jokaisen päiväkohtaisen näytteen osalta molemmilla laimennoksilla mitattuna samaa luokkaa kuin keräämämme nollanäytteen pitoisuudet. Koska nollanäytteet on kerätty heti soluviljelyn alussa, ei niiden pitäisi sisältää vasta-aineita juuri ollenkaan. Proteiinvapaassa kasvatusliuoksessa kasvatetut 2E9-solulinjan solut eivät siis ole tuottaneet vasta-aineita juuri lainkaan.

### 6.2.2 Vasta-aineiden puhdistaminen ja toimivuuden testaus

Ioninvaihtokromatografialla proteiinvapaasta kasvatusliuoksesta erotelluista fraktioista tutkittiin vasta-aineiden pitoisuutta mittaavan ELISA-menetelmän avulla, mitkä fraktioista sisälsivät eniten IgM-vasta-aineita. Fraktioiden sisältämien IgM-vasta-aineiden pitoisuuden mittauksessa ilmeni, että 2B1-solulinjan kasvatusliuoksen puhdistamisen jälkeen eniten IgM-vasta-aineita sisälsivät fraktiot 26–36. 2E9-solulinjan kasvatusliuoksen puhdistamisen jälkeen eniten IgM-vasta-aineita oli fraktioissa 24–35. Mittaustulokset on havainnollistettu kuvioihin, jotka löytyvät liitteestä 5.

Edellä mainittujen mittaustulosten perusteella eniten vasta-aineita sisältäneet fraktiot yhdistettiin. Fraktioista mitattujen proteiinipitoisuuksien perusteella fraktioista tehtiin 5 µg/ml laimennos, jota käytettiin vasta-aineiden sitoutumiskykyä mittaavassa ELISA-testissä. Lisäksi testissä mitattiin puhdistamattoman kasvatusliuoksen ja läpimenofraktion sisältämien vasta-aineiden sitoutumiskykyä. Läpimenofraktio sisältää kaikki ioninvaihtokromatografian pylvään läpi tulleet näytteen komponentit, jotka eivät sitoutuneet pylvääseen. Tuloksia vertaillaan kuviossa 16.

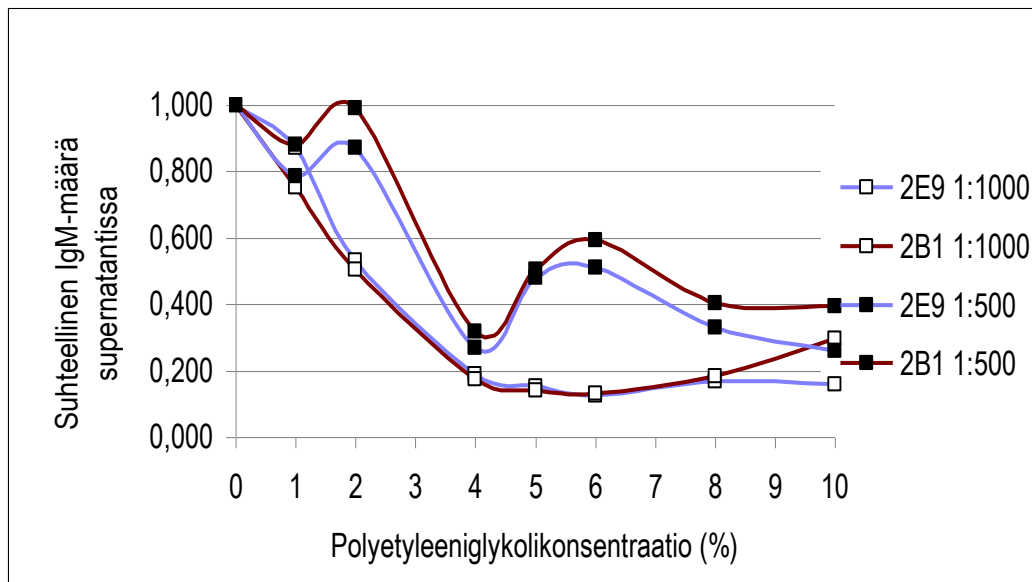


KUVIO 16. Vasta-aineiden sitoutumiskyvyn mittaaminen ELISA-menetelmällä, jossa antigeeninä fosfatidyylietanoli. RLU / 100 ms = Relative Light Unit / 100 milliseconds.

