

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratorioanalytiikka

2010

Jani Uotinen

PROTOTYYPPISEN IMMUNOMÄÄRITYKSEN PYSTYTYS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Laboratorioanalytiikka

Marraskuu 2010 | Sivumäärä: 38

Ohjaajat: Teemu Korpimäki, PerkinElmer Wallac Oy; Kari Haajanen, Turun ammattikorkeakoulu

Jani Uotinen

Prototyypin immunomäärityksen pystytys

Opinnäytetyön tarkoituksena on pystyttää immunomääritys analyysi X:n määrittämiseksi ihmisseerumista testaamalla yhdeksän eri monoklonaalisen vasta-aineen sandwich-pareja. Käytetyt vasta-aineet olivat RabMab1-3, Fab1-5 ja Mab1.

Vasta-aineiden hyödyntäminen eri analyysien mittaamiseen perustuu niiden spesifisyyteen sitoutua omaan antigeeniinsä. Sandwich-pari koostuu kahdesta vasta-aineesta, joista toinen immobilisoidaan mikrotiiterilevyn kuoppien pohjaan. Mitattava näyte lisätään sen päälle ja analyysi kiinnittyy vasta-aineeseen. Toinen vasta-aine on ns. leima-vasta-aine, joka lisätään näytteen päälle, jättäen siten analyysin kahden vasta-aineen väliin. Leima-vasta-aineessa on mukana kelaatti, joka sisältää fluoresoivaa europiumia, mikä puolestaan voidaan mitata aikaeroitteisella fluorometrialla.

Prosessi alkoi vasta-aineiden puhdistamisella kasvatusliuoksistaan käyttäen affiniteettikromatografiaa, minkä jälkeen puhdistetuista vasta-aineista mitattiin niiden sitoutumiskyky eli affiniteetti. Kaikkia yhdeksää vasta-ainetta immobilisoitiin 96-kuoppaisille Nunc-mikrotiiterilevyille. Vasta-aineita, joilla oli parhain affiniteetti käytettiin leimanvalmistuksessa.

Pinnoitettuja levyjä ja leimoja testattiin ristiin parhaimman vasta-aine –sandwich-parin löytämiseksi. Menetelmää testattiin mittaamalla noin 100 pg/ml analyysi X:ää sisältävää näytettä ja tarkastelemalla siitä saatuja tuloksia.

Menetelmällä onnistuttiin löytämään lupaava sandwich-pari, mutta saatu pitoisuusmäärä vaihteli vasta-aineparin mukaan 100 pg/ml:n molemmilla puolilla. Parhain sitoutuminen oli Fab3 ja Mab1 –kombinaatiolla kummassakin orientaatioissa.

ASIASANAT:

Immunomääritys, kouttaus, pinnoitus, vasta-aine, ei-kilpaileva

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

November 2010 | Total number of pages: 38

Instructors: Teemu Korpimäki, PerkinElmer Wallac Oy; Kari Haajanen, Turku University of Applied Sciences

Jani Uotinen

Setting up an immunoassay

The purpose of this thesis was to set up an immunoassay to measure analyte X from a sample of human serum by testing nine different monoclonal antibodies as sandwich pairs. The antibodies used were RabMab1-3, Fab1-5 and Mab1.

Utilizing antibodies to measure analytes is based on their ability to specifically bind to their own antigens. A sandwich pair consists of two antibodies of which one is immobilized to a microtiter plate. Then the measured sample is added on top and the analyte binds to the immobilized antibody. The other antibody is called a tracer and it is added on top of the immobilized analyte. Now the analyte is caught between the two antibodies. The tracer is basically an antibody which also has a chelate part that has europium in it. As the tracer is bound to the analyte the amount of europium can be measured by time-resolved fluorometry.

The first part of the process was the separation and purification of the antibodies from their culture solutions by using Protein A resin. After purification the antibodies were tested for their affinity and the ones with the best dissociation constant were used to make tracers and all of the nine antibodies were applied to coat microtiter plates.

The coated plates and tracers were cross-tested to find the best antibody sandwich combination. The method was tested by measuring a sample with an analyte X concentration of approximately 100 pg/ml and then examining the results.

A promising antibody pair was found but the measured analyte X concentration varied a lot depending on which antibody combination was used. The most remarkable binding occurred with the combination of Fab3 and Mab1 antibodies regardless of which one was used as the tracer or the immobilized antibody.

KEYWORDS:

Immunoassay, coating, antibody, non-competitive, lanthanide chelates

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	5
2	VASTA-AINEIDEN VALMISTELEMINEN	8
2.1	Vasta-aineet	8
2.2	Vasta-aineiden puhdistus proteiini A –pylväällä	10
2.3	Vasta-aineiden affiniteetin määrittäminen	14
2.4	Vasta-aineiden puskuriliuosten vaihtaminen sekä konsentrointi	17
3	VASTA-AINEIDEN IMMOBILISOINTI	20
3.1	Pinnoitusprosessi	22
4	VASTA-AINEIDEN LEIMAUS	24
4.1	Leima-vasta-aineiden valmistus	24
4.2	Leimojen testaus	28
5	IMMUNOMÄÄRITYS	31
5.1	Aikaerotteinen fluorometria	31
5.2	Immunomäärityksessä käytetty menetelmä	33
5.3	Immunomäärityksen tulokset	34
6	TULOSTEN TULKINTA JA YHTEENVETO	37
7	LÄHTEET	38

LIITTEET

LIITE 1	Mab1-levy/RabMab1-leima –määrityksen laskut
LIITE 2	Fab1-levy/RabMab1-leima –määrityksen laskut
LIITE 3	Fab3-levy/RabMab1-leima –määrityksen laskut
LIITE 4	RabMab1-levy/Fab3-leima –määrityksen laskut
LIITE 5	RabMab1-levy/Mab1-leima –määrityksen laskut
LIITE 6	Mab1-levy/Fab3-leima –määrityksen laskut
LIITE 7	Fab3-levy/Mab1-leima –määrityksen laskut
LIITE 8	Fab1-levy/Mab1-leima –määrityksen laskut

KUVAT

Kuva 1. Ei-kilpaileva immunomääritys	5
--------------------------------------	---

Kuva 2. Kilpaileva immunomääritys	6
Kuva 3. Tyypillisen immunoglobuliini G (IgG) -molekyylin rakenne	10
Kuva 4. Vasta-aineen sitoutuminen kiinteään pintaan	21
Kuva 5. N ¹ -(p-isothiocyanatobenzyl)-diethylene triamine tetra-acetic acid-Eu ⁺ -kelaatin kemiallinen rakenne	24
Kuva 6. Stokesin siirtymä	31
Kuva 7. Aikaerotteisen fluorometrin mittaus	32
Kuva 8. Ei-kilpailevan immunomäärityksen vaiheet	33

