

Opinnäytetyö (YAMK)

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2019

Mikael Jaakkola

# FLUORESOIVILLA EUROPIUM- KELAATEILLA LEIMATUN VASTA-AINEEN TOIMIVUUS NT-PROBNP- IMMUNOMÄÄRITYKSESSÄ

Mikael Jaakkola

# FLUORESOIVILLA EUROPIUM-KELAATEILLA LEIMATUN VASTA-AINEEN TOIMIVUUS NT- PROBNP-IMMUNOMÄÄRITYKSESSÄ

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia viiden erilaisen leimareagenssin (luminoivien lantanidikelaattien) toimivuutta NT-proBNP-immunomäärityksessä sekä niiden ominaisuuksien vaikutusta toimivuuteen.

Leimareagenssit konjugoitiin vasta-aineeseen ja ne testattiin NT-proBNP-immunomäärityksessä sekä käsin tehtävällä määrityksellä että kuivattuna AQT90 FLEX -immunoanalysaattorilla. Leimatuista vasta-aineista mitattiin ja laskettiin kelaattien fotofysikaalisia ominaisuuksia.

Tutkimuksen tuloksena on referenssiä neljä kertaa kirkkaampi Europium-kelaatti. Sen toimivuutta todennettiin NT-proBNP-vasta-aineen lisäksi kahdella muulla analytyillä. Moninkertainen kirkkaus tarkoittaa korkeampaa signaalitasoa, jota voidaan hyödyntää määrityksen herkkyden nostamisessa.

## ASIASANAT:

Europium-kelaatti, immunomääritys, vasta-aineleimaus, geelikromatografia

MASTER'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical Engineering and Biotechnology

2019 | 43 pages

Mikael Jaakkola

# FUNCTIONALITY OF FLUORESCENT EUROPIUM CHELATE LABELED ANTIBODY IN NT-PROBNP IMMUNOASSAY

The aim of the thesis was to study the performance of five different labeling reagents (luminescent lanthanide chelates) in the NT-proBNP immunoassay and the effect of chelate properties on functionality.

The labeling reagents were conjugated to the antibody and were tested in the NT-proBNP immunoassay both manual assay and dried with AQT90 FLEX immunoanalyzer. The photo-physical properties of labeling reagents were measured and calculated from labeled antibodies.

The result of this study is a four-fold brighter Europium chelate than reference chelate. Its performance was verified with two other analytes. Higher brightness means a higher signal level that can be utilized to increase the sensitivity of the assay.

## KEYWORDS:

Europium chelate, immunoassay, antibody labeling, gel chromatography

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 MENETELMÄT</b>	<b>8</b>
2.1 Testausmenetelmä	8
2.2 Vasta-aineleimausprosessi	13
2.3 Kelaattien fotofysiaaliset mittaukset	20
2.3.1 Molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ), kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ) ja kvanttisaanto ( $\Phi$ )	20
2.3.2 Europium-pitoisuusmääritykset	21
2.3.3 Tris-puskuri-luminesenssimääritys	24
2.3.4 Viritys-, emissio- ja elinikämittaukset	25
<b>3 MATERIAALIT JA VÄLINEET</b>	<b>26</b>
3.1 Käytettävät laitteistot	26
3.2 Vasta-aineet	26
3.3 Puskurit ja muut materiaalit	26
3.4 Leimareagenssit	27
3.5 Näytteet ja standardit	28
<b>4 TULOKSET</b>	<b>30</b>
<b>5 POHDINTA</b>	<b>39</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>41</b>

## KUVAT

Kuva 1 Geneerinen IgG-rakennekuva. Osien ja alueiden selitykset löytyvät tekstistä.	8
Kuva 2 Lantanidikelaattien Stokesin siirtymä on suuri	10
Kuva 3 Aikaerotteisen fluorometrian mittauseriaate	11
Kuva 4 Immunokompleksi eli vasta-aine + antigeeni + vasta-aine -kompleksi	12
Kuva 5 Yleiskuvaus immunomäärityksestä. Vaiheiden selitykset löytyvät tekstistä.	12
Kuva 6 Puhdistuskromatogrammin erilaisia piikkejä	17
Kuva 7 Esimerkki puhdistuskromatogrammista; UV <sub>280</sub> (sininen), UV <sub>340</sub> (punainen) ja poolaus (vaalean sininen).	18
Kuva 8 Referenssikelaatti <sup>21,36</sup>	27

Kuva 9 RTKU1-kelaatti <sup>34</sup>	28
Kuva 10 Emissiospektrit	31
Kuva 11 Vuritysspektrit	31

## TAULUKOT

Taulukko 1 Reaktion kokoamisjärjestys	14
Taulukko 2 pH:n vaikutus aminoryhmien muotoon	15
Taulukko 3 Fraktioinnin tulokset	19
Taulukko 4 Kehitysluosliuotuksessa käytetyt laimennossarjat A, B ja C	23
Taulukko 5 Tris-puskuri-luminesenssimäärityksen laimennossarja	25
Taulukko 6 Immunomäärityksissä käytetyt näytteet	29
Taulukko 7 Vuritys- ja emissiospektrimittausten asetukset	30
Taulukko 8 Elinikämittausten asetukset	32
Taulukko 9 Molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ), kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ), kvanttisaanto ( $\Phi$ ), emissiomaksimi ( $\lambda_{em}$ ) ja vuritysmaksimi ( $\lambda_{ex}$ ) sekä elinikä ( $\tau$ )	33
Taulukko 10 Kelaatti ylimäärät, tavoiteltu leima-aste ja saavutettu leima-aste	34
Taulukko 11 Märkäimmunomäärityksissä käytettävät näytteet	35
Taulukko 12 Märkäimmunomääritysten tulokset	36
Taulukko 13 Märkäimmunomääritysten perusteella kuivaimmunomääritykseen valitut <b>vahvennettu</b>	37
Taulukko 14 Kuivaimmunomäärityksissä käytetyt näytteet	37
Taulukko 15 Kuivaimmunomääritysten tulokset	38

# KÄYTETYT LYHENTEET

## Lyhenne

RTKU

TRF

TR-IFMA

Eu

SCN

$\varepsilon$

$\varepsilon\Phi$

$\Phi$

BSA-TSA

## Lyhenteen selitys

Radiometer Turku Oy

Aikaerotteinen fluorometria

Aikaerotteinen immunofluorometrinen määrittäminen

Europium

Isotiosyanaatti

Molaarinen absorptiokerroin (epsilon)

Kirkkaus (epsilon fii)

Kvanttisaanto (fii)

Naudan seerumin albumiinia liuotettuna tris-saliini-atsidi-puskuriin

# 1 JOHDANTO

Työ toteutettiin Radiometer Turku Oy:n tuotekehityksessä. Taustana toteutukselle oli kehitysvaiheessa olevan NT-proBNP-immunomäärityksessä havaitut haasteet. Immunomäärityksen analyttisen herkkyyden oli havaittu laskevan vasta-aineparin muutosten myötä.

Herkkyyteen vaikuttaviksi tekijöiksi tunnistettiin muun muassa käytettävän leimareagenssin (fluoresoiva Europium-kelaatti) fotofysikaaliset ominaisuudet, käytössä olevan vasta-aineen ominaisuudet ja käytettävän vasta-aineen leima-aste. Ajatuksena on parantaa herkkyyttä erilaisen leimareagenssin avulla. Tarjolla oli useita uusia leimareagensseja, joiden ominaisuuksia haluttiin testata.

Työssä tutkittiin viiden erilaisen leimareagenssin toimivuutta immunomäärityksessä. Leimareagenssit konjugoitiin vasta-aineeseen ja niiden toimivuutta testattiin NT-proBNP-immunomäärityksessä. Käytettävä vasta-aineleimausmenetelmä ja sen olosuhteet sekä käytettävä immunomääritystesti olivat ennalta määriteltäviä yrityksen toimesta, joten ne pysyivät muuttumattomina tämän työn aikana. Lisäksi karakterisoitiin kelaattien fotofysikaalisia ominaisuuksia niin nesteessä kuin kuivattuna.

Tavoitteena oli tutkia erilaisten kelaattien toimivuutta NT-proBNP-immunomäärityksessä ja niiden ominaisuuksien vaikutusta toimivuuteen.

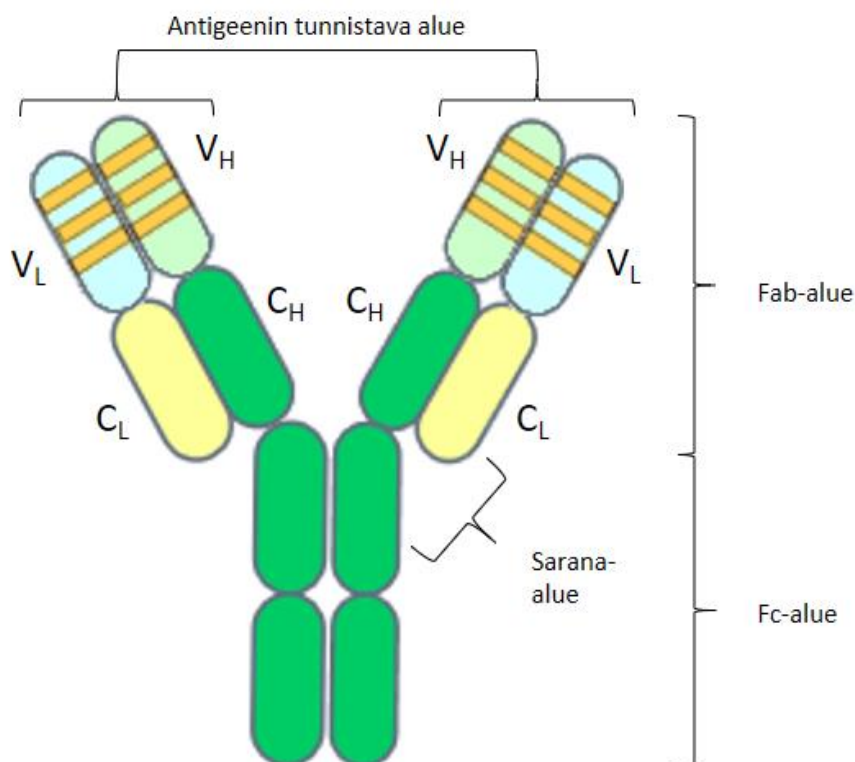
.

## 2 MENETELMÄT

### 2.1 Testausmenetelmä

#### Vasta-aine

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat immuunijärjestelmän B-lymfosyyteistä erikoistuneiden plasmasolujen tuottamia glykoproteiineja, jotka tunnistavat spesifisesti tietyn antigeenin. Immunoglobuliinit jakautuvat nisäkkäillä viiteen eri luokkaan niiden biologisten ominaisuuksien ja kemiallisen rakenteen perusteella; IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Ne voidaan jakaa myös raskasketjurakenteen mukaan  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -, ja  $\mu$ -luokkiin sekä kevytketjurakenteen mukaan  $\kappa$ - tai  $\lambda$ -luokkiin. Ihmisellä esiintyvät IgG- ja IgA-luokat jaetaan alaluokkiin niiden esiintyvyyden mukaan IgG1-IgG4 sekä IgA1-IgA2. Immunoglobuliini G eli IgG on rakenteeltaan monomeerinen (kuva 1) ja yleisin immunoglobuliini ihmisen seerumissa. Se on yleisesti käytetty vasta-aine immunomäärityksissä.<sup>1-2</sup>



Kuva 1 Geneerinen IgG-rakennekuva. Osien ja alueiden selitykset löytyvät tekstistä.

Ihmisen IgG rakentuu kahdesta identtisestä kevytketjusta (L) ja raskasketjusta (H), jotka sitoutuvat toisiinsa disulfidiidoksin eli rikkisilloin. Ne jakautuvat pysyviin osioihin (C) sekä muuttuviin osioihin (V). Vasta-aine koostuu kolmesta rakenneyksiköstä; sarana-alue (hinge region), antigeenin tunnistava ja sitova alue Fab (fragment with antigen binding specificity) ja kiteytyvä varsiosa Fc (fragment crystallizable). Fab-alueissa on jokaisen ketjun päässä antigeenin tunnistava alue, joka sisältää kolme CDR- eli kolmpelentaari-suutta määrittävää aluetta (complementary determining regions). Nämä CDR-alueet mahdollistavat antigeenin epitooppien spesifisen tunnistamisen. Antigeeniin sitoutunut Fc-alue sitoutuu Fc-reseptoreihin fagosyyttien ja sytotoksisten solujen solukalvolla.

Vasta-aineet jaetaan niiden tuottotavan mukaan monoklonaalisiin, polyklonaalisiin ja rekombinantteihin vasta-aineisiin. Polyklonaalinen vasta-aine eli pAb tuotetaan immunisoidussa eläimessä ja puhdistetaan siitä kerätystä veren seerumin B-solulinjoista. Polyklonaalinen vasta-aine on tällöin eri B-solulinjoista tuotettujen useiden vasta-aineiden heterogeeninen seos. Monoklonaalinen vasta-aine eli mAb tuotetaan myös immunisoidussa eläimessä mutta eristetään vain yhden B-solulinjan klooneista, jolloin voidaan tuottaa homogeenista ja antigeenispesifistä vasta-ainetta. Rekombinantti vasta-aineet tuotetaan synteettisesti, jolloin niiden ominaisuuksia ja osia voidaan muokata sopivammiksi käyttötarkoitukseen esimerkiksi nostamaan antigeenispesifisyyttä tai affiniteettiä.