Kuviossa 16 esitetyistä tuloksista ilmenee selkeästi, että 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden sitoutumiskyky ennen ioninvaihtokromatografialla puhdistamista on selvästi parempi kuin puhdistettujen vasta-aineiden sitoutumiskyky. Läpimenofraktio ei tulosten perusteella sisällä merkittäviä määriä fosfatidyylietanolivasta-aineita. 2E9-solulinjan tuottamien vasta-aineiden osalta sitoutumiskykyä ei voida luotettavasti arvioida näiden tulosten perusteella vasta-aineiden vähäisen määrän vuoksi.

### 6.3 Alhaisimman fosfatidyylietanolivasta-aineita saostavan polyetyleeniglykolikonsentraation määrittäminen

Kolmantena tutkimustehtävänämmä oli selvittää alhaisin mahdollinen fosfatidyylietanolivasta-aineita tehokkaasti saostava polyetyleeniglykolikonsentraatio. Saostus suoritettiin 2B1- ja 2E9-solulinjojen RPMI-10-kasvatusliuokseen tuottamilla vasta-aineilla, ja mittaukset suoritettiin kahdella eri näytelaimennoksella. Vasta-aineiden pitoisuus mitattiin supernatantista eli näytteen liukoisesta osasta, jolloin saatiin selville saostumattomien vasta-aineiden määrä näytteissä. Siinä supernatantissa, jossa on vähiten vasta-ainetta, polyetyleeniglykolisaostus on onnistunut parhaiten ja kyseisen näytteen saostamiseen käytetty polyetyleeniglykolikonsentraatio (%) on ollut optimaalinen. Saostuksen tuloksia havainnollistetaan alla olevassa kuviossa 17.



KUVIO 17. Polyetyleeniglykolisaostuksen tulokset.

Kuviossa 17 esitetyt tulokset on ilmaistu suhteellisena lukuna, jossa kaikkia tuloksia on verrattu 0 % polyetyleeniglykoliliuosta sisältävän näytteen vasta-ainepitoisuuteen. 1:1000 laimennoksella saaduista mittaustuloksista näkyy, että polyetyleeniglykolikonsentraation noustessa yli 4 % ei saostuneiden vasta-aineiden määrä laske enää merkittävästi. Myös 1:500 laimennoksen mittaustulokset näyttävät matalia vasta-ainepitoisuuksia 4 %:n polyetyleeniglykolikonsentraation kohdalla. Tulosten perusteella 4 %:n polyetyleeniglykolikonsentraatio on siis ollut alhaisin tehokas konsentraatio fosfatidyylietanolivasta-aineiden saostuksessa.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Optimaalisen vasta-aineiden tuottoajan testauksessa ilmeni, että testaamiemme 2B1- ja 2E9-solulinjojen vasta-aineiden tuottoajat ja -määrät poikkeavat hieman toisistaan. 2B1-solulinjan tuottoaikaa tarkasteltaessa voidaan huomata, että eniten vasta-aineita sisälsi tuottoajan viimeisenä eli kuudentena vuorokautena kerätty näyte. Vasta-aineiden tuotanto ei siis missään vaiheessa vähentynyt kuuden vuorokauden kasvatuksen aikana. Tämä viittaa siihen, että testaamamme tuottoaika ei ollut tarpeeksi pitkä. Tutkimusryhmällä on siis aihetta määrittää tuottoaikaa pidemmällä aikavälillä. 2E9-solulinjan vasta-aineiden tuotanto puolestaan näyttää vähenevän viiden vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Näiden tulosten perusteella 2E9-solulinjan maksimaalinen vasta-aineiden tuottoaika on siis viisi vuorokautta.