KUVIOT

Kuvio 1. RabMab1-vasta-aineen fraktiot kuvaajassa	12
Kuvio 2. RabMab2-vasta-aineen fraktiot kuvaajassa	13
Kuvio 3. RabMab3-vasta-aineen fraktiot kuvaajassa	14
Kuvio 4. RabMab1:n affiniteettikäyrä	16
Kuvio 5. RabMab2:n affiniteettikäyrä	16
Kuvio 6. RabMab3:n affiniteettikäyrä	17
Kuvio 7. Fab1-N1-Eu-leiman fraktiot	25
Kuvio 8. Fab3-N1-Eu-leiman fraktiot	27
Kuvio 9. RabMab1-N1-leiman fraktiot	28
Kuvio 10. Fab-leimojen testaus, pipetointikaavio	29
Kuvio 11. Mittausten counts-määrät	29
Kuvio 12. Immunomäärityksen pipetointikaavio	34
Kuvio 13. Immunomääritysten tulokset laskettuna Excelillä (pg/ml)	35

TAULUKOT

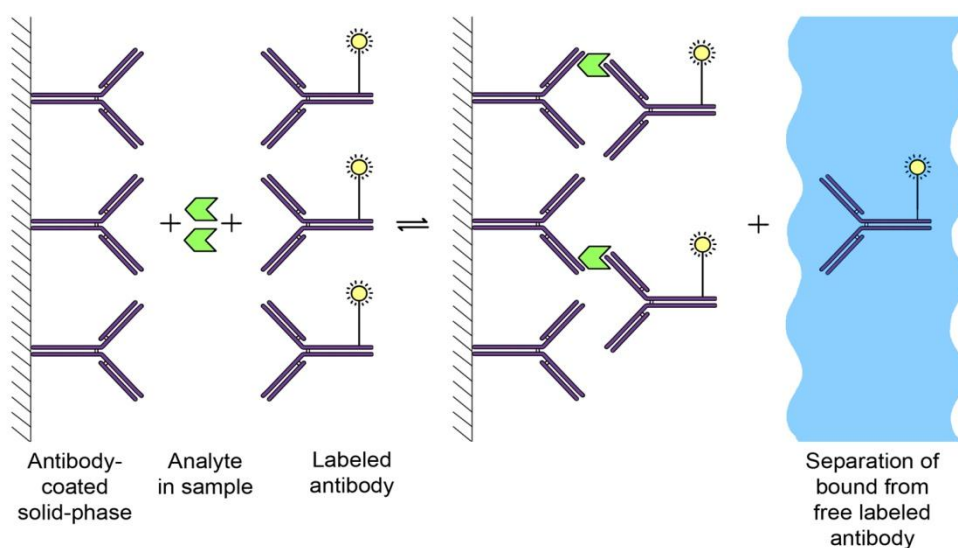
Taulukko 1. Vasta-aineiden puhdistuspuskurit	11
Taulukko 2. RabMab1-vasta-aineen fraktiot	12
Taulukko 3. RabMab2-vasta-aineen fraktiot	13
Taulukko 4. RabMab3-vasta-aineen fraktiot	14
Taulukko 5. Affiniteettilaimennokset ja reaktioseokset	15
Taulukko 6. Vasta-aineiden RabMab1-3 dissosiaativakiot	16
Taulukko 7. RabMab1-vasta-aineen konsentroidi	18
Taulukko 8. RabMab2-vasta-aineen konsentroidi	18
Taulukko 9. RabMab3-vasta-aineen konsentroidi	19
Taulukko 10. Käytetyt vasta-aineet ja niiden dissosiaativakiot	19
Taulukko 11. Pinnoituspuskuri ja saturointipuskuri	22
Taulukko 12. Leimattavat vasta-aineet	24
Taulukko 13. Poolien laimennokset	26
Taulukko 14. Fab1-N1-Eu leimapoolit	26
Taulukko 15. Fab3-N1-Eu leimapoolit	27
Taulukko 16. RabMab1-N1-Eu leimapoolit	28
Taulukko 17. Kalibraattorien pitoisuudet	30

1 JOHDANTO

Immunomääritykset ovat maailmanlaajuisesti laboratorioissa käytettäviä biokemiallisia testejä, joilla voidaan määrittää spesifisesti tietty komponentti hyvin monimutkaisista näytematriiseista.

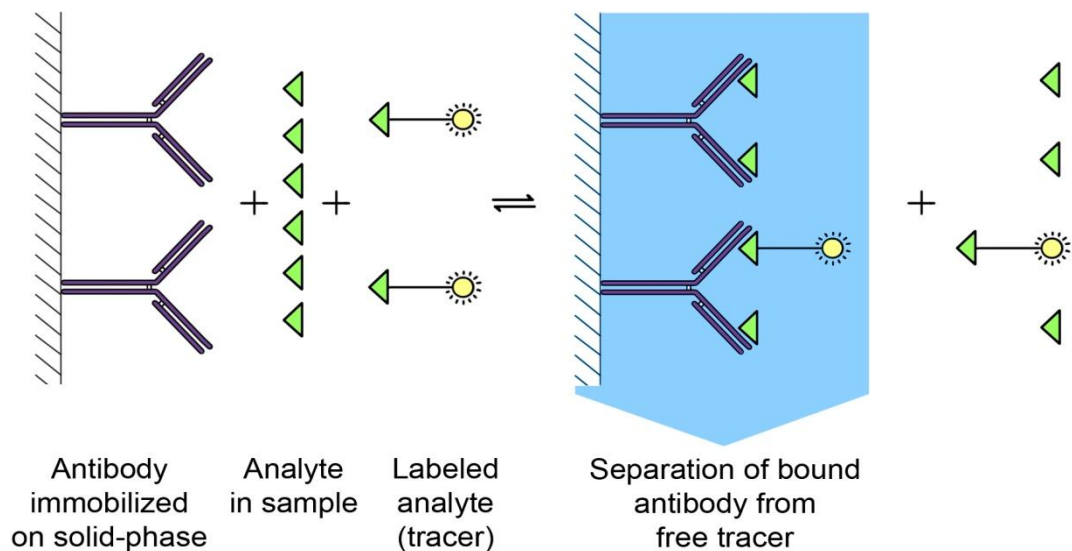
Immunomääritysten spesifisyys pohjautuu niissä käytettävien vasta-aineiden spesifisyyteen sitoutua omaan antigeeniinsä. Tämä mahdollistaa esimerkiksi erilaisten proteiinien, kuten hormonien, tunnistamisen ja niiden pitoisuuksien määrittämisen kokoverestä, veren seerumista, plasmasta tai vaihtoehtoisesti muista ruumiinnesteistä.