## NT-proBNP

Natriureettisia peptideja muodostuu muun muassa sydämen vajaatoiminnan aktivoimana. Peptideja on tunnistettu kolmea eri tyyppiä; A-tyyppi eli ANP (atrial natriuretic peptide), jota muodostuu pääasiassa sydämen eteisen solukon venyessä, B-tyyppi eli BNP (B-type natriuretic peptide tai brain natriuretic peptide), jota vapautuu sydämen kammion lihassoluista ja C-tyyppi eli CNP (C-type natriuretic peptide), jota erittyy endoteelista.<sup>3</sup>

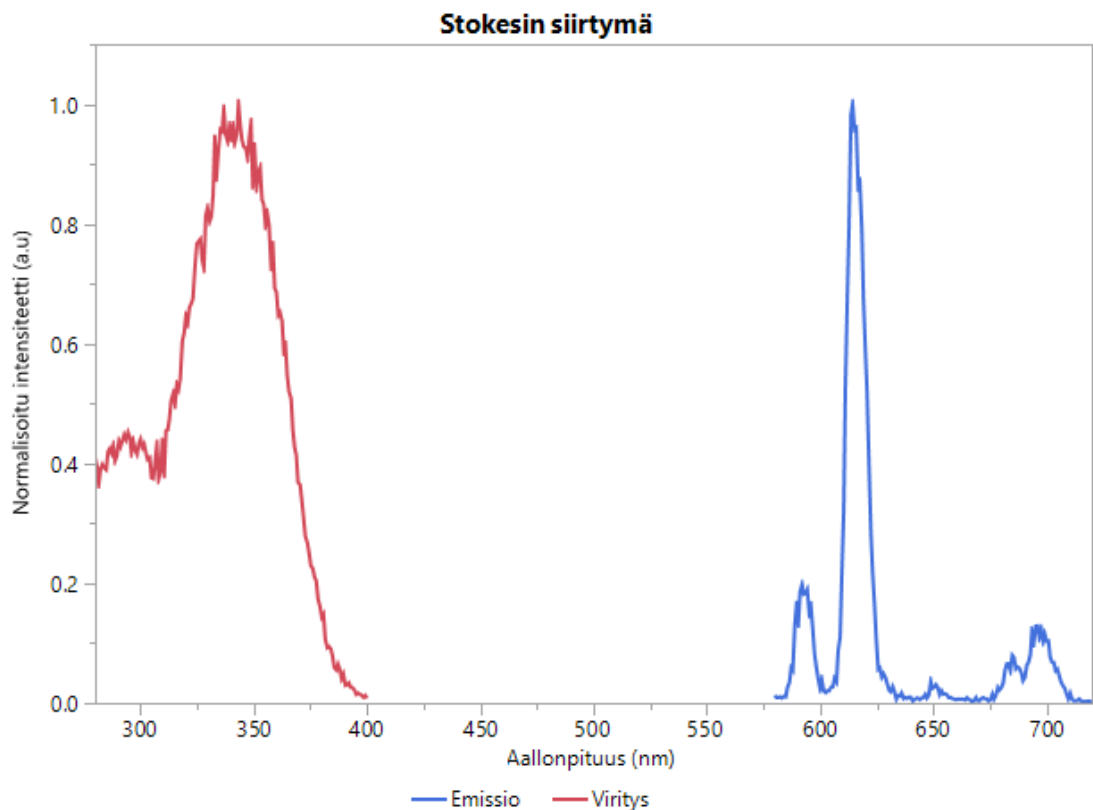
Sydämen kammion lihassolujen venyessä ne syntetisoivat ensin 134 aminohapon pre-proBNP-peptidiketjun, joka jakautuu signaalipeptidiksi ja 108 aminohapon propeptidiksi (proBNP). Propeptidi eli proBNP jaetaan fysiologisesti aktiiviseen 32 aminohapon BNP:ksi (77-108) ja biologisesti inaktiiviseen N-terminaaliseen 76 aminohapon mittaiseen osaan nimeltä NT-proBNP (1-76).<sup>4-5</sup>

Sekä BNP:tä että NT-proBNP:tä käytetään sydämen vajatoiminnan markkereina. NT-proBNP:n pitoisuus plasmassa on normaalitilassa hyvin alhainen. Sen pitoisuus kasvaa nopeasti sydänlihaksen hypoksiassa ja sydämen lihassolujen venytyksessä. NT-proBNP:n pitoisuuteen tiedetään vaikuttavan muun muassa ikä, sukupuoli ja paino.<sup>6</sup>

### Aikaerotteinen fluorometria (TRF)

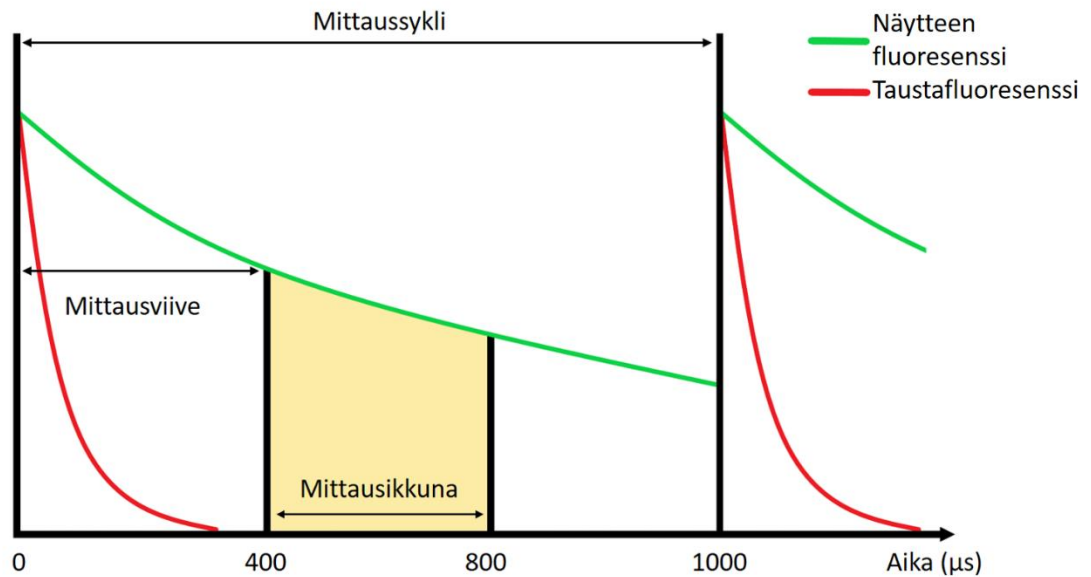
Aikaerotteisessa fluorometriassa (time-resolved fluorescence) hyödynnetään eri aineiden ominaisuutta varata ja purkaa niihin syötettyä energiaa. Tätä ominaisuutta kutsutaan eliniäksi. Se ilmoittaa aikamääränä virityksen purkautumisen. Taustafluoresenssin tiedetään olevan lyhytikäistä, joten varsinaisen näytteen mittaaminen voidaan aloittaa viiveellä taustan fluoresenssin sammuttua.<sup>7</sup>

Mittauksessa näytteeseen syötetään viritys- eli eksitaatioaallonpituudella energiaa, joka virittää molekyylin, joka tässä työssä on Europium- eli Eu-kelaatilla leimattu vasta-aine. Eu-kelaatti kuuluu lantanidikelaatteihin, jolloin sen Stokesin siirtymän eli viritys- ja emissioaallonpituusmaksimien välisen eron tiedetään olevan suuri (kuva 2).<sup>8-10</sup>



Kuva 2 Lantanidikelaattien Stokesin siirtymä on suuri

Europiumilla tiedetään tällöin olevan pitkäkestoinen emissio eli se vapauttaa energiaa pitkään virittymisen jälkeen. Lantanidikelaattien elinikä vaihtelee niiden rakenteesta ja matriisista riippuen välillä 1-2000  $\mu\text{s}$ .<sup>8,10-11</sup> Tässä työssä käytettävien kelaattien elinikä on noin 1 ms. Varsinainen näyttemittaus aloitetaan tietyn mittausviiveen jälkeen, jolloin taustasignaali on sammunut. Mitattavassa aikaikkunassa saadaan näytteen omaa spesifistä signaalia. Periaatetta havainnollistetaan kuvassa 3.



Kuva 3 Aikaerotteisen fluorometrian mittausperiaate

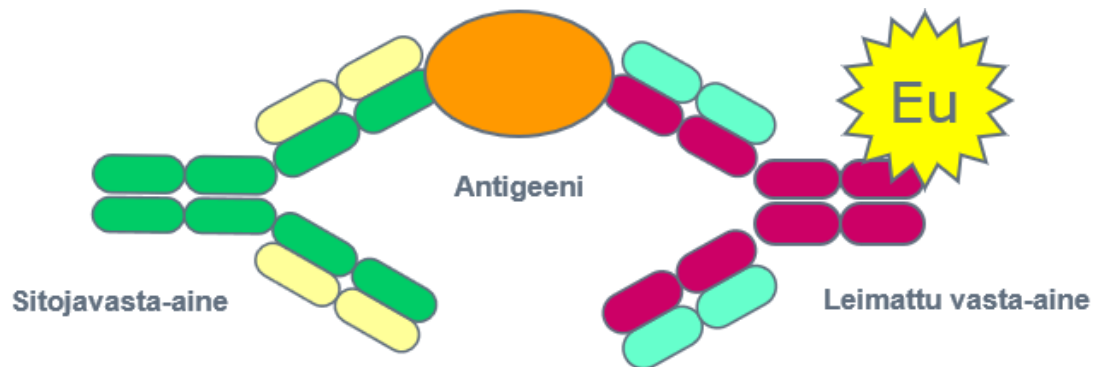
Mittausviive mitoitetaan riittävän pitkäksi kattamaan taustan aiheuttaman fluoresenssin sekä edellisestä mittasyklistä jäävän signaalin. Mittausikkuna määrittää mitattavan alueen näytteen fluoresenssista. Fluorometreissä käytettävän valonlähteen on havaittu vaikuttavan saatavan fluoresenssin määrään.<sup>12</sup>

Työssä käytettävissä fluorometrisissa mittauksissa viritysaallonpituus on 340 nm, emissioaallonpituus 615 nm, mittausviive 400  $\mu\text{s}$  ja mittausikkuna 400  $\mu\text{s}$ . Mittaussyklin pituus on 1 ms. Kokonaismittausaika on 3 sekuntia 3000 sykliä.

### Aikaerotteinen immunofluorimetrinen määrittys (TR-IFMA)

Työssä käytettävä immunomääritysmenetelmä on aikaerotteinen immunofluorimetrinen määrittys eli TR-IFMA (time resolved immunofluorimetric assay). Määrittäksessä käyte-

tään kahta eri vasta-ainetta, jotka tunnistavat saman antigeenin sen eri epitoopissa. Toinen on sitojavasta-aine, jonka antigeenin tunnistavaan osaan haluttu antigeeni sitoutuu. Leimattu vasta-aine sitoutuu vastaavasti samaan antigeeniin, muodostaen immuunokompleksin (kuva 4), jota kutsutaan termillä ”sandwich”. Immunofluorometrisessä määrittämisessä konsentraatio on suoraan verrannollinen saatuun fluoresenssiin eli pitoisuuden kasvaessa myös fluoresenssi kasvaa.<sup>13-14</sup>

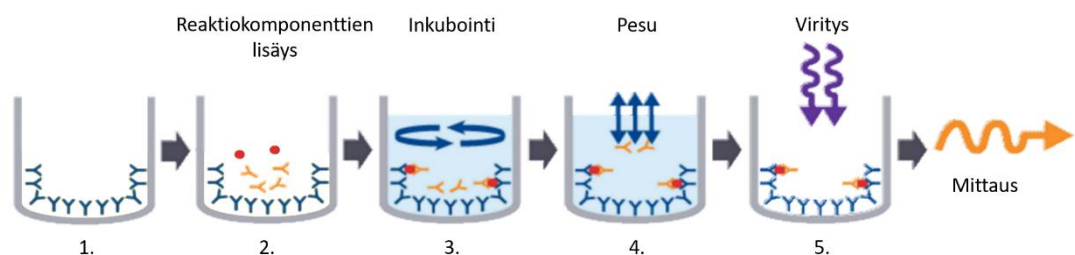


Kuva 4 Immuunokompleksi eli vasta-aine + antigeeni + vasta-aine -kompleksi

Immunomäärittäksen parametrit ja reagenssit ovat RTKU tuotekehityksen määrittämät ja niihin ei tehty muutoksia työn aikana.

Työssä tehtiin sekä käsin tehtävä immunomäärittäminen eli märkäimmunomäärittäminen että AQT90 FLEX -analysaattorilla tehtävä immunomäärittäminen eli kuivaimmunomäärittäminen.