Verrattaessa RPMI-10-kasvatusliuoksessa ja proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa tuotettujen vasta-aineiden pitoisuuksia molempien solulinjojen osalta voidaan todeta, ettei testattava EXCELL CD Hybridoma Medium -kasvatusliuos sovellu näille kahdelle solulinjalle. 2B1-solulinjan tuottamien vasta-aineiden määrä proteiinivapaassa kasvatusliuoksessa oli vähäinen ja 2E9-solulinja ei tuottanut vasta-aineita lainkaan.

Ioninvaihtokromatografialla suoritettua puhdistuksen onnistumista arvioitiin mittaamalla ioninvaihtokromatografian keräämien fraktioiden vasta-ainepitoisuudet. Testin perusteella valittiin eniten vasta-aineita sisältäneet fraktiot jatkotutkimuksiin. Mittaustulokset viittasivat siihen, että fraktiot sisältävät suuria määriä vasta-aineita. Yhdistetyistä fraktioista tehty sitoutumiskykyä mittaava ELISA-testi osoitti kuitenkin, että puhdistettujen fraktioiden sisältämien vasta-aineiden kyky sitoutua antigeeniinsä oli hyvin heikko. Tämä osoittaa, että levyille laitettusta 5 µg/ml proteiinimäärästä vain osa oli fosfatidyylietanolivasta-ainetta tai vasta-aine ei enää sitoudu antigeeniinsä. Vasta-aineiden puhdistaminen ioninvaihtokromatografialla saattaa vaikuttaa vasta-aineiden rakenteisiin, mikä puolestaan heikentää niiden sitoutumiskykyä. Tutkimusryhmällä on siis aihetta jatkaa erilaisten kasvatusliuosten testaamista näille solulinjoille.

Tutkimuksen tulosten perusteella 4 %:n polyetyleeniglykolikonsentraatio oli alhaisin tehokas konsentraatio fosfatidyylietanolivasta-aineiden saostuksessa. Tämän tutkimustehtävän tuloksia tutkimusryhmä voi hyödyntää jatkotutkimuksissaan.

## 8 POHDINTA

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tuottaa fosfatidyylieetanolin määritysmenetelmää kehittäväälle tutkimusryhmälle tietoa fosfatidyylieetanolivasta-aineiden tuoton kehittämiseen ja optimointiin. Määritimme tutkimusryhmän kehittämien kahden hybridoomasolulinjan optimaalista vasta-aineiden tuottoaikaa eli selvitimme, kuinka kauan solulinjat tuottavat tehokkaasti vasta-aineita. Lisäksi testasimme proteiinivapaan solujen kasvatusliuoksen toimivuutta fosfatidyylieetanolivasta-aineiden tuotossa ja puhdistuksessa ioninvaihtokromatografialla sekä määritimme alhaisinta fosfatidyylieetanolivasta-aineita tehokkaasti saostavaa polyetyleeniglykolikonsentraatiota.

Tutkimuksessa testattu proteiinivapaa solujen kasvatusliuos ei soveltunut vasta-aineiden tuotantoon 2B1- ja 2E9-solulinjoilla, joten jatkotutkimuksia tämän tutkimustehtävän osalta tarvitaan edelleen. Tulokset 2E9-solulinjan optimaalisen tuottoajan määrittämisestä sekä alhaisimman mahdollisen fosfatidyylieetanolivasta-aineita saostavan polyetyleeniglykolikonsentraation testaamisesta ovat kuitenkin hyödyllistä tietoa tutkimusryhmälle vasta-aineiden tuotannon ja puhdistamisen optimointiin ja kehittämiseen.

Tutkimusta tehdessämme luotettavuuden ja koko tutkimuksen onnistumisen kannalta tärkeä asia oli asianmukaisen laboratoriotyöskentelyn hallitseminen. Hyvä laboratoriotyöskentely eli GLP (Good Laboratory Practice) on ei-kliinisiä tutkimuksia suorittavien laboratorioden laatujärjestelmä, jonka tarkoituksena on taata tulosten korkea laatu ja luotettavuus toimivalla laboratorion sisäisellä laadunhallinnalla sekä raportointikäytännöllä. (OECD, Good Laboratory Practise, hakupäivä 2.3.2010.)