Eräs immunomäärityksen tekniikka on käyttää kahden vasta-aineen sandwich-paria, jossa toinen vasta-aine on immobilisoituna kiinteään faasiin ja toiseen vasta-aineeseen on leimattu fluoresoiva kelaatti. Näyte annostellaan immobilisoidun vasta-aineen päälle ja leimattu vasta-aine lisätään. Näin analyytti jää kahden vasta-aineen väliin, mistä myös nimitys sandwich johtuu. Sitoutumisen jälkeen reaktiosta huuhdellaan vasta-aineen ylimäärä pois, jolloin kehitysliuoksen lisäämisen jälkeen mitattava signaali on suoraan verrannollinen mitattavan antigeenin määrään. Määrityksessä on siis enemmän vasta-ainetta kuin mitattavaa antigeeniä, eli kyseessä on ei-kilpaileva määrittäminen.



Kuva 1. Ei-kilpaileva immunomääritys

Kilpaileva määrittäminen puolestaan on tarkoitettu pienten molekyylien määrittämiseen, ja siinä on käytössä vähemmän vasta-ainetta kuin mitattavaa antigeeniä. Näytteen sisältämän antigeenin annetaan ensin sitoutua vasta-aineen kanssa, minkä jälkeen lisätään leimattua antigeeniä, joka sitoutuu vapaana olevan vasta-aineen kanssa. Toisin sanoen näytteen antigeeni kilpailee leimatun antigeenin kanssa tilasta sitoutua vasta-aineeseen. Reaktiosta huuhdellaan sitoutumattomat leimatut antigeenit pois ja kehitysliuoksen jälkeen signaali on kääntäen verrannollinen näytteen antigeenipitoisuuteen, eli mitä suurempi signaali, niin sitä pienempi antigeenipitoisuus. Kilpailevaa määrittäystä voidaan käyttää esimerkiksi huumausainetesteissä.²



Kuva 2. Kilpaileva immunomäärittäminen

Opinnäytetyössäni käsittelen vasta-aineiden valmistelemista immunomäärittäystä varten, sekä noin 30 kDa kokoisen proteiinin pitoisuuden määrittämistä ihmisen seerumista käyttämällä eri vasta-aine-sandwich-pareja. Vasta-aineiden valmistelemiseen kuuluu niiden puhdistaminen, affiniteettien määrittäminen, niiden immobilisointi mikrotiiterilevyille, sekä leimaaminen fluoresoivalla kelaatilla. Työn tarkoituksena on löytää sopiva sandwich-pari, jonka avulla pystytään määrittämään näytteen analyttipitoisuus riittävällä herkkyydellä sekä minimoimalla määrittämissä oleva tausta.

Työn kokeellisen vaiheen suoritin PerkinElmer Wallac Oy Finlandin tuotekehityspuolella kemisti Teemu Korpimäen ohjauksessa.

2 VASTA-AINEIDEN VALMISTELEMINEN

2.1 Vasta-aineet

Vasta-aineet ovat glykoproteiineja, jotka luontaisesti syntyvät immuunijärjestelmän vasteena elimistön tunkeutujia vastaan. Vasta-aineilla on tärkeä rooli infektioiden tai muiden taudinaiheuttajien toiminnan heikentämisessä tai sen estämisessä.¹

Jokainen vasta-aine tunnistaa ja sitoo vain yhtä antigeeniä. Nämä antigeenit voivat olla muunmuassa proteiineja tai polysakkarideja bakteerien tai virusten soluseiniin kiinnittyneinä. Antigeenin alue, joka reagoi vasta-aineen kanssa on nimeltään epitooppi.¹

Tyypillisesti eläimen immuunijärjestelmä luo suuren ryhmän erilaisia vasta-aineita, jotka tunnistavat yhden tietyn antigeenin useita eri epitooppeja. Jokainen vasta-aine erittyy eri vasta-ainetta tuottavasta imusolusta eli lymfosyytistä, ja jokainen vasta-aine reagoi eri epitooppiin, joten suoraan verestä löydetyt vasta-aineet ovat niin sanottuja polyklonaalisia vasta-aineita. Polyklonaaliset vasta-aineet tarjoavat hyvän mahdollisuuden tunnistaa tunkeutujia veressä, mutta niiden heterogeisuus rajoittaa niiden käyttöä tutkimusvälineinä.¹

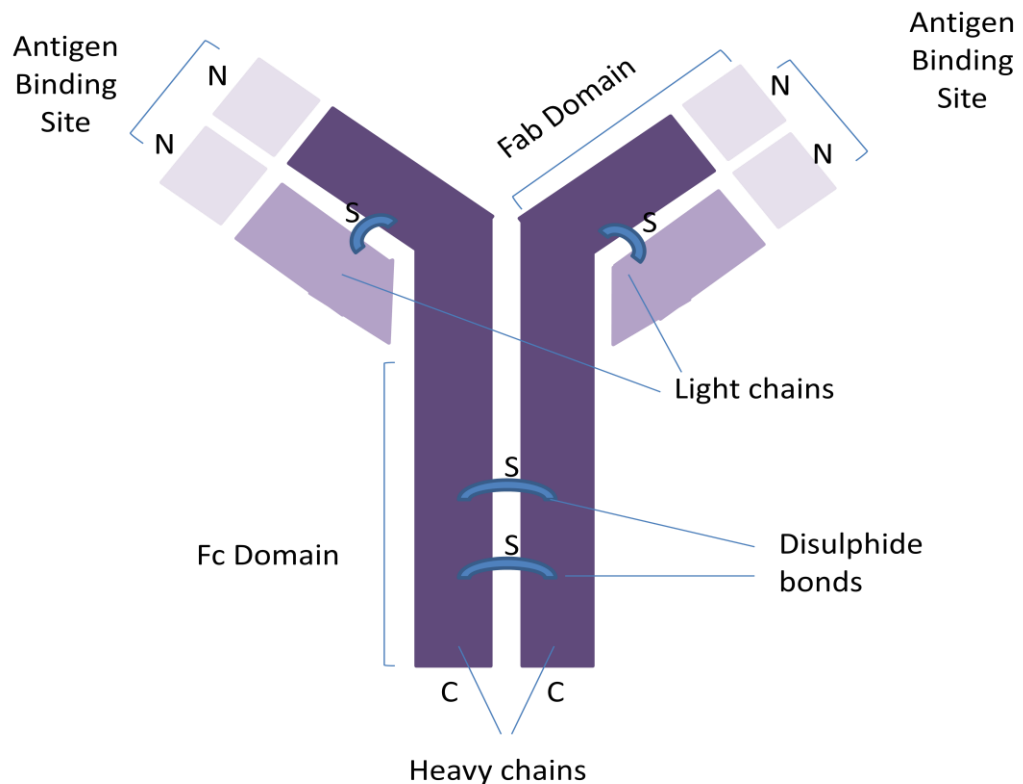
Vuonna 1975 tapahtui suuri läpimurto vasta-aineiden käyttösovellusten tutkimuksessa. Köhler ja Milstein kehittivät tavan tuottaa vasta-aineita, jotka sitoutuivat vain yhteen antigeenin epitooppiin. Näitä vasta-aineita kutsutaan monoklonaalisiksi vasta-aineiksi. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen tapahtui immunisoimalla eläin (esimerkiksi hiiri tai jänis) halutulla kohdeantigeenillä. Sitten odotetaan, kunnes eläimen immuunijärjestelmä alkaa tuottaa vasta-aineita, minkä jälkeen eläimen perna poistetaan. Pernal solut yhdistetään myeloomasolujen kanssa, jolloin muodostuu niin sanottuja yksisoluisia hybridejä, hybridoomasoluja. Kompetentit hybridoomasolut erotetaan muista fuusioitumattomista soluista ja niitä kasvatetaan. Pernal kudoksen solut tuottavat vasta-ainetta ja myeloomasolut takaavat