- Y = Sitojavasta-aine
- Y = Leimavasta-aine
- = Antigeeni näytteestä



Kuva 5 Yleiskuvaus immunomäärittäyksestä. Vaiheiden selitykset löytyvät tekstistä.

Käsin tehtävässä immunomäärittäyksessä eli märkäimmunomäärittäyksessä määrittäminen tehdään streptadiiviini päällystetyillä kupeilla kuoppalevyllä. Menetelmää havainnollistetaan kuvassa 5.

Aluksi sidotaan biotinylointu vasta-aine streptadiviinipinnoitteeseen, joka toteutetaan valmistamalla biotinyloidusta sitojavasta-aineesta ja puskurista liuos, jota pipetoidaan kuoppalevyllä oleviin kuppeihin. Kuoppalevyä inkuboidaan ravistelussa huoneenlämmössä. Inkubaation aikana muodostuu biotinyloidun vasta-aineen biotiinin ja streptadiviinipinnoitteen välille luja ei-kovalenttinen sidos (kuva 5, vaihe 1). Sitoutumaton vasta-aineliuos pestään pesuliuksella pois. Testattavat näytteet pipetoidaan halutuinnakkaisnäyttein levyille ja niiden päälle annostellaan leimavasta-aineliuos, joka on tehty välikerrokseen (kuva 5, vaihe 2). Välikerros on 0,1 M natriumfosfaatti-pohjainen puskuri (pH 6,5) sisältäen erilaisia stabiilisuutta ja säilyvyyttä lisääviä komponentteja sekä estäjäreagensseja. Kuoppalevy inkuboidaan halutussa lämpötilassa sekoittaen (kuva 5, vaihe 3). Inkubaation aikana muodostuu immunokompleksi eli sandwich. Inkuboinnin jälkeen reagoimaton osa pestään pois (kuva 5, vaihe 4). Kupit kuivataan kuivaimella ja jäädytetään ennen mittaamista fluorometrillä (kuva 5, vaihe 5).<sup>15</sup>

Kuivaimmunomäärityksessä immunomäärityksen komponentit, näytettä lukuun ottamatta, ovat kuivattuina testikuppiin ja pakattuna testikasettiin. Analysaattori annostelee näytteen ja puskurin, joka liuottaa kuivatut komponentit. Reaktioseos inkuboidaan ravistelussa ennen reagoimattoman osan pesua pois. Testikuppi kuivataan ja mitataan.<sup>16</sup>

## 2.2 Vasta-aineleimausprosessi

Vasta-aineleimauksessa tarkoituksena on konjugoida fluoresoiva merkkiaine vasta-aineeseen.

Leimaustekniikoita on useita erilaisia. Usein käytettyjä menetelmiä ovat muun muassa N-hydroksisukkimidi (NHS)-esterimenetelmä, isotiosyanaatti (ITC)-menetelmä ja karbodiimidi-menetelmä. Tässä työssä käytetään isotiosyanaatti-menetelmään perustuvaa vasta-aineleimausta, jossa leimareagenssissa on reaktiivinen isotiosyanaatti- eli SCN-ryhmä, joka reagoi vasta-aineen aminoryhmien kanssa.<sup>17-18</sup> Työn menetelmä on RTKU tuotekehityksen kehittämä. Sen olosuhteisiin ja reagensseihin ei tehdä työn aikana muutoksia.

Leimattavalle vasta-aineelle tehdään ennen käyttöä puskurinvaihto. Vasta-aine toimitetaan aina jossain säilytyspuskurissa esimerkiksi natriumatsidia sisältävässä fosfaattipuskurissa. Vaihtamalla säilytyspuskuri reaktiossa käytettävään puskuriin tai natriumkloridi-

liuokseen minimoidaan mahdollisten ylimääräisten aminoryhmien tai atsidiryhmien aiheuttamat sivureaktiot. Samalla vasta-aineliuoksen pH:ta voidaan säätää, jotta leimausreaktiossa saavutetaan pH, jolloin aminoryhmät ovat halutussa muodossa reaktion kannalta.

Puskurinvaihdon jälkeen vasta-aineliuoksesta mitataan UV-absorbanssin (280 nm) avulla proteiinipitoisuus. Mittaus perustuu Beerin ja Lambertin lakiin (selitetään kappaleessa 2.3.2 UV-absorbanssi), jonka kaavasta saadaan laskettua absorbanssin kautta pitoisuus. Jos vasta-aineliuoksen proteiinipitoisuus on reaktion kannalta liian alhainen, voidaan se konsentroida reaktion kokoamisen helpottamiseksi.

Käytettävä kelaatti liuotetaan joko orgaaniseen liuottimeen tai veteen haluttuun pitoisuuteen. Kelaattiliuoksesta mitataan UV-spektri väliltä 250-400 nm, josta määritetään maksimi absorptioaallonpituus. Tämän arvon kautta voidaan laskea Lambert-Beerin kaavan avulla Europium-pitoisuus, jos molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ) on tiedossa. Tässä työssä maksimi absorptioaallonpituudet ovat 325 tai 340 nm. Jos molaarinen absorptiokerroin ei ole tiedossa, käytetään kelaatin kromoforien rakenteeseen perustuvaa arvioitua lukuarvoa tai vaihtoehtoisesti Europium-pitoisuus määritetään kehitysluoslimäärittelyllä.<sup>7,11,18</sup>

Leimausreaktio koostuu vasta-aineliuoksesta, kelaattiliuoksesta, puskurista ja tarvittaessa siihen lisätään vettä (CLRW eli Clinical Laboratory Reagent Water) tai esimerkiksi 0,9 % natriumkloridiliuosta sekä orgaanista liuotinta, jos kelaatin liukeneminen sitä vaatii. Reaktio kootaan taulukon 1 määrittämässä järjestyksessä, jotta reaktion olosuhteet pysyvät määritetyissä rajoissa. Tässä työssä kaikki kelaatit ovat hyvin veteen liukenevia, joten orgaanista liuotinta ei reaktioon lisätty.

Taulukko 1 Reaktion kokoamisjärjestys

	Reagenssi
1.	Vasta-aineliuos
2.	Reaktiopuskuri
3.	CLRW tai 0,9 % NaCl
4.	Orgaaninen liuotin
5.	Kelaattiliuos

Reaktion olosuhteet eli vasta-aineen pitoisuus reaktiossa, reaktion pH, puskurin vahvuus, ionivahvuus, kelaatti ylimäärä ja reaktioaika vaikuttavat suuresti reaktion lopputulokseen. Vasta-aineen pitoisuus reaktiossa sekä kelaatti ylimäärä määrittävät sen, paljonko reagoivia ryhmiä reaktiossa on eli montako mahdollista konjugaatioreaktiota voidaan ajatella muodostuvan.<sup>19</sup> Kelaatti ylimäärä valitaan kelaatin rakenteen ja ominaisuuksien perusteella.<sup>20</sup> Esimerkiksi hydrofiiliset ja hydrofobiset ominaisuudet vaikuttavat liukenemiseen ja reagointiin eri tavalla. Hydrofiiliset kelaatit liukenevat hyvin veteen, mutta ne reagoivat heikommin hydrofobisen proteiinin kanssa.<sup>21,40</sup> Tällöin reaktioon on lisättävä suuremmalla ylimäärällä kelaattia, jotta saavutetaan haluttu määrä reaktioita vasta-aineen kanssa.

Työssä käytettävät kelaatit ovat SCN-aktivoituja eli niissä on isotiosyanaatti-ryhmä  $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ , joka reagoi vasta-aineen pinnalla olevien aminoryhmien kanssa niiden ollessa muodossa  $\text{-NH}_2$  muodostaen tioureasidoksen.<sup>39</sup> Tällöin leimausreaktion pH:n tulee olla emäksinen, jotta reagoivia  $\text{-NH}_2$ -ryhmiä on riittävästi (taulukko 2).

Taulukko 2 pH:n vaikutus aminoryhmien muotoon

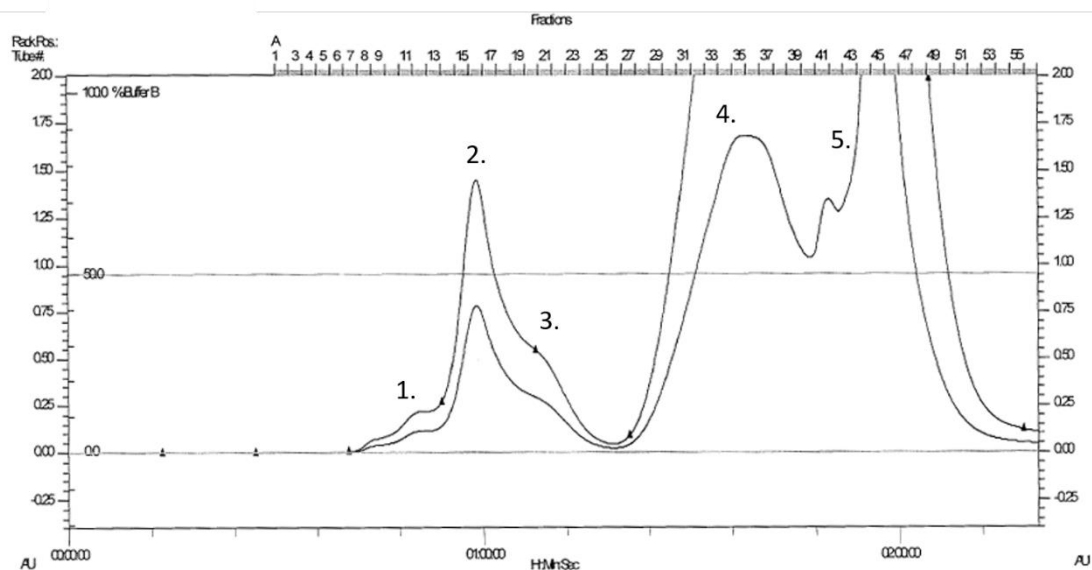
pH	$\text{NH}_2$ (%)	$\text{NH}_3^+$ (%)
8,4	10	90
9,4	50	50
10,4	90	10

Samalla tulee kuitenkin huomioida vasta-aineen korkean pH:n sietokyky sekä mahdollisten sivureaktioiden synty. Nopeat pH:n muutokset saattavat vaurioittaa tai tuhota proteiineja, joten käytettävien puskuriliuosten puskurointikapasiteetin täytyy olla riittävä puskurimaan pH:n muutoksia. Myös kelaattiliuosta lisätessä tulee huomioida nopeat olosuhteiden muutokset reaktioseoksessa. Kelaattiliuos on, etenkin suuremmissa erissä, syytä lisätä osissa, lisäysten välillä sekoittaen, jotta reaktioseos pysyy homogeenisena eikä muodosta ylimääräisiä saostumia ja sivureaktioita. Reaktioseoksen pH:ta on hyvä seurata kelaattiliuoksen lisäyksen jälkeen, ettei se laske tai nouse liikaa. Alhainen pH voi hidastaa sekä heikentää reaktiota ja korkea pH saattaa vaurioittaa vasta-ainetta. Reaktioseoksen inkubaatioaika ja lämpötila tulee pitää kontrolloituna, jotta reaktio pysyy tasaisena. Inkubaatioaikaa ja lämpötilaa muuttamalla voidaan tehostaa tai hidastaa reaktiota.

Reaktion olosuhteita määrittäessä tulee ottaa huomioon tavoiteltu leima-aste eli sitoutuneen leimareagenssin määrä vasta-ainetta kohden (Eu/IgG). Korkealla pH:lla ja alhaisella puskurin vahvuudella saadaan korkea leima-aste, mutta tällöin vasta-aineen affiniteetti eli sitoutumiskyky antigeeniin laskee. Alhainen pH ja korkea puskurin vahvuus johtavat vastaavasti hidastuneeseen reaktioon ja alhaiseen leima-asteeseen.