Omaksuimme soluviljelytyössä vaadittavat aseptiset työskentelytavat ja soluviljelytyöskentelymme onnistui tavoitteiden mukaisesti, eikä meille tullut tarvetta turvautua kontaminaatioiden varalta viljeltyihin soluihin. Kaikki opinnäytetyön laboratoriotyöskentelyn aikana suoritettavat ELISA-mittaukset tehtiin 2-4 rinnakkaisina mittauksina luotettavuuden varmistamiseksi. Tutkimusryhmässä oli huolehdittu käyttämiemme pipettien kalibroinneista ja huolloista, mutta emme saaneet tietoa viimeisimmän kalibroinnin suoritusajankohdasta. Pipetoitujen määrien tarkkuudesta ei siis ole täyttä varmuutta. Pipetoinnit suoritettiin kuitenkin koko tutkimuksen ajan samoilla pipeteilla, mikä tekee tämän tutkimuksen tuloksista keskenään vertailukelpoisia. Kirjoitimme laboratoriotöi-



den kaikissa vaiheissa laboratoriopäiväkirjaa, josta oli suuri hyöty opinnäytetyön raportoinnin yhteydessä ja laadun takaamisessa.

Opinnäytetyön aihe oli mielenkiintoinen ja monipuolinen opiskelijan näkökulmasta. Pääsimme tutkimuksen suorittamisen kautta tutustumaan useisiin laboratorioden erityismenetelmiin, joiden periaatteita olemme päässeet opiskelemaan koulussa vain teorian tasolla. Lisäksi oli mielenkiintoista tutustua uuden laboratoriokokeen kehittämistyöhön perinpohjaisesti. Alkoholien suurkulutuksen osoittamiseen ei ole tällä hetkellä kliinisessä käytössä spesifistä merkkiainetta, joten uuden menetelmän kehittäminen on erittäin ajankohtaista.

Opinnäytetyön suorittaminen tutkimusryhmässä avasi näkemystämme bioanalytiikan toimenkuvasta ja ammatin mahdollisuuksista. Aiheen parissa työskentely kehitti molempien ammattitaitoa solu- ja molekyylibiologien menetelmien osalta niin teorian kuin käytännönkin tasolla. Osallistuminen tutkimusryhmän työhön oli meille molemmille mieluinen kokemus, joka osoitti myös tutkimustyön toisen puolen: työn tekeminen on hidasta, eivätkä kokeet tuota aina haluttua lopputulosta. Kokemus kuitenkin kasvatti molempien mielenkiintoa tutkimusryhmässä työskentelyä kohtaan.

Opinnäytetyöprosessin aikana opimme hakemaan tietoa monipuolisesti eri lähteistä. Luotettavan lähteen valitseminen oli välillä vaikeaa, sillä kaipaamaamme tietoa oli tarjolla paljon. Lopulta opimmekin ymmärtämään lähteiden merkityksen työn kannalta ja suhtautumaan kriittisesti lähde-tietoihin.

Opinnäytetyön suorittamiseen varattu aika oli mielestämme lyhyt, sillä aiheemme vaati perinpohjaista tutustumista itse tutkittavaan molekyyliin ja sen synnyn taustoihin sekä työssä käytettäviin menetelmiin. Mielenkiintoinen aihe auttoi säilyttämään oman kiinnostuksen työtä kohtaan koko opinnäytetyöprosessin ajan.

Haluamme kiittää professori Markku Savolaisen tutkimusryhmää mielenkiintoisesta opinnäytetyön aiheesta. Erityiskiitoksen haluamme osoittaa tutkimusryhmän jäsenelle FM Antti Nissiselle, joka oli ohjaamassa laboratoriotyön osuuden suorittamista sekä kirjallisen työn suorittamista. Kiitoksen neuvoista ja ohjauksesta haluamme antaa myös ohjaaville opettajillemme Paula Reposelle ja Hanna-Maarit Aholle sekä opponenteille Henna Ekille ja Maria Jouhtenille.