loppumattoman jakaantumisen kasvatusliuoksissa. Hybridoomat tuottavat vain yhtä vasta-aine tyyppiä, joten menetelmä takaa tehokkaan monoklonaalisen vasta-aineen tuoton.¹

Köhlerin ja Milsteinin kehittämä hiirten monoklonaalisten vasta-aineiden tuotanto on ollut käytössä jo yli 30 vuotta ja niiden käyttö on yleistynyt ja korvannut perinteisempien polyklonaalisten vasta-aineiden käyttöä. Lähinnä niiden puhtauden, saatavuuden sekä yhdenmukaisten ominaisuuksiensa vuoksi. On kuitenkin tiedossa, että jotkin immunogeenit stimuloivat huonosti vasta-ainemuodostusta hiirissä. Testit ovat kuitenkin osoittaneet, että lukuisten eläinten ohella jänikset tuottavat vasta-aineita, joilla on suuri affiniteetti, myös niistä antigeneistä, jotka eivät aiheuta immuunivastetta hiirillä. Teoriassa jänisten monoklonaaliset vasta-aineet yhdistävät hiirien sekä jänisten monoklonaalisten vasta-aineiden parhaimmat puolet.⁵

Jäniksissä on hyvä mahdollisuus tuottaa vasta-aineita monilla eri antigeeneillä sekä pienillä molekyyileillä ja peptideillä. Jänisvasta-aineet tunnistavat useita epitoppeja vasta-aineproteiinista. Jänisvasta-aineilla päästään pikomolaarisiin (10^{-12} KD M) affiniteetteihin, kun taas hiirivasta-aineilla vain nanomolaarisiin (10^{-9} KD M). Jänisvasta-aineet ovat myös enemmän spesifisiä kuin hiirivasta-aineet ja paljon herkempiä. Jänisten monipuoliset vasta-aineet tunnistavat paremmin heikompia immuunivasteen aiheuttajia eikä immuunivaste ole niin puolueellinen vahvemmille epitopeille. Jänisvasta-aineita on myös helpompi puhdistaa sekä saada kasvamaan hybridooma-solulinjoissa.⁶

Vasta-aineiden rakenteista puhuttaessa ne voidaan mallintaa klassisella Y-muodolla (kuva 1), koska immunoglobuliini G on yleisin seerumista löydettävä vasta-aine.¹



Kuva 3. Tyypillisen immunoglobuliini G (IgG) -molekyylin rakenne

Tyypillinen IgG-vasta-aine koostuu neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta identtisestä kevytketjusta ja kahdesta identtisestä raskasketjusta, jotka ovat kiinni toisissaan kovalenttisillä rikkisilloilla.¹

Työssä käytettiin kahdelta eri yritykseltä saatuja vasta-aineita, joista Epitomicsilta saadut hybridooma-solulinjat tuottivat vasta-aineita RabMab1-3, jotka kasvatettiin Wallacin soluviljelylaboratoriossa pullokasvatuksina. Kasvatusliemistä puhdistettiin sopivan kasvatusajan päätteeksi valmiita vasta-aineita. Abd-Seroteciltä saadut vasta-aineet olivat valmiiksi puhdistettuja sekä konsentroituja. Kaikki käytetyt vasta-aineet olivat monoklonaalisia.

2.2 Vasta-aineiden puhdistus protein A –pylväällä

Aluksi pakattiin noin 1 mL tilavuudeltaan oleva pylväs rProtein A Sepharose -geelillä. Sitten valmistettiin puhdistuksessa käytetyt puskuriliuokset.

Taulukko 1. Vasta-aineiden puhdistuspuskurit

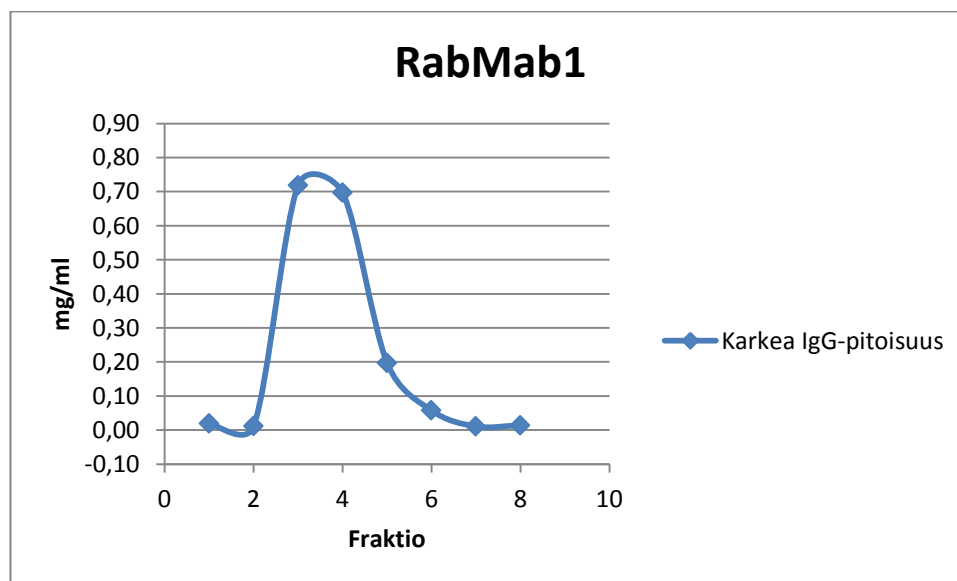
Puskuri	Koostumus
Sitoutumispuskuri 1	Glysiinipuskuri 500 mM pH 8.9
Sitoutumispuskuri 2	Glysiinipuskuri 20 mM pH 8.9
Eluutiopuskuri	Sitruunahappo 0,1 M pH 3.0
Neutralointipuskuri	Tris-HCl-puskuri 1 M pH 9.0
Säilytyspuskuri	20 % Etanoli