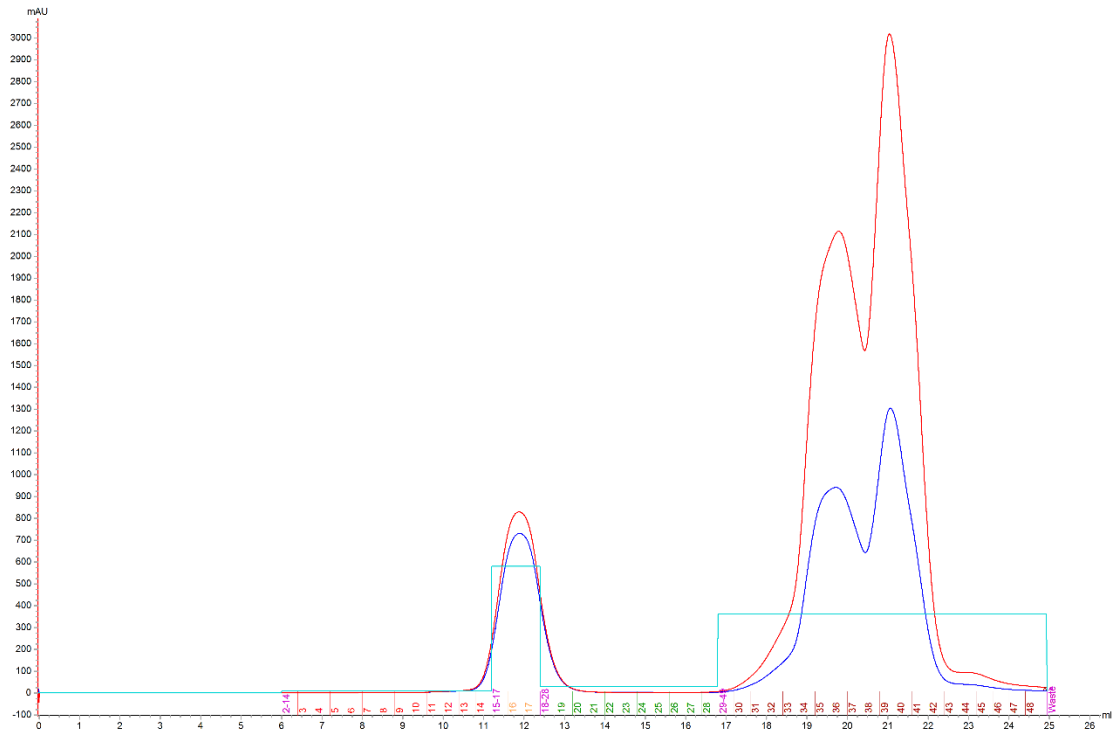
Reagoanut tuote ja reagoimaton osa reaktiosta voidaan puhdistaa usealla eri kromatografisella menetelmällä kuten ioninvaihtokromatografialla (IEC), korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC), affiniteettikromatografialla (AG) tai geelisuodatuskromatografialla (GPC & SEC). Eri menetelmät seuloivat puhdistettavan seoksen perustuen eri ominaisuuksien eroihin reagoineen ja reagoimattoman osan välillä. Tässä työssä käytettiin geelisuodatuskromatografiaa (SEC) puhdistusmenetelmänä. Siinä reaktioseos eluoidaan geelipylvään läpi, joka erottelee seoksen komponentit koon mukaan siten, että suurimmat molekyylit poistuvat ensimmäisenä pylväästä ja lopuksi tulevat pienimmät.<sup>22-23</sup> Tämä menetelmä sopii hyvin, jos eroteltavien komponenttien kokoero on suuri, kuten vasta-aineen (160 kDa) ja kelaattimolekyylin (1,5 kDa). Näin saadaan eroteltua sitoutumaton kelaatti sekä muut epäpuhtaudet erilleen varsinaisesta tuotteesta.

Geelipylväästä poistuva virtaus kulkee UV-detektorin läpi, joka mittaa halutulla tai halutuilla aallonpituuksilla läpi kulkevan nesteen absorptioita. Proteiinien tiedetään absorboivan aallonpituudella 280 nm ja työssä käytettävien kelaattien joko 340 nm tai 325 nm. Ohjelmisto piirtää detektorin vasteen perusteella kromatogrammin. Eri komponentit näkyvät kromatogrammissa omina piikkeinään. Kromatogrammin resoluutio määrittyy käytettävän pylvään ominaisuuksien, syötettävän näytemäärän ja näytteen komponenttien ominaisuuksien sekä käytetyn virtausnopeuden ja eluentin mukaan. Fraktioiden koko valitaan sen perusteella, miten tarkan poolauksen haluaa tehdä.<sup>24</sup> Tässä työssä käytettiin virtausnopeutta 0,2 mL/min ja fraktiokokoa 0,4 mL.



Kuva 6 Puhdistuskromatogrammin erilaisia piikkejä

Puhdistuskromatogrammi (kuva 6 ja kuva 7) voi sisältää useamman piikin ja piikkien muoto voi vaihdella. Ensimmäisenä tulee proteiiniapiikki. Ennen monomeerista leimattua vasta-ainetta (kuva 6, osa 2) voi olla vasta-aineen muodostama aggregaattiapiikki (kuva 6, osa 1), joka voi johtua proteiinin rakenteen muuttumisesta tai ristireagoinnista esimerkiksi korkean pH:n tai lämpötilan vaikutuksesta reaktiossa. Monomeeriapiikin jälkeen voi tulla fragmenttiapiikki (kuva 6, osa 3), joka voi olla esimerkiksi pilkkoutunutta vasta-ainetta. Aggregaatti- ja fragmenttiapiikit voivat näkyä myös proteiiniapiikin epäsymmetrisyytenä, jolloin piikki voi taipua jompaankumpaan suuntaan. Epäsymmetrisyyttä voi aiheuttaa myös muun muassa pylvään resoluution kärsiminen, epäpuhtaudet ja vasta-aineelle epäedulliset puhdistusolosuhteet. Proteiiniapiikin jälkeen tulee vasta-aineen kanssa reagoimattoman kelaatin piikki. Kelaattiapiikkejä voi olla useita. Kelaatti voi muun muassa hydrolysoitua, jolloin se reagoi vesimolekyylin kanssa, vastaanottaen siltä vetyionin, jolloin reaktiivisesta isotiosyanaattiryhmästä muodostuu aminoryhmä. Hydrolysoituneet kelaattimolekyylit voivat tällöin muodostaa kilpailevan reaktion, jossa muodostuu kelaattidimeerejä (kuva 6, osa 4) hydrolysoimattomien kelaattien kanssa. Kelaattidimeerien jälkeen tulee reagoimattoman osan piikki tai piikit (kuva 6, osa 5).<sup>25-26</sup>



Kuva 7 Esimerkki puhdistuskromatogrammista; UV<sub>280</sub> (sininen), UV<sub>340</sub> (punainen) ja poolaus (vaalean sininen).

Kromatogrammin perusteella päätetään mitkä fraktiot yhdistetään eli poolataan. Yhdistetyistä fraktioista muodostuu varsinainen puhdistettu tuote, joka testataan myöhemmin immunomäärityksessä. Fraktioinnissa huomioidaan vain proteiinipiikin alue, josta valitaan mahdollisimman paljon monomeerista leimattua vasta-ainetta sisältävät fraktiot. Reagoimattoman kelaatin piikkiä ei huomioida laskuissa. Puhdistetusta tuotteesta määritetään saantoprosentti sekä mitataan Europium- ja proteiinipitoisuus.

Esimerkeissä käytetään kuvan 7 puhdistustuloksen arvoja. Europium-pitoisuus ( $c_{\text{Europium}}$ ) määritetään UV-absorbanssispektrin avulla, jos saatavilla on tunnistettu tai arvioitu  $\epsilon$ -arvo. Jos arvoa ei ole saatavilla, pitoisuus määritetään vaihtoehtoisella menetelmällä. Tässä työssä vaihtoehtoinen menetelmä on kehitysliuosliuotusmääritys. Esimerkkilas-kussa yhdistetyistä fraktioista on tehty Europium-mittausta varten 1/6-laimennos ja molaarinen absorptiokerroin on  $55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

$$c_{\text{Europium}} = \frac{A(\lambda) * \text{laimennoskerroin}}{\epsilon * l} = \frac{0,345 * 6}{55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * 1} * 1\text{E}6 = 37,64 \mu\text{M}$$

Saantoprosentti määritetään kromatogrammista fraktioista yhdistettyjen fraktioiden alueen ja koko piikin eli koko puhdistetun proteiinimäärän alueen suhteesta (taulukko 3).

Taulukko 3 Fraktioinnin tulokset

Fraktiot	Kuvaus	Alue (ml*mAU)
2-14	Ennen tuotetta	44,5
15-17	Tuote	696,6
18-28	Tuotteen jälkeen	124,5
<b>Puhdistetun proteiinin alue</b> (ennen tuotetta, tuote ja tuotteen jälkeen)		<b>865,6</b>
<b>Tuotteen alue</b>		<b>696,6</b>

$$Saantoprosentti = \frac{\text{Tuotteen alue}}{\text{Puhdistetun proteiinin alue}} * 100 \% = \frac{696,6 \text{ ml*mAU}}{865,6 \text{ ml*mAU}} * 100\% = 80,5 \%$$

Proteiinipitoisuuden määrittystä varten lasketaan proteiinin massa tuotteessa. Proteiinin massa lasketaan leimausreaktioon käytetyn proteiinin massasta, joka on määritetty aikaisemmin puskurin vaihdon jälkeen. Esimerkissä reaktioon käytetty proteiinin massa on 1,42 mg.

$$m_{\text{Tuote}} = \frac{\text{saantoprosentti}}{100} * m_L = \frac{80,5 \%}{100} * 1,42 \text{ mg} = 1,143 \text{ mg}$$

$m_{\text{Tuote}}$  = Tuotteen proteiinin määrä ja  $m_L$  = Leimausreaktioon käytetty kokonaisproteiini määrä

Proteiinin pitoisuus lasketaan kaavalla:

$$c_{\text{Tuote}} = \frac{m_{\text{Tuote}}}{V_{\text{Tuote}}} = \frac{1,143 \text{ mg}}{1,122 \text{ mL}} = 1,019 \text{ mg/mL}$$

$c_{\text{Tuote}}$  = Tuotteen proteiinipitoisuus ja  $V_{\text{Tuote}}$  = Yhdistettyjen fraktioiden tilavuus

Yhdistettyjen fraktioiden tilavuus saadaan punnitsemalla tyhjä pullo ennen fraktioiden yhdistämistä sekä täytetty pullo. Nesteen tiheydeksi oletetaan veden tiheys eli 1,0 g/cm<sup>3</sup>.

Leima-asteen määrittämiseksi pitoisuus pitää muuntaa moolitilavuudeksi yksikössä μM.

$$c_{\text{Tuote M}} = \frac{c_{\text{Tuote}}}{M_{\text{proteiini}}} * 1E6 = \frac{1,019 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{160000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 1E6 = 6,369 \mu\text{M}$$

$c_{\text{Tuote M}}$  = Tuotteen pitoisuus moolitilavuutena ja  $M_{\text{proteiini}}$  = IgG:n tunnettu moolimassa

Leima-aste lasketaan:

$$\frac{c_{\text{Europium}}}{c_{\text{Tuote M}}} = \frac{37,64 \mu\text{M}}{6,369 \mu\text{M}} = 5,9$$

$c_{\text{Europium}}$  = Tuotteesta määritetty Europium-pitoisuus ja  $c_{\text{Tuote M}}$  = Tuotteen pitoisuus moolitilavuutena

Tuotteen stabiloimiseksi siihen lisätään 0,1 tilavuusprosenttia dietyleenitriamiinipenta-etikkahapolla puhdistettua naudan seerumin albumiinia eli DTPA-BSA-liuosta.

### 2.3 Kelaattien fotofysiaaliset mittaukset

Kelaattien fotofysikaalisista ominaisuuksia tutkittiin selvittämällä kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ), kvanttisaanto ( $\Phi$ ) ja molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ) sekä mittaamalla niiden emissio- ja viritysspektrit ja keskimääräinen elinikä.

Molaarisen absorptiokertoimen laskemiseksi on tunnettava mitattavan liuoksen Europium-pitoisuus, joka määritettiin tässä työssä kolmella eri pitoisuusmäärittelyllä. Kirkkaus määritettiin referenssin tunnettua kirkkausarvoa sekä tris-puskuri-luminesenssimäärittelyksestä saatua cps/conc-arvoa vasten verrannolla. Kvanttisaanto saadaan laskettua kirkkauden ja molaarisen absorptiokertoimen suhteesta.<sup>13,20,27</sup>

#### 2.3.1 Molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ), kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ) ja kvanttisaanto ( $\Phi$ )

##### **Molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ )**

Molaarinen absorptiokerroin eli  $\epsilon$ -arvo kuvaa mitattavan aineen kykyä absorboida syötettyä aallonpituutta yksiköllä  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  eli  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .  $\epsilon$ -arvo on ominainen jokaiselle aineelle, joka voidaan määrittää hyödyntämällä Lambert-Beerin lain kaavaa.

$$A(\lambda) = \epsilon cl \Rightarrow \epsilon = \frac{A(\lambda)}{cl}$$

## Kvanttisaanto ( $\Phi$ )

Kvanttisaanto on emittoituneiden fotonien ja absorptoituneiden fotonien suhde eli se kertoo suhdelukuna paljonko syötetystä energiasta siirtyy fluoresenssiksi.

$$\frac{\text{Kirkkaus } (\varepsilon\Phi)}{\text{Molaarinen absorptiokerroin } (\varepsilon)} = \text{Kvanttisaanto } (\Phi)$$

## Kirkkaus ( $\varepsilon\Phi$ )

Kirkkausarvon määrittävät molaarinen absorptiokerroin eli absorptoituneiden fotonien määrä ja kvanttisaanto. Kirkkaus kertoo, montako fotonia emittoituu eli siirtyy fluoresenssiksi.