# LÄHTEET

## Julkaistut lähteet

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell. 5th edition. New York: Garland Science Publishing.

Amersham Biosciences. 2001. RESOURCE Q, 1 ml. Hakupäivä 24.5.2010, <http://www.ebiotrade.com/GE/AKTAclub7/1.PDFs/71714600AD.pdf>.

Aradottir, S., Asanovska, G., Gjerms, S., Hansson, P. & Alling, C. 2006. Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol & Alcoholism* Vol. 41, No. 4, pp. 431–437.

Aradottir, S., Lundqvist, C. & Alling, C. 2002. Phosphatidylethanol in Rat Organs After Ethanol exposure. *Alcoholism: Clinical and experimental research* Vol. 26, No. 3, 514–518.

Aradottir, S., Moller, C. & Alling, C. 2004. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol & Alcoholism* Vol. 39, No.1, 8–13.

Avanti polar lipids. 2010. Phosphatidylethanol. Hakupäivä 24.9.2010, [http://www.avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=825&Itemid=314&catidnumber=840513](http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=825&Itemid=314&catidnumber=840513).

Decker, J. 2006. The University of Arizona: Immunology: ELISA. Hakupäivä 8.1.2010, <http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa3.jpg>

Fahie-Wilson, M. & Halsall, D. 2008. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Annals of clinical biochemistry*, Vol. 45, No.5, 233–235.

Freshney, R. 2005. Culture of animal cells, a manual of basic technique. 5th edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and sons, Inc.

GE Amersham Pharmacia. 2010. ÄKTA Explorer 100 Chromatograph. Hakupäivä 24.5.2010, [http://www.gmi-inc.com/GE-Amersham-Pharmacia-AKTA-Explorer-100-Chromatograph.html#product\\_desc](http://www.gmi-inc.com/GE-Amersham-Pharmacia-AKTA-Explorer-100-Chromatograph.html#product_desc).

Gnann, H., Engelmann, C., Skopp, G., Winkler, M., Auwärter, V., Dresen, S., Ferreirós, N., Wurst, F.M. & Weinmann, W. 2010. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 396, 2415–2423.

Hannuksela, M., Rämetsä, M., Nissinen, A., Liisanantti, M. & Savolainen, M. 2003. Effects of ethanol on lipids and atherosclerosis. *Pathophysiology* 10, 93–103.

Helander, A. & Zheng, Y. 2009. Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS. *Clinical Chemistry* 55:7, 1395–1405.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th edition. New York: Garland Science Publishing.

Lumigen Inc. 2009. Lumigen PPD. Hakupäivä 15.5.2010, [http://www.lumigen.com/products/lumigen\\_ppd](http://www.lumigen.com/products/lumigen_ppd).

Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W. & Weil, P.A. 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 28th edition. The McGraw-Hill Companies. (Ei julkaisupaikkaa).

Niemelä, O. 2007. Biomarkers in alcoholism. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 377, Issue 1-2, 39–49.

Nissinen, A., Mäkelä, S., Vuoristo, J., Liisanantti, M., Hannuksela, M., Hörkö, S. & Savolainen, M. 2008. Immunological detection of in vitro formed phosphatidylethanol, an alcohol biomarker, with monoclonal antibodies. *Alcoholism: Clinical and experimental research*, Vol 32, No 6, 921–928.

Nissinen, A. & Savolainen, M. 2008. Fosfatidyylietanoli alkoholinkäytön merkkiaineena. *Kliinlab* 3/2008, 45–48.

OECD. 2010. Good Laboratory Practise. Hakupäivä 2.3.2010,  
[http://www.oecd.org/department/0,3355,en\\_2649\\_34381\\_1\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_34381_1_1_1_1_1,00.html)

Page, M. & Thorpe, R. 2002. Purification of IgG by precipitation with polyethylene glycol (PEG),  
The protein protocols handbook. 2nd edition. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

Sigma-Aldrich. 2010. EX-CELL® CD Hybridoma Medium, Chemically Defined. Hakupäivä  
23.9.2010,  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=H4409|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=H4409|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).