Pylväs tasapainotettiin 10 ml:lla sitoutumispuskuria 2, virtausnopeudella 1 ml/min. Vasta-aine kasvatukseen lisättiin 1/25 sitoutumispuskuri 1:stä. Vasta-ainekasvatus ajettiin pylvääseen virtausnopeudella 1 ml/min ja läpi tullut fraktio otettiin talteen siltä varalta, etteivät vasta-aineet jääneetkään pylvääseen kiinni. Pylvästä pestiin 10 ml:lla sitoutumispuskuria 2 virtausnopeudella 1 ml/min ja otettiin talteen läpi tullut fraktio. Vasta-aineet eluoiitiin pylvästä 12 ml:lla eluutiopuskuria virtausnopeudella 1 ml/min. Vasta-aineet kerättiin talteen 12 kappaletta 1 ml:n fraktioina eppendorfputkiin, jotka sisälsivät valmiiksi 290 µl neutralointipuskuria. Neutralointipuskurin määrä oli valmiiksi määritetty 1 ml:n eluutiopuskurin neutraloimiseen. Kerättyjen vasta-aine fraktioiden karkeat IgG-pitoisuudet määritettiin spektrofotometrillä käyttäen aallonpituutta 280 nm. Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml) voitiin laskea kaavasta $A(280\text{nm})/1,34$.

Pitoisuuksien määrittämisen jälkeen niistä piirrettiin kuvaajat, joiden perusteella poolattiin fraktiot, jotka sisälsivät eniten IgG:tä.

Taulukko 2. RabMab1-vasta-aineen fraktiot

Fraktio	Absorbanssi	Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml)
1	0,0255	0,02
2	0,0154	0,01
3	0,9637	0,72
4	0,9336	0,70
5	0,2644	0,20
6	0,0772	0,06
7	0,0143	0,01
8	0,0187	0,01

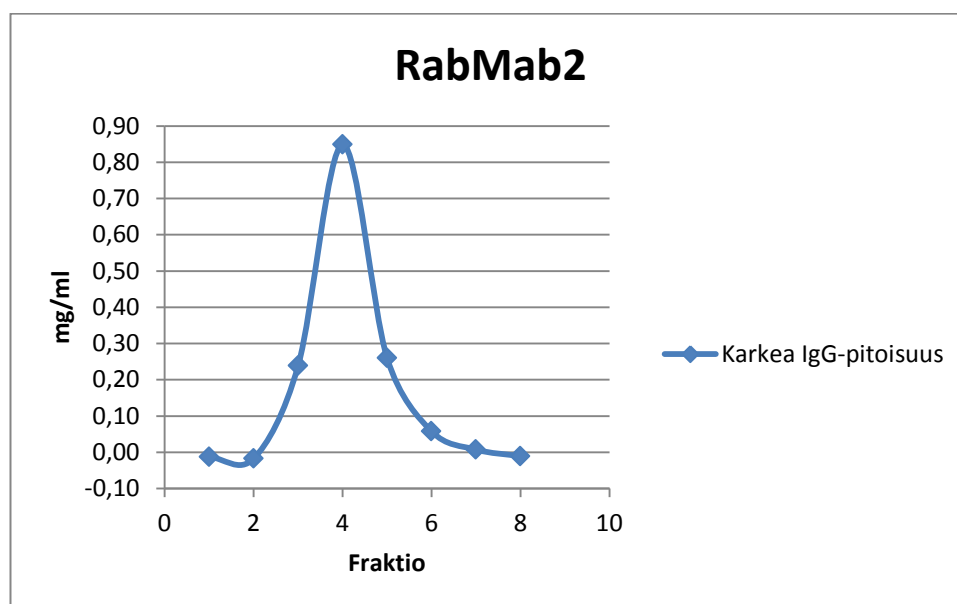


Kuvio 1. RabMab1-vasta-aineen fraktiot kuvaajassa

Kuvion 1 mukaan poolattiin fraktiot 3 ja 4, jolloin saatiin yhdistetyksi karkeaksi IgG-pitoisuudeksi noin 0,71 mg/ml.

Taulukko 3. RabMab2-vasta-aineen fraktiot

Fraktio	Absorbanssi	Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml)
1	-0,0171	-0,01
2	-0,0232	-0,02
3	0,3198	0,24
4	1,1372	0,85
5	0,3487	0,26
6	0,0776	0,06
7	0,0101	0,01
8	-0,0144	-0,01

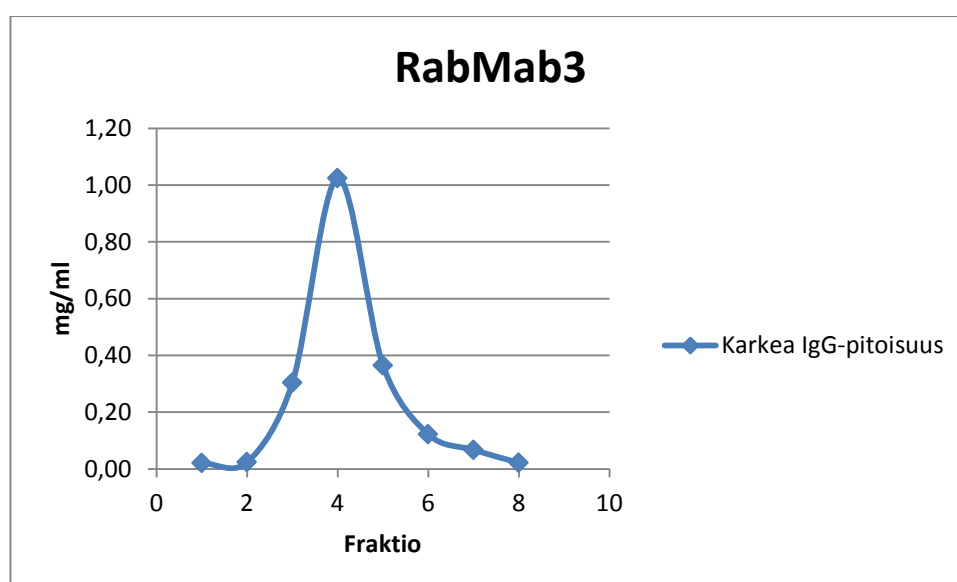


Kuvio 2. RabMab2-vasta-aineen fraktiot kuvaajassa

Kuvion 2 mukaan poolattiin fraktiot 3,4 ja 5, jolloin saatiin yhdistetyksi karkeaksi IgG-pitoisuudeksi noin 0,63 mg/ml.