Kirkkausarvo luoksessa eli tris-puskurissa lasketaan verrannolla referenssin kirjallisuudesta tunnettuja kirkkausarvoja ja tris-puskuri-luminesenssimäärittäyksessä mitattua signaali-konsentraatio-suhdetta (cps/conc) vasten. Oletus on, että kirkkaus määräytyy samassa suhteessa myös muilla kelaateilla.

$$\frac{\text{REF } (\varepsilon\Phi)}{\text{REF } (\frac{\text{cps}}{\text{conc}})} * \text{TEST } (\frac{\text{cps}}{\text{conc}}) = \text{TEST } (\varepsilon\Phi)$$

Kuivattuna eli immunomääritysmittauksessa kirkkausarvo lasketaan verrannolla referenssin tunnettua kirkkausarvoa kuivattuna sekä signaali per Europium suhdetta vasten. Laskuissa käytetään korkean pitoisuuden standardinäytettä, jotta taustan vaikutus saadaan laskettua minimiin.

$$\frac{\text{REF } (\varepsilon\Phi)}{\text{REF } (\frac{\text{cps}}{\text{Eu}})} * \text{TEST } (\frac{\text{cps}}{\text{Eu}}) = \text{TEST } (\varepsilon\Phi)$$

### 2.3.2 Europium-pitoisuusmääritykset

Tässä työssä kelaattien Europium-pitoisuutta mitattiin leimatusta vasta-aineliuoksesta kolmella eri menetelmällä; UV-absorbanssin kautta, kehitysliuosmäärityksellä sekä ICP-MS-menetelmällä.

## UV-absorbanssi

Mitattavan näytteen pitoisuus voidaan määrittää mittaamalla näytteen absorptio UV-spektrofotometrialla. Mitattava absorbanssi on suoraan verrannollinen pitoisuuteen ja valon kulkemaan matkaan. Tällöin näytteen pitoisuus saadaan käyttämällä Lambert-Beerin lakia, jos kaikki kaavan vaadittavat tekijät ovat tiedossa.

$$A(\lambda) = \varepsilon cl \Rightarrow c = \frac{A(\lambda)}{\varepsilon l}$$

$A(\lambda)$  = absorbanssi,  $\varepsilon$  = molaarinen absorptiokerroin ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $c$  = konsentraatio ( $\text{mol/L}$ ) ja  $l$  = valon kulkema matka näyteliuksessa ( $\text{cm}$ ).

Absorbanssi on lukuarvo, joka kertoo paljonko mitattava aine absorboi eli sitoo sen läpi säteilytettyä sähkömagneettista säteilyä. Jokaisella aineella on absorbtiomaksimi, joka on aallonpituus, jossa se absorboi tehokkaimmin. Se määritetään mittaamalla absorptiospektri, joka näyttää määritetyltä aallonpituusväliä eri aallonpituuksilla muodostuvan absorption.<sup>28</sup> Tässä työssä käytettävien kelaattien absorbtiomaksimien tiedetään olevan aallonpituusväillä 320-350 nm ja leimatun vasta-aineen aallonpituudessa 280 nm, joten mittauksissa käytettiin mittaussväliä 250-400 nm.

## Kehitysluosmäärittäminen

Tris-puskurissa olosuhteet ovat otolliset tutkittaville kelaateille, jolloin sen tila pysyy stabiilina. Kehitysluoksen lisääminen laskee pH:ta, jolloin olosuhteet muuttuvat otolliseksi kehitysluoksen ligandille ja epäedullisiksi tutkittavalle kelaatille. Tutkittavan kelaatin -COO<sup>-</sup>-ryhmät protonoituvat -COOH-ryhmiksi, jolloin karboksyylihapon koordinoituminen Eu<sup>3+</sup>-ioniin heikkenee. Tällöin kehitysluoksen ligandi pystyy muodostamaan vahvemman sidoksen Eu<sup>3+</sup>-ioniin sille edullisissa reaktio-olosuhteissa.<sup>29</sup>

Kehitysluosmäärittämisessä<sup>30-31</sup> leimatusta vasta-aineliuksesta tehdään kehitysluokseen (EFI eli Europium Fluorescence Intensifier) kaksi rinnakkaista laimennossarjaa taulukon 4 osion A esittämällä laimennoksilla, joita verrataan valmistettuun 100 mM Eu-standardista valmistettuun laimennossarjaan (taulukko 4 osio C). Laimennossarja inkuboidaan huoneenlämmössä 45 minuuttia ennen kuoppalevylle pipetointia ja mittaamista fluorometrillä. Kuoppalevylle pipetoidaan sekä laimennoksia että Eu-standardeja 200 µl

3 rinnakkaisnäytettä per rinnakkaislaimennos. Taustaa eli kehitysliuosta pipetoidaan 12 rinnakkaisnäytettä.

Tietyn stabiilin rakenteen omaavat kelaatit eivät luovuta Europiumia kehitysliuokseen, joten niistä ei Europium-pitoisuutta voi tällä menetelmällä määrittää. Tietyistä kelaateista voidaan pitoisuus kuitenkin määrittää, jos  $\text{Eu}^{3+}$ -ioni dissosioidaan happokäsittelyllä käyttäen vahvaa happoa. Tällöin pH ja reaktion tasapaino saadaan siirtymään kehitysliuoksen komplekseille edulliseksi jo ennen kehitysliuoksen lisäämistä.

Tallaiset leimalaimennokset käsiteltiin ensin laimentamalla ne 0,5 M HCl-liuokseen inkuboiden niitä huoneenlämmössä 45 minuuttia, jonka jälkeen niistä valmistetaan laimennossarjat kehitysliuokseen. On kuitenkin huomioitava, että HCl laskee kehitysliuoslaimennoksen pH:ta, mikä häiritsee kehitysliuoksen fluoresenssiä, joten laimennoksia on tehtävä useampi ennen kuin päästään mitattavalle alueelle laimennoksissa. Näissä tilanteissa laimennossarjat tehtiin taulukon 4 osion B esittämillä laimennoksilla.

Taulukko 4 Kehitysliuosliuotuksessa käytetyt laimennossarjat A, B ja C

A		B		C	
Laimennoskerroin	Laimennin	Laimennoskerroin	Laimennin	Laimennoskerroin	Laimennin
100	Kehitysliuos	100	HCl	100	Kehitysliuos
10000		1000	Kehitysliuos	200	
125000		5000		400	
250000		10000			
500000		25000			
2500000		50000			
12500000		125000			
		250000			
		500000			
		2500000			
		12500000			

Näytelaimennoksen Europium-pitoisuus lasketaan Eu-standardisarjaa vasten kaavalla:

$$\frac{\text{Näytteen cps}}{\text{Europium} - \text{std cps}} * \text{Näytteen laimennoskerroin} * \text{Europium} - \text{std konsentraatio}$$

Kaavassa käytettävä näytelaimennos valitaan siten, että sen antama signaalitaso osuu standardisuoralle.

## ICP-MS

Induktiivisesti kytketty plasma massaspektrometria eli ICP-MS perustuu näytteen molekyylien hajottamiseen atomitasolle, ionien muodostamiseen ja niiden mittaukseen massaspektrofotometrialla. Syötetty näyte kulkee plamasoihdun eri vyöhykkeiden läpi, jossa se käy läpi korkeassa lämpötilassa kuivauksen, höyrystyksen, sumutuksen ja lopulta ionisoinnin. Sumutuksen aikana näyte on pilkkoutunut atomitasolle eli atomisoitunut. Ioni-soitu näytevirta ajetaan massaspektrofotometrin läpi, joka erottelee ne massa-varaus-suhteella.<sup>32-33</sup>

Leimatuista vasta-aineliuoksista tehtiin 1/200-laimennos 50 mM tris-puskuriin. Näyte pilkottiin kuumentamalla se vahvojen happojen sekoituksessa (vetyperoksidi  $\text{HNO}_3$  ja typpihappo  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ennen laitteistoon syöttämistä. Pitoisuus määritetään kalibroitua standardisuoraa vasten.<sup>34</sup>

Menetelmää käytetään varmentamaan UV-mittauksen sekä kehitysliuosmäärittäyksen antamia tuloksia, koska tällä menetelmällä voidaan määrittää pitoisuus myös sellaisista ke-laateista, joista ei voida kehitysliuosmenetelmällä määrittää pitoisuutta.

ICP-MS-määritykset suoritettiin ulkopuolisen toimijan toimesta.

### 2.3.3 Tris-puskuri-luminesenssimäärittäminen

Tris-puskuri-luminesenssimäärittäyksessä leimatusta vasta-aineliuoksesta tehdään tris-puskuriin kaksi rinnakkaista laimennossarjaa taulukon 5 mukaisesti ja mittaamalla siitä fluoresenssi.<sup>19</sup> Määrittäminen tehdään kehitysliuosliuosmäärittäyksen yhteydessä, jolloin laskukaavassa käytetään määrittäyksestä saatua konsentraatiota ja standardisuoraa.

Taulukko 5 Tris-puskuri-luminesenssimäärittelyn laimennossarja

Laimennoskerroin	Laimennin
100	Tris-puskuri
1000	
5000	
25000	
125000	
625000	

Laskukaavassa käytettävä näyte laimennuskertoiminen valitaan siten, että sen antama signaalitaso osuu standardisuoralle.

$$\frac{\text{Näytteen cps} * \text{näytteen laimennoskerroin}}{\text{konsentraatio}}$$

Tuloksena saadaan signaalin määrä per konsentraatio, jota käytetään laskiessa kirkkaus eli  $\epsilon\Phi$ -arvoa liuoksessa.

#### 2.3.4 Viritys-, emissio- ja elinikämittaukset

##### Viritys- ja emissiospektrit

Viritysspektri mitattiin pääsääntöisesti aallonpituusvälillä 280-400 nm. Emissiospektri mitattiin aallonpituusvälillä 580-720 nm. Spektreistä selvitettiin kelaatin emissio- sekä viritysmaksimi aallonpituudet.<sup>8,35</sup>

##### Elinikä

Elinikämittausta varten tarvitaan sekä viritys- että emissiomaksimi aallonpituudet. Saaduista tuloksista lasketaan keskimääräinen elinaika eli  $\tau$ . Työssä käytettävien Europium-kelaattien keskimääräisen eliniän tiedetään olevan noin 1 ms.<sup>8,35</sup>

## 3 MATERIAALIT JA VÄLINEET

### 3.1 Käytettävät laitteistot

Leimattu vasta-aine puhdistettiin käyttämällä ÄKTA Pure (GE Healthcare) -kromatografialaitteistoa ja Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) geelipylvästä.

Absorbanssimittaukset tehtiin UV-1800 (Shimadzu) UV-Vis-spektrofotometrillä.

Fluoresenssimittaukset tehtiin Victor X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) -fluorometrillä.

Viritys-, emissio- ja elinikämittaukset tehtiin Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies) -spektrofluorometrillä.

ICP-MS-mittaukset toteutettiin ulkopuolisen yrityksen toimesta.

Immunomäärytyksissä käytettiin levyravistelijaa DELFIA® PlateShake 1296-003 (Wallac), levypesureita DELFIA® Platewash 1296-026 (Wallac), inkubaattoria Labsystems iEMS Incubator/Shaker (Thermo Fisher Scientific) ja levykuivainta (RTKU RD).

Kuivattu lopputuote testattiin AQT90 FLEX (Radiometer Medical ApS) immunoanalyysaattorilla.

### 3.2 Vasta-aineet

Leimavasta-aineena käytettiin monoklonaalista N-terminaalista proBNP -vasta-ainetta 18H5 (Hytest).

Immunomäärytyksissä käytettiin RTKU tuotekehityksessä tuotettua biotinyloitua sitoja-vasta-ainetta sekä leimavasta-ainetta, jota käytettiin referenssinä.

### 3.3 Puskurit ja muut materiaalit

Vasta-aineen puskurinvaihto tehtiin illustra NAP-5 (GE Healthcare) pylväillä.

Leimausreaktiossa reaktiopuskurina käytettiin 200 mM natriumkarbonaattipuskuria.

Leimausreaktion puhdistuksessa eluenttina käytettiin RTKU tuotettua tris-saliini-atsidipuskuria (50 mM TRIS, 0,9 % NaCl, 0,5 %  $\text{NaN}_3$ , pH7,75).

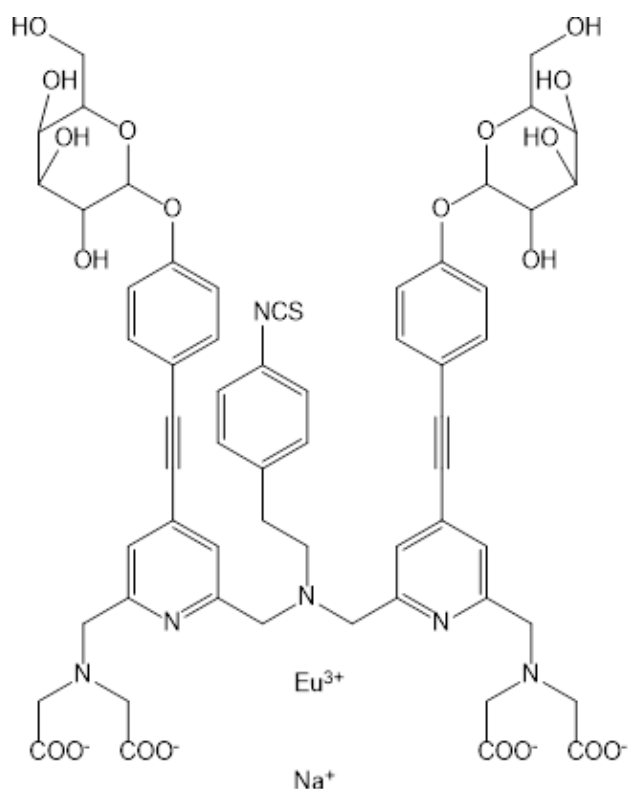
Leimatun vasta-aineen stabilointiin käytettiin dietyleenitriamiinipentaetikkahapolla puhdistettua naudan seerumin albumiinia (DTPA-BSA) (PerkinElmer)

Immunomäärityksessä käytettiin RTKU tuotettuja streptadiviini päällystettyjä muovikuppeja, välikerrosta, pesuliuoksia sekä puskureita.