Sigma-Aldrich. 2010. Product information: Hybridoma medium. Hakupäivä 15.9.2010,  
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/2/h4409dat.Par.0001.File.tmp/h4409dat.pdf>.

Sigma-Aldrich. 2010. RPMI-1640 Medium (R0883). Hakupäivä 23.5.2010,  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=R0883|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=R0883|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).

Stryer, L. 1988. Biochemistry. 3rd edition. New York: W.H. Freeman and Company.

Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. 2010. Käypä hoito -suositus alkoholiongelman hoidosta. Hakupäivä 3.3.2010,  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/naytaartikkeli/tunnus/hoi50028>.

Tscheliessnig, A. , Ong, D., Lee, J., Pan, S., Satianegara, G., Schriebl, K., Choo, A. & Jungbauer, A. 2009. Engineering of a two-step purification strategy for a panel of monoclonal immunoglobulin M directed against undifferentiated human embryonic stem cells. Journal of Chromatography A, 7851–7856.

Wurst, F., Thon, N., Aradottir, S., Hartmann, S., Wiesbeck, G., Lesch, O., Skala, K., Wolfersdorf, M., Weinmann, W. & Alling, C. 2010. Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports. Addiction Biology, 15, 88–95.

Yamamoto, S., Nakanishi, K. & Matsuno, R. 1988. Ion-exchange chromatography of proteins. New York: Marcel Decker.

Yang, S.F., Freer, S. & Benson, A.A. 1967. Transphosphatidylation by Phospholipase D. The Journal of biological chemistry, Vol. 242, No. 3, 477–484.

### **Julkaisemattomat lähteet**

Nissinen, A., FM, tutkija, Oulun yliopisto. 2010. Suullinen tiedonanto 14.4.2010.

Nissinen, A., FM, tutkija, Oulun yliopisto. 2010. Suullinen tiedonanto 3.9.2010.

Nissinen, A., FM, tutkija, Oulun yliopisto. 2010. Suullinen tiedonanto 11.11.2010.