Taulukko 4. RabMab3-vasta-aineen fraktiot

Fraktio	Absorbanssi	Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml)
1	0,0275	0,02
2	0,0317	0,02
3	0,4064	0,30
4	1,3723	1,02
5	0,4888	0,36
6	0,1635	0,12
7	0,0898	0,07
8	0,0289	0,02



Kuvio 3. RabMab3-vasta-aineen fraktiot kuvaajassa

Kuvion 3 mukaan poolattiin fraktiot 3, 4 ja 5, jolloin saatiin yhdistetyksi karkeaksi IgG-pitoisuudeksi noin 0,52 mg/ml.

2.3 Vasta-aineiden affiniteetin määrittäminen

Puhdistetuille vasta-aineille RabMab1-3 suoritettiin myös affiniteetin eli sitoutumisvoiman määrittäminen. RabMab1-3 vasta-aineista valmistettiin taulukossa 5 näkyvä laimennossarja. Jokaiseen pitoisuustasoon lisättiin yhtä paljon analyttää

X ja reaktiivilavuus saatettiin 500 µl:aan lisäämällä 7,5 % BSA-TSA:ta. Vasta-aineista tehtiin välilaimennokset 50 ng/ml, 500 ng/ml ja 5000 ng/ml.

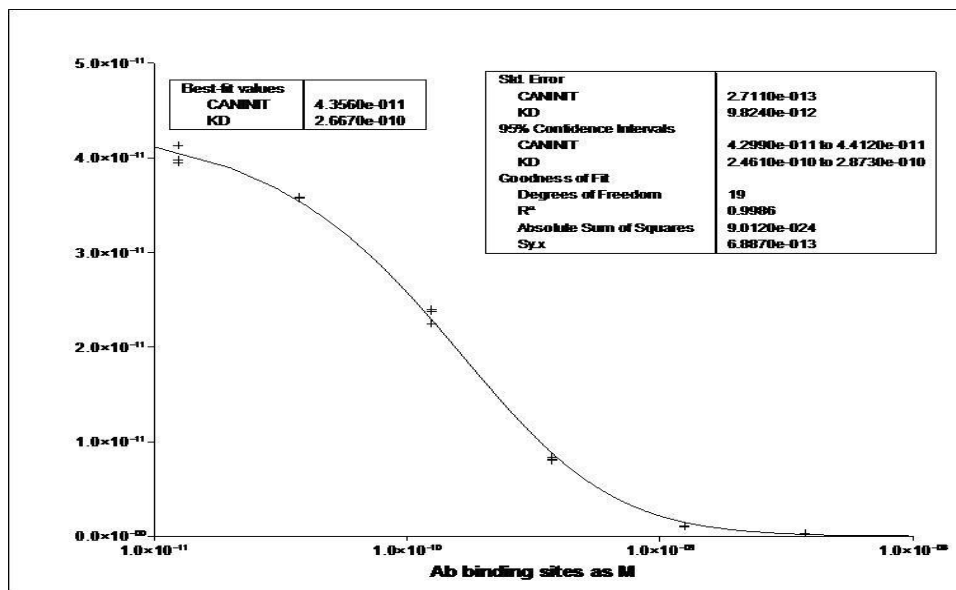
Taulukko 5. Affiniteetilaimennokset ja reaktioseokset

Loppupitoisuus (ng/ml)	Lisättävä tilavuus	Välilaimennoksen pitoisuus (ng/ml)	+	Analyytti X	+	7.5 % BSA- TSA
0	-	-	+	150 µl	+	350 µl
1	10 µl	50	+	150 µl	+	340 µl
3	30 µl	50	+	150 µl	+	320 µl
10	10 µl	500	+	150 µl	+	340 µl
30	30 µl	500	+	150 µl	+	320 µl
100	10 µl	5000	+	150 µl	+	340 µl
300	30 µl	5000	+	150 µl	+	320 µl
1000	100 µl	5000	+	150 µl	+	250 µl
3000	300 µl	5000	+	150 µl	+	50 µl

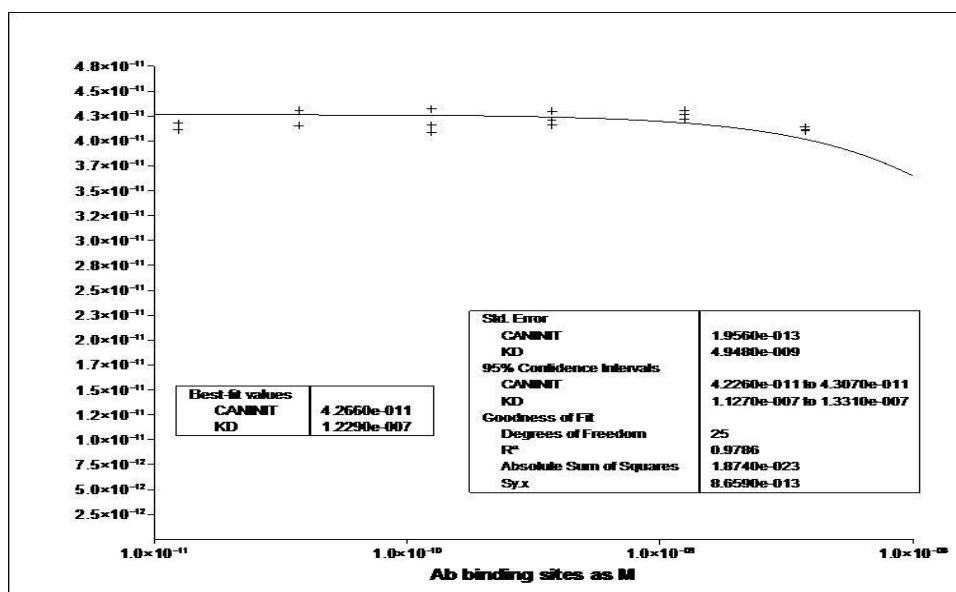
Laimennosten annettiin reagoida yön yli huoneenlämmössä. Seuraavana aamuna laimennokset pipetoitiin Anti-Rabbit IgG-mikroitiiteri-levylle, 100 µl / kaivo, yhteensä 4 kaivoa jokaista laimennostasoa kohti. Levyä inkuboitiin tasosekoittajassa kaksi tuntia huoneenlämmössä. Laimennokset kerättiin tasoittain talteen Delfia Xpress –näyteputkiin ja tasoille suoritettiin analyyttille X Delfia Xpress -pitoisuusmääritys, 3 replikaattia näytettä kohden. Tulokseksi saatiin analyytti X -pitoisuuksia, vasta-aineiden eri pitoisuustasoa kohti. Dataan johdettiin sovituskäyrä, jonka perusteella pystyttiin piirtämään käyrä, josta dissosiaatiovakio voitiin laskea. Mitä alhaisempi dissosiaatiovakio on sitä tehokkaammin vasta-aine kykenee sitoutumaan, kun taas vastaavasti mitä suurempi dissosiaatiovakio sitä huonommin vasta-aine kykenee sitoutumaan.