Kehitysluosmäärityksessä käytettävä kehitysluos on Europium Fluorescence Intensifier eli EFI (Kaivogen Oy).

### 3.4 Leimareagenssit

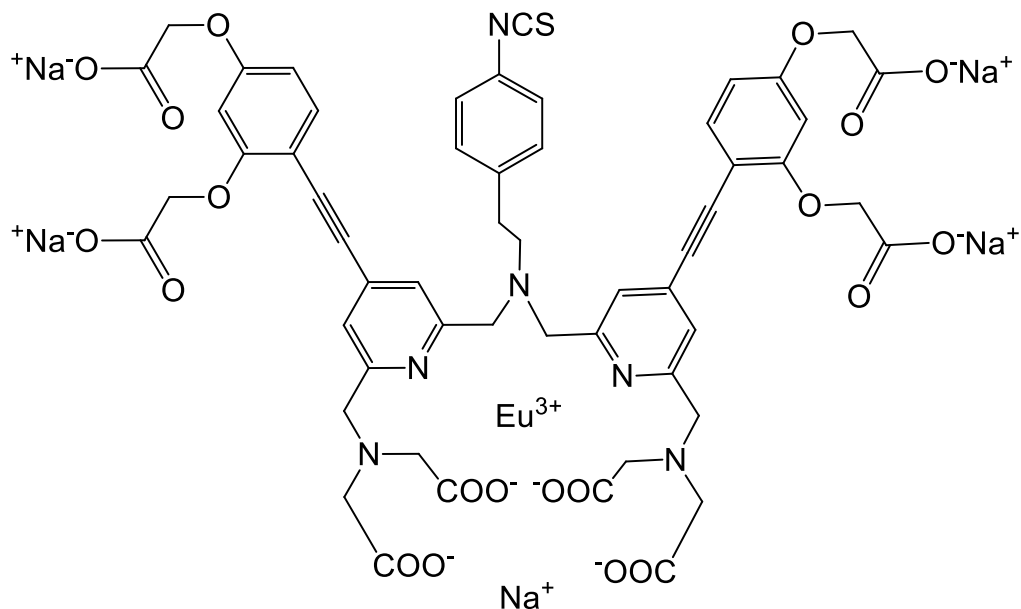
Kuvassa 8 on referenssinä käytettävän kelaatin rakennekaava. Työssä tähän viitataan lyhenteellä REF.



Kuva 8 Referenssikelaatti<sup>21,36</sup>

## Testattavat kelaatit

Kuvassa 9 on RTKU1-kelaatin rakennekaava.



Kuva 9 RTKU1-kelaatti<sup>34</sup>

Loput neljä testattavaa kelaattia (RTKU2-RTKU5) ovat rakenteeltaan samankaltaisia kuin edellä mainitut.

### 3.5 Näytteet ja standardit

Leimattujen vasta-aineiden testauksessa immunomäärityksessä käytettiin neljässä eri matriisissa eli väliaineessa olevia näytteitä, joihin on liuotettu haluttu pitoisuus NT-proBNP-antigeeniä. Käytettävät näytteet ovat listattuna taulukossa 6. Standardinäytteissä matriisina on 4 % naudan seerumin albumiinia liuotettuna tris-saliini-atsidi-puskuuriin eli 4 % BSA-TSA. Kontrollinäytteessä matriisina on ihmisen plasman seerumi. Lisäksi käytettiin kahta eri potilasnäytelaimennosta, jotka valmistettiin sekoittamalla kaupallinen potilasnäyte samaa antikoagulanttia eli hyytymisenestoainetta (litium hepariini ja EDTA) sisältävään plasmaan.

Taulukko 6 Immunomäärityksissä käytetyt näytteet

Näyte	NT-proBNP-pitoisuus (ng/L)	Matriisi
Standardi A	0	4% BSA-TSA
Standardi D	58,2 tai 57,3	4% BSA-TSA
Kontrollinäyte Low	72,4	Seerumi
Standardi E	98,6	4% BSA-TSA
LiHep-potilasnäyte	83	LiHep-plasma
EDTA-potilasnäyte	109	EDTA-plasma
Standardi G	472	4% BSA-TSA
Standardi I	5640	4% BSA-TSA
Standardi K	62329	4% BSA-TSA

Työssä käytetään eri matriiseissa olevia näytteitä, jotta määrittelyn matriisivaikutus eli eri matriisien vaikutus immunomääritykseen saadaan näkyviin. Kaksi käytetyintä koagulanttia potilasnäytteissä ilmentävät mahdollista määrittelyn interferenssiä niitä kohtaan. Kaikki näytteet ovat RTKU tuotekehityksessä tuotettuja.

## 4 TULOKSET

### Fotofysikaalisten ominaisuuksien mitta

Jokaisesta leimatusta vasta-aineesta määritettiin Europium-pitoisuus kolmella eri menetelmällä, lukuun ottamatta RTKU4, jonka rakenne ei kehitysliuosmäärittystä tukenut, sekä määritettiin tris-puskuri-luminesenssi per pitoisuusyksikkö. Saaduista tuloksista laskettiin molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ), kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ) sekä kvanttisaanto ( $\Phi$ ). Immunomääritysten tuloksista laskettiin kirkkaus kuivattuna.

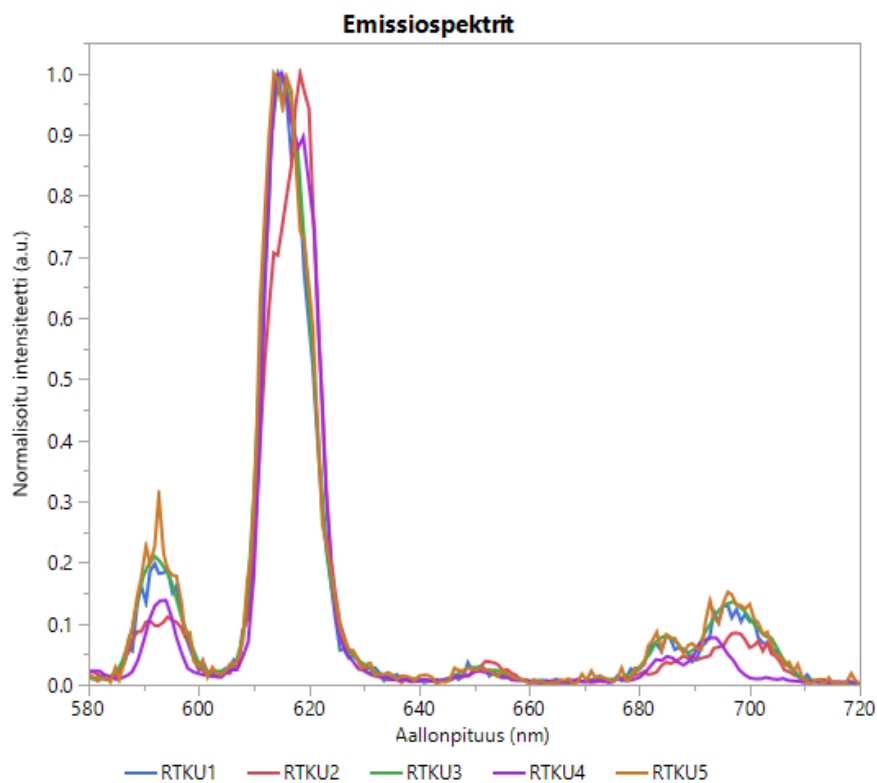
Europium-pitoisuutta tarvitaan molaarisen absorptiokertoimen laskemiseen. Laskennassa käytettävä pitoisuus valitaan menetelmän arvioidun luotettavuuden ja toistettavuuden perusteella. UV-määrittäksessä käytettävä molaarinen absorptiokerroin on yleisesti kelaatin rakenteen perusteella arvioitu lukuarvo. Tällöin saatu pitoisuus voi poiketa muista määrittäksistä saatavista arvoista, jos arvio ei ole täysin kohdallaan. Tuloksiin valittiin käytettäväksi joko yhden luotettavimmaksi arvioidun menetelmän mukaan määritetty pitoisuus tai kahden tai kaikkien määrittäysten keskiarvo, jos näistä saadut pitoisuudet olivat likimain samat.

Leimatuista vasta-aineista mitattiin myös kelaatin elinikä, josta laskettiin keskimääräinen elinikä sekä viritys- ja emissiospektrit, joista tunnistettiin viritys- ja emissiomaksimi aallonpituudet.

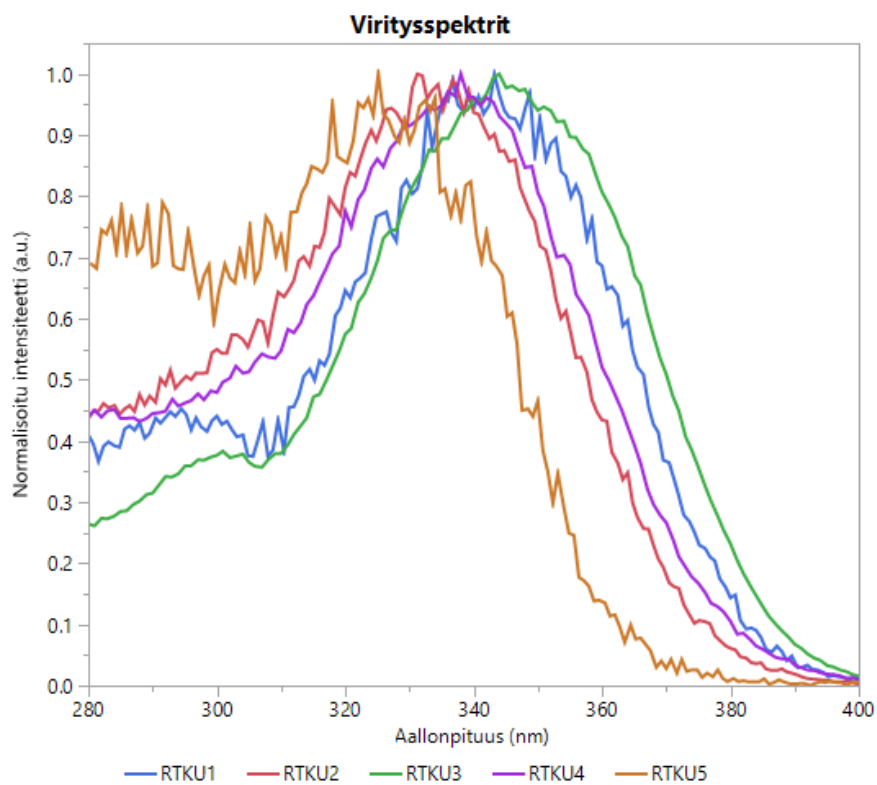
Viritys- ja emissiospektrit mitattiin taulukon 7 mukaisilla asetuksilla ja saadut spektrit ovat esitettyinä kuvissa 10 ja 11.

Taulukko 7 Viritys- ja emissiospektrimittausten asetukset

Asetus	Viritysspektri	Emissiospektri
Skannauksen aloitusaallonpituus (nm)	280	580
Skannauksen lopetusaallonpituus (nm)	400	720
Viritysrako (nm)	5	10
Emissiorako (nm)	10	5
Skannausnopeus (nm/min)	12000	
Datapisteväli (nm)	0,8	
Valomonistinputken jännite (V)	1000	



Kuva 10 Emissiospektrit



Kuva 11 Viritysspektrit

Emissiospektreistä (kuva 10) nähdään kaikkien kelaattien emittoivan tehokkaimmin samalla aallonpituudella, joka on noin 615 nm. Viritysspektreistä (kuva 11) voidaan havaita kelaattien RTKU1-RTKU4 viritysaallonpituusmaksimien olevan noin 340 nm ja RTKU5 noin 325 nm.

Elinikämittaus tehtiin taulukon 8 mukaisilla asetuksilla.

Taulukko 8 Elinikämittausten asetukset

Asetus	Elinikämittaus
Viiveaika (ms)	0,02
Virityspulssien määrä	1
Mittausaika (ms)	1
Maksimi viritysaallonpituus (nm)	Määritettiin viritysspektristä
Maksimi emissioaallonpituus (nm)	Määritettiin emissiospektristä
Viritysrako (nm)	20
Emissiorako (nm)	20
Odotusaika (ms)	0,001
Syklien määrä	500-1000

Molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ), kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ), kvanttisaanto ( $\Phi$ ), emissiomaksimi ( $\lambda_{em}$ ) ja viritysmaksimi ( $\lambda_{ex}$ ) sekä keskimääräinen elinikä ( $\tau$ ) ovat esitettynä taulukossa 9. Referenssin arvot perustuvat kirjallisuuden arvoihin.<sup>21,34</sup> RTKU3a ja RTKU3b ovat NT-proBNP-vasta-aineeseen sidottuna. RTKU3x ja RTKU3y ovat TnI- ja PCT-vasta-aineisiin sidottuina.