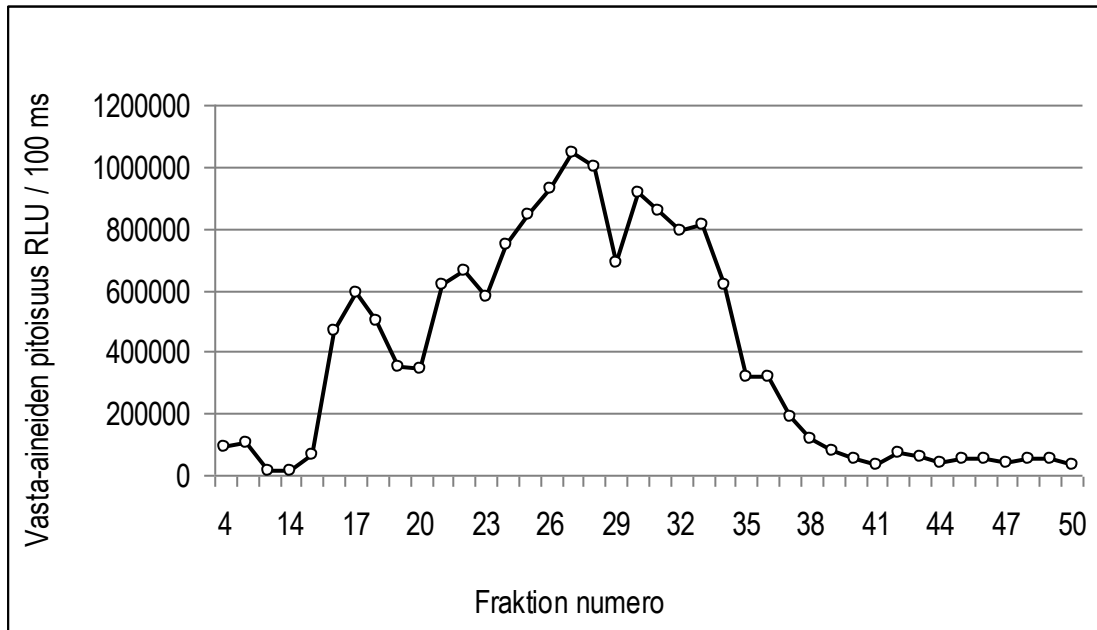
## LIITTEET

- LIITE 1 IgM-ELISA:n testaamista
- LIITE 2 ELISA-menetelmä IgM-vasta-aineiden pitoisuuden mittauksessa
- LIITE 3 Fosfatidylietanolivasta-aineiden toimivuuden testaus kemiluminesenssimenetelmällä
- LIITE 4 Polyetyleeniglykolisaostuksen testaaminen
- LIITE 5 Fraktioiden sisältämien vasta-ainepitoisuuksien mittausten tulokset

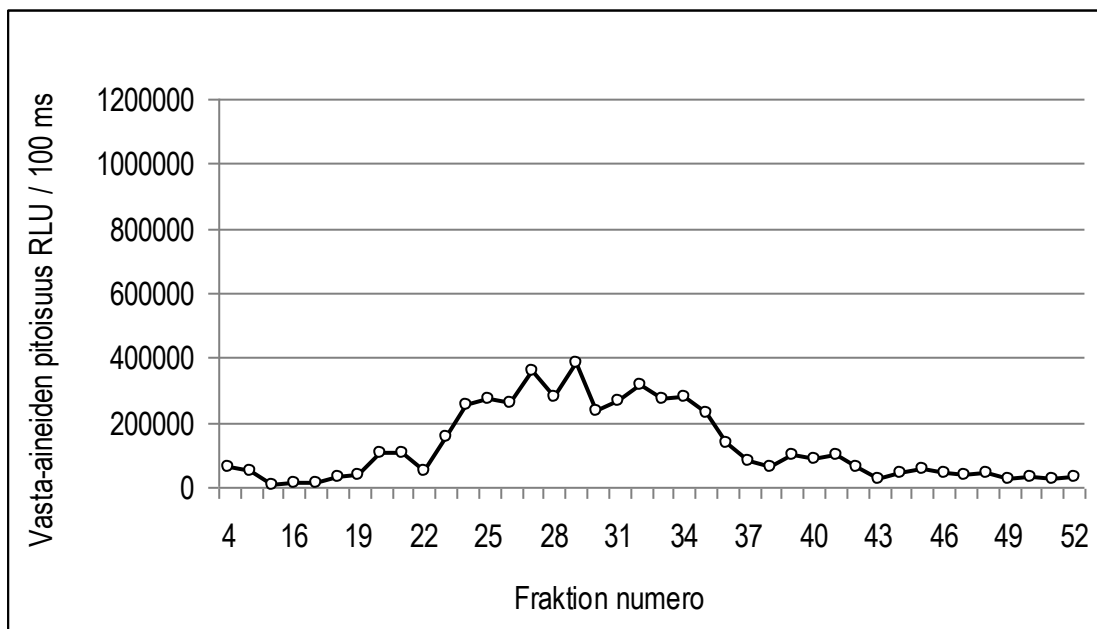
Työohjeita ei julkaista Internetissä.

**FRAKTIOIDEN SISÄLTÄMIEN VASTA-AINEPITOISUUKSIEN  
MITTAUSTEN TULOKSET**

LIITE 5



2B1-solulinjan proteiiniivapaasta kasvatusliuoksesta ioninvaihtokromatografialla eroteltujen fraktioiden vasta-ainepitoisuudet.



2E9-solulinjan proteiiniivapaasta kasvatusliuoksesta ioninvaihtokromatografialla eroteltujen fraktioiden vasta-ainepitoisuudet.