Taulukko 6. Vasta-aineiden RabMab1-3 dissosiaatiovakiot

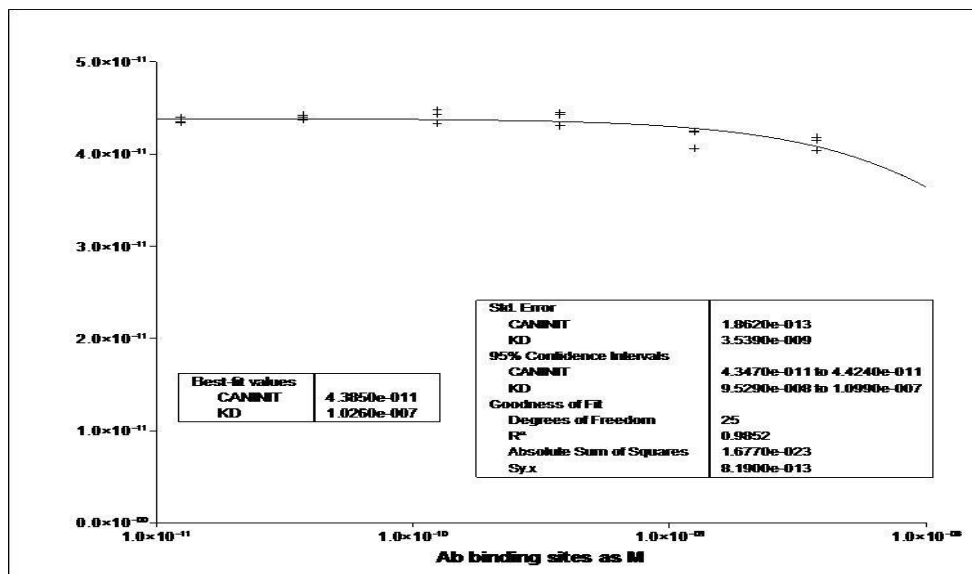
Vasta-aine	Dissosiaatiovakio (nM = 10 ⁻⁹ M)
RabMab1	0,267
RabMab2	122,9
RabMab3	102,6



Kuvio 4. RabMab1:n affiniteettikäyrä



Kuvio 5. RabMab2:n affiniteettikäyrä



Kuvio 6. RabMab3:n affiniteettikäyrä

Affiniteettimäärittysten tulosten mukaan ainoastaan vasta-aineella RabMab1 affiniteetti oli niin hyvä, että se oli tarkasti määritettävissä. Vasta-aineiden RabMab2 ja RabMab3 tapauksissa affiniteetti oli niin huono, että tarkkaa tulosta ei saatu mitatuksi. Kuten kuviosta 5 ja 6 näkyy, RabMab2-3 tapauksissa analyysin pitoisuus ei laske huomattavasti vasta-aineen pitoisuuden funktiona.

2.4 Vasta-aineiden puskuriliuosten vaihtaminen sekä konsentroidi

Vasta-aineiden säilyvyys oli huono puhdistuksen jälkeen neutraloidussa puskurissa, joten puskuriliuos päätettiin vaihtaa 0,9 % NaCl-liuokseen käyttämällä NAP-5 ja NAP-10 –geelisuodatuspylväitä. RabMab1 fraktiot 3 ja 4 yhdistettiin ja pipetoitiin 30 kDa Millipore Amicon Ultra-4 konsentraattoriin ja sentrifugoitiin 4000 G:ssä 10 minuutin ajan. Suodattimeen jäi noin 235 µl vasta-ainetta. Vasta-aine pipetoitiin talteen ja puskuri vaihdettiin.

Pylväät tasapainotettiin ajamalla niiden lävitse 0,9 % NaCl-liuosta noin 15 ml:aa. Vasta-aine lisättiin NAP-5 –pylvääseen, ja sen annettiin imeytyä kokonaan, minkä jälkeen lisättiin NaCl-liuosta niin paljon, että näytteen yhteistilavuus oli 0,5 ml:aa. Sitten näyte eluoiitiin 1 ml:lla NaCl-liuosta. Eluoitu näyte siirrettiin NAP-10 –pylvääseen, ja sen annettiin imeytyä pylvääseen kokonaan. Tämän jälkeen näyte eluoiitiin 1,5 ml:lla NaCl-liuosta. Eluoidun vasta-

aineen karkea IgG-pitoisuus määritettiin spektrofotometrillä aallonpituudella 280 nm ja karkea pitoisuus laskettiin kaavalla $A(280\text{nm})/1,34$. Vasta-aine päätettiin vielä konsentroida pienempään tilavuuteen, joten 1,5 ml:aa vasta-ainetta siirrettiin konsentraattoriin ja sentrifugoitiin 4000 G:ssä 6 minuutin ajan, jolloin lopputilavuudeksi tuli noin 250 μl . Vasta-aineen karkea IgG-pitoisuus määritettiin uudelleen spektrofotometrillä, mutta pitoisuus oli liian väkevä. Vasta-aineesta valmistettiin 1:100 laimennos ja mittaus suoritettiin uudelleen.

Taulukko 7. RabMab1-vasta-aineen konsentroida

Mittaus	Absorbanssi	Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml)	Vasta-aineen tilavuus (μl)
Eluoitu vasta-aine	1,1716	0,87	1500
Konsentroidu vasta-aine	5	3,73	250
Vasta-aineen laimennos	0,0668	4,99	100

Vasta-ainetta saatiin noin 250 μl ja sen konsentraatio oli 4,99 mg/ml, joten saannoksi saatiin noin 1,2 mg.

Sama menetelmä suoritettiin myös RabMab2 ja RabMab3 –vasta-aineille. Molemmista vasta-aineista poolattiin fraktiot 3,4 ja 5. Konsentroidin jälkeen molempia jäi jäljelle noin 200 μl . Molempien puskurit vaihdettiin käyttämällä NAP-5 ja NAP-10 pylväitä.

Taulukko 8. RabMab2-vasta-aineen konsentroida

Mittaus	Absorbanssi	Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml)	Vasta-aineen tilavuus (μl)
Eluoitu vasta-aine	1,2091	0,90	1500

Vasta-ainetta saatiin noin 1500 μl ja sen konsentraatio oli 0,90 mg/ml, joten saannoksi saatiin noin 1,35 mg.