Taulukko 9 Molaarinen absorptiokerroin ( $\epsilon$ ), kirkkaus ( $\epsilon\Phi$ ), kvanttisaanto ( $\Phi$ ), emis-  
siomaksimi ( $\lambda_{em}$ ) ja viritysmaksimi ( $\lambda_{ex}$ ) sekä elinikä ( $\tau$ )

Kelaatti	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon\Phi$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$\epsilon\Phi$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$\Phi$ (%)	$\tau$ (ms)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\lambda_{ex}$ (nm)
REF	56000	4800	8000	9	1.01	615	325
RTKU1	57000	7200	16000 <sup>c</sup>	13	0.95	614	343
RTKU2	95000 <sup>d</sup>	20000 <sup>d</sup>	11000 <sup>d</sup>	16	0.85	618	331
RTKU3a	137000	6500	30000 <sup>e</sup>	5	0.99	615	344
RTKU3b	130000	7100	25000 <sup>e</sup>	5	-	-	-
RTKU3x	127000	6306	40000	5	-	-	-
RTKU3y	134000	7557	39000	6	-	-	-
RTKU4	89000	8900	18000	10	0.66	615	338
RTKU5	36000	1400	3400	4	0.96	613	325

<sup>a</sup> Kirkkaus  
Tris-pusku-  
rissa

<sup>b</sup> Kirkkaus kui-  
vattuna

<sup>c</sup> RTKU1 kirkkausarvossa kuivattuna havaittiin poikkeavuutta märkäimmunomäärityksen ja kuivaimmunomäärityksen välillä. Tämä käsin tehtävä määrittäminen antaa selkeästi alem-  
paa kirkkautta kuin analysaattorimääritys. Siinä myös saatujen signaalien variaatioker-  
roin on korkea matalilla pitoisuuksilla, mikä vääristää testin luotettavuutta. Tuloksiin va-  
littiin analysaattorin tulosten perusteella laskettu kirkkausarvo, koska se on lähempänä  
aikaisempien tutkimusten saamia tuloksia.<sup>34</sup>

<sup>d</sup> RTKU2 kelaatin molaarinen absorptiokerroin kehitysluosmäärityksen kautta saadun  
Eu-pitoisuuden avulla laskettuna antaa arvon 120000, joka on kelaatin rakenteen perus-  
teella arvioituna liian korkea.<sup>20</sup> Arvioitu arvo ja ICP-MS-määrityksen kautta laskettu arvo  
ovat todennäköisemmin lähempänä totuutta. Tuloksissa käytetään arvioitujen ja ICP-  
MS-kautta laskettujen arvojen keskiarvoa.

RTKU2 kirkkausarvo laskee kuivauksen jälkeen. Tämä on poikkeavaa, koska kelaattien  
fluoresenssin tiedetään kasvavan kuivauksen jälkeen.<sup>37</sup> Mahdollinen selitys poikkeaville  
tuloksille on, ettei käytettävä määrittäminen ole optimaalinen olosuhteiltaan kelaatille ja tämän  
seurauksena sen toimivuus laskee.

<sup>e</sup> Sekä RTKU3a- että RTKU3b-kelaatin märkäimmunomääritysten tulokset antavat poik-  
keavia tuloksia verrattuna analysaattorin tuloksiin. Märkäimmunomääritykseen liittyvien  
epäselvyyksien takia kirkkausarvo perustuu vain analysaattorin tuloksista laskettuihin ar-  
voihin, koska ne ovat linjassa RTKUx:n ja RTKUy:n tulosten kanssa.

## Vasta-aineiden leimaus kelaateilla

Kaikista testattavista kelaateista tehtiin 2 mg vasta-aineleimaus. Reaktion vasta-ainepitoisuus oli 1,5 mg/mL, inkubaatioaika 17-18 h, pH 9,60 ± 0,05 ja puskuripitoisuus 200 mM. Reaktiot inkuboitiin huoneenlämmössä. Kelaatti ylimäärä arvioitiin kelaattikohtaisesti. Tavoite leima-asteet vaihtelivat välillä 4-10. Kelaatti ylimäärät, tavoite leima-asteet ja saavutettu leima-aste ovat esitettynä taulukossa 10.

RTKU3-kelaatilla vasta-aineleimaus toistettiin NT-proBNP-leimausmenetelmällä (RTKU3a ja RTKU3b). RTKU3-kelaatti leimattiin lisäksi myös troponiini I eli TnI- sekä prokalsitoniini eli PCT -leimausmenetelmillä kelaatin toimivuuden varmentamiseksi. TnI ja PCT-leimausmenetelmien olosuhteet ovat samankaltaiset kuin NT-proBNP-leimausmenetelmässä. RTKU3x on RTKU3-kelaatti TnI-vasta-aineeseen sidottuna ja RTKU3y on PCT-vasta-aineeseen sidottuna.

Taulukko 10 Kelaatti ylimäärät, tavoiteltu leima-aste ja saavutettu leima-aste

Kelaatti	Kelaatti ylimäärä	Tavoite Eu/IgG	Saavutettu Eu/IgG
REF	65x	-	13.2
RTKU1	90x	5-8	8.3
RTKU2	50x	4-6	4.9
RTKU3a	270x	8-10	1.9
RTKU3b	400x	8-10	10.8
RTKU3x	380x	8-10	10.9
RTKU3y	250x	8-10	5.4
RTKU4	150x	4-6	3.7
RTKU5	70x	4-6	5.3

## Testaus märkäimmunomäärityksessä

Europium-kelaateilla leimatut vasta-aineet testattiin kaikki samoilla näytteillä ja samoilla testiparametreilla.

Sitojavasta-ainetta annosteltiin 200 ng / 50 µL per kuoppa ja sitä inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä hitaalla sekoituksella. Kupit pestiin 2\*300 µL pesuohjelmalla. Näytteitä annosteltiin 30 µL per rinnakkainen näyte taulukon 11 mukaiset määrät.

.

Taulukko 11 Märkäimmunomäärityksissä käytettävät näytteet

Näyte	Pitoisuus (ng/L)	Rinnakkaisnäytteiden määrä
Standardi A	0	96
Standardi D	58.2	12
Kontrollinäyte Low	72.4	12
Standardi E	98.6	12
Potilasnäyte LiHep	92	6
Potilasnäyte EDTA	109	6
Standardi G	472	4
Standardi I	5640	4
Standardi K	62329	4

Leimavasta-ainetta välikerroksessa annosteltiin 125 ng / 10 µL per kuoppa. Reaktiota inkuboitiin 13 minuuttia 37 °C lämpötilassa 900 rpm ravistelussa. Kupit pestiin 6\*300 µL pesuohjelmalla ja kuivattiin 65 °C lämpötilassa 4 minuutin ajan. Ennen mittausta fluoro-metrillä kuppien annettiin jäähtyä 5 minuuttia.

Variaatiokerroin pysyi määrittelyssä 10 prosentin luokassa lukuun ottamatta RTKU1 ja RTKU5:tä. Kummassakin variaatiokerroin nousi lähemmäs 20 prosenttia matalien pitoisuuksien näytteillä, mikä vääristää testin luotettavuutta. Alle 10 prosentin variaatiokerrointa käsin tehtävässä määrittelyssä voidaan pitää hyvänä. RTKU3b ei tunnistanut potilasnäytteitä lainkaan, joten niitä ei huomioitu laskuissa.

Mittausten tuloksista seurattiin taustan kehittymistä, herkkyttä ja cps/conc/Eu-arvon muutosta. Herkkyys laskettiin oletetulla 10 % variaatiokertoimella, jotta tuloksia voidaan verrata keskenään. Taulukossa (taulukko 12) herkkyys ilmoitetaan määrittelyssä olleiden näytteiden keskiarvona. Cps/conc/Eu -arvo laskettiin kolmen korkeimman standardinäytteen keskiarvosta.

Märkäimmunomääritysten tulokset ovat esitettyinä taulukossa 12.

Taulukko 12 Märkäimmunomääritysten tulokset

Kelaatti	Tausta (cps)	Herkkyys 10% CV (ng/L)	<u>Cps/conc/Eu (TEST)</u> <u>Cps/conc/Eu (REF)</u>
REF	337	9,7	1,0
RTKU1	350	10,4	1,4
RTKU2	379	30,3	1,4
RTKU3a	332	19,8	3,2
RTKU3b	656	12,6 <sup>1</sup>	1,5 <sup>1</sup>
RTKU3x	262	-	2,4
RTKU3y	329	-	4,6
RTKU4	332	12,9	2,1
RTKU5	307	36,1	0,4

<sup>1</sup> Potilasnäytteitä ei huomioitu laskuissa.

RTKU3x:n ja RTKU3y:n testauksissa käytettiin referenssinä analyttikohtaista referenssi vasta-ainetta.

### Testaus kuivaimmunomäärityksessä

Märkäimmunomääritystulosten perusteella valikoitiin kuivakuppi valmistukseen lupaavimmat ehdokkaat; RTKU1, RTKU3a ja RTKU3b (taulukko 13). Valintaperusteena olivat cps/conc/Eu-arvo, taustasignaali ja näytteiden tunnistus immunomäärityksessä. RTKU4 vaikutti myös lupaavalta mutta aikataulullisista syistä se priorisoitiin pois. RTKU3b valittiin RTKU4:n tilalle, koska haluttiin nähdä, miten korkean leima-asteen versio käyttäytyy kuivattuna. Kuivakupit valmistettiin NT-proBNP-projektin toimesta.

Taulukko 13 Märkäimmunomääritysten perusteella kuivaimmunomääritykseen valitut vahvennettu

Kelaatit	Cps/conc/Eu	<u>Cps/conc/Eu (TEST)</u> <u>Cps/conc/Eu (REF)</u>
REF	0.8	-
RTKU1	1,1	1,4
RTKU2	1,1	1,4
RTKU3a	2,5	3,2
RTKU3b	1.3	1,5
RTKU4	1.7	2,1
RTKU5	0.3	0,4

Valmistetut testikasetit testattiin taulukon 14 mukaisilla näytteillä.

Taulukko 14 Kuivaimmunomäärityksissä käytetyt näytteet

Näyte	Pitoisuus (ng/L)	Rinnakkaisnäytteiden määrä
Standardi A	0	10
Standardi D	57,3	10
Kontrollinäyte Low	72.4	10
Potilasnäyte LiHep	83	5
Potilasnäyte EDTA	109	5
Standardi G	472	5
Standardi I	5640	5
Standardi K	62329	5

Valmistetut kuivakupit testattiin AQT90 FLEX -immunoanalysaattorilla.

Variaatiokerroin pysyi määrityksissä noin 5 prosentin luokassa kaikilla muilla paitsi RTKU3b:llä, jolla se nousi noin 13 prosenttiin. RTKU1 ja RTKU3b eivät tunnistanee potilasnäytteitä lainkaan, joten niitä ei huomioitu laskuissa. RTKU3b:lla seerumipohjainen näyte antoi pitoisuuteen nähden poikkeavaa signaalia, joten se jätettiin myös pois laskuista.

Mittausten tuloksista seurattiin niin ikään taustan kehittymistä, herkkyyttä (oletetulla 10 % variaatiokertoimella) ja cps/conc/Eu-arvon muutosta.

Kuivaimmunomääritysten tulokset ovat esitettyinä taulukossa 15.

Taulukko 15 Kuivaimmunomääritysten tulokset

Kelaatti	Tausta (cps)	Herkkyys 10% CV (ng/L)	<u>Cps/conc/Eu (TEST)</u> <u>Cps/conc/Eu (REF)</u>
REF	545	4,8	1,0
RTKU1	2 114	12,5 <sup>2</sup>	2,0 <sup>2</sup>
RTKU3a	530	9,2	3.8
RTKU3b	15 912	36,2 <sup>3</sup>	3.1 <sup>3</sup>

<sup>2</sup> Potilasnäytteitä ei huomioitu laskuissa. <sup>3</sup> Laskuissa ei huomioitu potilasnäytteitä eikä seeruminäytettä.

## 5 POHDINTA

Aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään, että RTKU1-kelaatti on noin kaksi kertaa referenssikelaattia kirkkaampi Tnl-vasta-aineeseen leimattuna.<sup>34,38</sup> Tässä työssä RTKU3-kelaatin arvioitiin olevan noin kaksi kertaa kirkkaampi kuin RTKU1 eli noin neljä kertaa kirkkaampi kuin referenssikelaatti.

Tutkimuksen tulosten perusteella RTKU1-kelaatti on tris-puskurissa 1,4 kertaa kirkkaampi ja kuivattuna kaksi kertaa kirkkaampi kuin referenssi, mutta potilasnäytteiden tunnistus laski kuivauksen seurauksena. Sen kirkkausarvo märkäimmunomäärityksen tuloksien kautta laskettuna on alempi, kuin kuivaimmunomääritysten tulosten kautta laskettuna. Analysaattoriajojen tulosten kautta laskettu arvo on lähempänä aikaisempien tutkimusten määrittämää arvoa, joten käsin tehtävän määrityksen tulosta voidaan pitää poikkeavana.

RTKU2-kelaatin kirkkaus laski lähes puoleen kuivauksen jälkeen. Kelaattien fluoresenssin tiedetään nousevan kuivauksen seurauksena, mutta kuivaus voi laskea vasta-aineen toimivuutta.<sup>37</sup> On mahdollista, ettei käytettävä määritys ole olosuhteiltaan optimaalinen RTKU2-kelaatille, jolloin sen toimivuus määrityksessä laskee. Lisäksi on mahdollista, että käytettävä vasta-aine on vaurioitunut kuivauksen aikana. Tämä voi selittää potilasnäytteiden heikon tunnistuskyvyn sekä alhaisemman kirkkausarvon.

RTKU3a on hivenen alle neljä kertaa kirkkaampi ja RTKU3b noin kolme kertaa kirkkaampi kuin referenssikelaatti. Korkealla leima-asteella RTKU3-kelaatin ominaisuudet kärsivät kuivauksesta enemmän. On mahdollista, että tämä johtuu NT-proBNP-vasta-aineen ominaisuuksista ja lämpötilaherkkyydestä. RTKU3-kelaatilla tehtiin varmistusleimaukset ja testaukset Tnl- sekä PCT-analyyyteilla. Niiden kirkkaudet ovat noin kaksinkertaisia RTKU1-kelaattiin nähden ja noin nelinkertaisia kuin referenssikelaatti.

RTKU4 on noin kaksi kertaa kirkkaampi, kuin referenssikelaatti.

RTKU5 on vastaavasti yli kaksi kertaa himmeämpi.

Taustasignaalin tiedetään nousevan kuivauksen jälkeen jonkin verran. Sille on määritetty analyyttikohtaiset rajat ja referenssi noudattaa niitä. Taustasignaali nousee merkittävästi kuivauksen jälkeen sekä RTKU1:llä että RTKU3b:llä (taulukko 15). RTKU3a pysyy refe-

renssin kanssa samalla tasolla. Syynä taustasignaalin näin suurelle nousulle voi olla leimatun vasta-aineen osittainen denaturoituminen, jolloin vasta-aineen muoto muuttuu. Tällöin vasta-aine voi sitoutua testikupin pohjaan, joka nostaa taustasignaalia. Myös epäspesifinen sitoutuminen muiden antigeenien kanssa voi vaikuttaa taustasignaalin muodostumiseen.

Kelaatin toimivuutta immunomäärityksessä määrittää immunokompleksin kyky tunnistaa spesifisesti tietty antigeeni eri matriiseissa. Tässä työssä matriiseja oli kolme; ihmisen seerumi, plasma (antikoagulantteina litium hepariini ja EDTA) sekä BSA-TSA. RTKU1 tunnistaa melko tasaisesti kaikki näytteet eri matriiseissa märkäimmunomäärityksessä mutta kuivauksen jälkeen sen kyky tunnistaa potilas- eli plasmanäytteitä laskee. Samoin käy RTKU3b:lle, joka ei tunnista plasmassa olevia antigeeneja lainkaan. Seeruminäytteen se tunnistaa mutta antaa suhteessa pitoisuuteen korkeampaa signaalia. On mahdollista, että se sitoutuu epäspesifisesti seerumissa, joka voi selittää korkeamman signaalin.

RTKU1:sen herkkyys laskettuna 10 % CV:llä on märkäimmunomäärityksessä referenssin kanssa samaa luokkaa mutta kuivauksen jälkeen sen herkkyys heikkenee. RTKU3a:lla vastaavasti märkäimmunomäärityksessä herkkyys kaksinkertaistuu kuivauksen jälkeen. Korkealla leima-asteella herkkyys vastaavasti heikkenee yli kolminkertaisesti.

NT-proBNP-molekyylisiin leimattuna RTKU3-kelaatin kirkkaus jää alhaisemmaksi verrattuna Tnl- ja PCT-molekyyleihin leimattuna. Tämän eron voi selittää NT-proBNP-vasta-aineen ominaisuudet. Alhaisella leima-asteella kirkkaus on kuitenkin noin nelinkertainen mutta korkealla leima-asteella se laskee. On mahdollista, että vasta-aineen toimivuus laskee korkean leima-asteen myötä ja se aiheuttaa näin selkeän muutoksen. Tätä ajatusta tukevat jatkotestaukset Tnl- ja PCT-vasta-aineilla. Niiden kanssa kirkkaus oli kaksinkertainen RTKU1-kelaattiin nähden ja nelinkertainen referenssiin nähden. Herkkyys parani kaksinkertaisesti PCT:llä ja kolminkertaisesti Tnl:llä.

### **Yhteenveto**

Tämän tutkimuksen perusteella RTKU3-kelaatti on noin neljä kertaa kirkkaampi kuin referenssikelaatti, joten se on tutkituista kelaateista lupaavin. Sen toimivuus etenkin käytettyjen Tnl- ja PCT-vasta-aineiden kanssa vaikutti lupaavalta. Toimivuus pitää kuitenkin varmentaa vielä jatkotestauksilla ennen lopullista päätelmää kelaatin toimivuudesta.

## LÄHTEET

- 1 Wild, D. 2013. The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. 4th edition. United Kingdom. Elsevier.
- 2 Owen, J.A. Punt, J. Stranford, S.A. 2013. Kuby Immunology, 7th edition. United States of America. W. H. Freeman and Company.
- 3 Ozturk, T. C., Unluer, E., Denizbasi, A., Guneyssel, O., & Onur, O. 2011. Can NT-proBNP be used as a criterion for heart failure hospitalization in emergency room?. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, Volume 16, Issue 12, 1564-1571.
- 4 Palazzuoli, A., Gallotta, M., Quatrini, I., & Nuti, R. 2010. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure. Vascular health and risk management, Volume 6, 411-418.
- 5 Hall, C. 2005. NT-ProBNP: The Mechanism Behind the Marker. Journal of Cardiac Failure. Volume 11, Issue 5, 81-83.
- 6 Maisel, AS. 2003. The Diagnosis of Acute Congestive Heart Failure: Role of BNP Measurements. Heart Failure Reviews, Volume 8, Issue 4, 327-334.
- 7 Soini, E. & Hemmilä, I. 1979. Fluoroimmunoassay: present status and key problems. Clinical Chemistry, Volume 25, Issue 3, 353-361.
- 8 Hemmilä, I. & Laitala, V. 2005. Progress in Lanthanides as Luminescent Probes. Journal of Fluorescence, Volume 15, Issue 4, 529-542.
- 9 E. Soini. The Principle of Time-Resolved Fluorometry. 2013. Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology, 414-421.
- 10 Hemmilä, I. & Mikkala, V-M. 2001. Time-Resolution in Fluorometry Technologies, Labels, and Applications in Bioanalytical Assays. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, Volume 38, Issue 6, 441-519.
- 11 Hemmilä, I. 1988. Lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassays. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, Volume 48, Issue 5, 389-399.
- 12 Rodenko, O., Fodgaard, H., Tidemand-Lichtenberg, P., Petersen, P. M., & Pedersen, C. 2016. 340 nm pulsed UV LED system for europium-based time-resolved fluorescence detection of immunoassays. Optics Express. Volume 24, Issue 19, 22135-22143.
- 13 Hemmilä I. 1985. Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays. Clinical Chemistry, Volume 31, Issue 3, 359-370
- 14 de Jonge, N., Boerman, OC. & Deelder, AM. 1989. Time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for the detection of the schistosome circulating anodic antigen. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Volume 83, Issue 5, 659-663.
- 15 Lövgren, T., Meriö, L., Mitrunen, K., Mäkinen, ML., Mäkelä, M., Blomberg, K., Palenius, T. & Pettersson, K. 1996. One-step all-in-one dry reagent immunoassays with fluorescent europium chelate label and time-resolved fluorometry. Clinical Chemistry, Volume 42, Issue 8, Part 1, 1196-1201.
- 16 Pettersson, K., von Lode, P., Eriksson, S., Lövgren, J., & Takalo, H. 2003. Multi-Assay Point-of-Care Platform: Highly Sensitive Time-Resolved Fluorometric Detection in Combination with a

Universal All-In-One Assay Format. Point of Care the Journal of Near-Patient Testing & Technology, Volume 2, Issue 3, 225-232.

17 Hemmilä, I. 1997. Photoluminescence Immunoassays. Immunochemistry 1 practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England, 193-214.

18 Hemmilä, I., Dakubu, S., Mikkala, V-M., Siitari, H. & Lövgren, T. 1984. Europium as a Label in Time-Resolved Immunofluorometric Assays. Analytical Biochemistry, Volume 137, Issue 2, 335-343.

19 Bünzli, J-C. & Eliseeva, S. 2011. Basics of Lanthanide Photophysics. Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects, 1-45.

20 Hovinen, J. & Guy, P. 2009. Bioconjugation with Stable Luminescent Lanthanide (III) Chelates Comprising Pyridine Subunits. Bioconjugate Chemistry, Volume 20, Issue 3, 404-421.

21 von Lode, P., Rosenberg, J., Pettersson, K. & Takalo, H. 2003. A Europium Chelate for Quantitative Point-of-Care Immunoassays Using Direct Surface Measurement. Analytical Chemistry, Volume 75, Issue 13, 3193-3201.

22 Principles & Methodology Handbooks: Size Exclusion Chromatography - Principles and Methods. 2018. Sweden. GE Healthcare Bio-Sciences AB.

23 Principles & Methodology Handbooks: Strategies for Protein Purification - Handbook. 2010. Sweden. GE Healthcare Bio-Sciences AB.

24 Hong, P., Koza, S. & Bouvier, ES. 2012. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Volume 35, Issue 20, 2923-2950.

25 Janson, J.-C. & Rydén. 2011. In Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, 3rd edition, United States, Wiley Online Library.

26 Chakrabarti, A. 2018. Separation of Monoclonal Antibodies by Analytical Size Exclusion Chromatography. Antibody Engineering, United Kingdom, Intech Open, 133-174.

27 Godbey, W. T. 2014. An Introduction to Biotechnology: The Science, Technology and Medical. United Kingdom. Elsevier.

28 Perkampus, H-H. Translated by Grinter, H. C. & Threlfall, T. L. 1992. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. Germany. Springer Verlag GmbH.

29 Blomberg, K. Mikkala, V-M. Hakala, H. Mäkinen, P. Suonpää, M & Hemmilä, I. 2011. A dissociative fluorescence enhancement technique for one-step time-resolved immunoassays. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Volume 399, Issue 4, 1677–1682.

30 Applications of time-resolved fluorometry with the DELFIA® method. 2008. PerkinElmer.

31 Hemmilä, I. 1995. Luminescent lanthanide chelates—a way to more sensitive diagnostic methods. Journal of Alloys and Compounds. Volume 225, Issue 1-2, 480-485.

32 Thomas Robert. 2001. A Beginner's Guide to ICP-MS Part I. Spectroscopy. Volume 17, Issue 7.

33 Harris, D. 2007. Quantitative Chemical Analysis. 7th Edition. United States of America. W. H. Freeman and Company.

34 Sund, S. Blomberg, K. Meltola, N. & Takalo, H. 2017. Design of Novel, Water Soluble and Highly Luminescent Europium Labels with Potential to Enhance Immunoassay Sensitivities. Molecules. Volume 24, Issue 10, 1807.

- 35 He, Q. Guo, X. Zhang, Y. Deng, Y. & Wu, W. 2007. Luminescent Europium Chelates Synthesis and Fluorescence Properties. *Sensors and Materials*, Volume 19, Issue 2, 123–132.
- 36 Takalo, H. Hemmilä, I. Sutela, T. & Latva, M. 1996. Synthesis and luminescence of novel Eu (III) complexing agents and labels with 4-(phenylethynyl)pyridine subunits. *Helvetica Chimica Acta*, Volume 79, Issue 3, 789–802.
- 37 Pettersson, K. von Lode, P. Eriksson, S. Lövgren, J. & Takalo, H. 2003. Multi-assay point-of-care platform: Highly sensitive time-resolved fluorometric detection in combination with a universal “all-in-one” assay format. *Point of Care the Journal of Near-Patient Testing & Technology*, Volume 2, Issue 3, 225–232.
- 38 Rodenko, O., Eriksson, S., Tidemand-Lichtenberg, P., Trolborg, C. P., Fodgaard, H., van Os, S., & Pedersen, C. 2017. High-sensitivity detection of cardiac troponin I with UV LED excitation for use in point-of-care immunoassay. *Biomedical optics express*, Volume 8, Issue 8, 3749–3762.
- 39 Hermanson, G. 2008. *Bioconjugate Techniques*. 2nd Edition. United States of America. Elsevier.
- 40 Hemmilä, I., Mikkala, V-M. & Takalo, H. 1997. Development of luminescent lanthanide chelate labels for diagnostic assays. *Journal of Alloys and Compounds*, Volume 249, 158-162.