Taulukko 9. RabMab3-vasta-aineen konsentroidi

Mittaus	Absorbanssi	Karkea IgG-pitoisuus (mg/ml)	Vasta-aineen tilavuus (µl)
Eluoitu vasta-aine	1,257	0,94	1500

Vasta-ainetta saatiin noin 1500 µl ja sen konsentraatio oli noin 0,94 mg/ml, joten saannoksi saatiin noin 1,41 mg.

Taulukko 10. Käytetyt vasta-aineet ja niiden dissosiaatiovakiot

Vasta-aine	Dissosiaatiovakio (nM = 10 ⁻⁹ M)
RabMab1	0,267
RabMab2	122,9
RabMab3	102,6
Fab1	1,1
Fab2	57,4
Fab3	0,016
Fab4	17,5
Fab5	21,5
Mab1	0,6

3 VASTA-AINEIDEN IMMOBILISOINTI

Yksinkertainen tapa parantaa antigeenin erotusta näytteestä on kiinnittää ei-kilpailevassa määrityksessä toinen vasta-aine liukenemattomaan pintaan, kuten koeputkeen tai mikrotiitterilevyn kuoppaan. Määrityksiä, joissa ainakin yksi komponentti immobilisoidaan kiinteään faasiin, kutsutaan kiinteän faasin immunomäärityksiksi.²

Proteiinit kiinnittyvät muovin tai lasin pintaan passiivisella adsorptiolla. Hydrofobisten voimien ansiosta, niiden kiinnittyminen saattaa olla hyvinkin voimakasta. Sitoutuminen tapahtuu, koska vesimolekyylien sitoutumiskyky toistensa kanssa on suurempi kuin hydrofobisten materiaalien, kuten muovin tai proteiinien polaarittomien osien kanssa. Eli proteiinien hydrofobisten osien syrjäytyminen vesiliuoksesta on syynä niiden kiinnittymiseen muovin pintaan. Mitä suurempi proteiini sitä vahvemmin se kiinnittyy muoviin, sillä niillä on suuremmat hydrofobiset alueet, jotka tarjoavat useampia kiinnityskohtia.²

Pinnoitusliuoksen vasta-ainekonsentraatio vaikuttaa pinnoitusprosessin nopeuteen. Mitä suurempi pitoisuus on sitä nopeammin sitoutuminen tapahtuu. Täytyy kuitenkin huomioida, että liian suuret pitoisuudet voivat haitata pinnoitusta, sillä proteiinit saattavat kasautua.²

Useimpien vasta-aineiden optimisitoutuminen tapahtuu neutraalissa pH:ssa tai hieman emäksisessä. Proteiineilla yleisesti kaikkein tehokkain pH-alue sitoutumiseen on lähellä isoelektristä pistettä. Tämä voi johtua siitä, että se minimoi proteiinin varaukset ja siten maksimoi proteiinin hydrofobisuuden.² Yleensä pH valitaan hieman vasta-aineen isoelektrisen pisteen yläpuolelta, koska se poistaa hieman happamat olosuhteet muovin pinnasta ja edistää vasta-aineen Fc-alueen sitoutumista.²

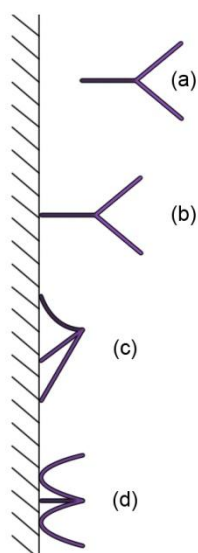
Liuoksen ionivahvuudella on vain pieniä vaikutuksia sitoutumiseen, mutta tiettyjen ionien läsnäolo voi olla tarpeellista vasta-aineen rakenteen stabiilisuuden kannalta.²

Lämpötilalla voi olla hyvinkin suuria vaikutuksia sitoutumisnopeuteen ja sen nostattaminen nopeuttaa pinnoitusprosessia.²

Se määrä proteiinia, joka voi sitoutua tietylle alueelle, on riippuvainen proteiinin koosta sekä sitoutumisalueesta. Nyrkkisääntönä on, että 0,5 – 1 µg IgG:tä voi sitoutua 1 cm² alueelle tehokkaasti.²

Aika on myös eräs huomioitavista muuttujista. Suurissa pitoisuuksissa pääosa sitoutumisesta tapahtuu jo muutamissa minuuteissa. Perinteiset pinnoitukset hoidetaan kuitenkin yön yli kestäväillä inkubaatioilla.²

Sitoutuminen muoviin voi vaikuttaa proteiinien muotoon ja vähentää niiden sitoutumiskykyä. Tämä on tärkeä asia esimerkiksi ei-kilpailevassa immunomäärityksessä, jossa toinen vasta-aine immobilisoidaan. Proteiinin hydrofobiset osat saattavat olla sen sisällä ja varaukselliset osat ulkopuolella, kun ne ovat vesiliuoksessa. Muovin pintaa lähestyttäessä proteiinin hydrofobiset osat vetävät sitä puoleensa ja varaukselliset osat loitonevat. Osa proteiineista säilyy normaaleina kiinnittyessään muoviin, osa taas omaksuu paremman sitoutumiskyvyn ja osa menettää sitoutumiskykyään tai jopa denaturoituu.²



Kuva 4. Vasta-aineen sitoutuminen kiinteään pintaan: (a) Sitoutumaton vasta-aine. (b) Vasta-aineen toivottu sitoutuminen, jolloin molemmat antigeenispesifiset alueet ovat vapaina. (c) Mikäli vasta-aineen Fab-osat ovat

hydrofobisia, niin ne voivat myös kiinnittyä kiinteään pintaan, jolloin vasta-aine ei voi sitoa antigenejä steerisen esteen vuoksi. (d) Todenmukainen sitoutuminen. Vasta-aineen useat hydrofobiset alueet ovat kiinnittyneet muovin pintaan, mutta antigeenispesifiset alueet ovat vapaina sitoutumiselle.

Polystyreeni on ideaalimateriaali vasta-aineiden immobilisoinnille. Se on halpaa ja helposti muokattavissa. Sen pinnan ominaisuudet ovat sopivia proteiinien adsorptiolle. Vaikka proteiinien sitoutuminen tapahtuu hydrofobisten vuorovaikutusten ansiosta, on huomattu myös hydrofiilisten alueiden olevan tarpeellisia. On osoitettu, että optimi sitoutuminen tapahtuu, kun saatavilla on noin yhtä suuret määrät polaarisia ja polaarittomia alueita. Polystyreeni sisältää lähellä sen pintaa happiatomeja, jotka se on absorboinut ilmakehästä sen valmistusvaiheessa. Tämä lisää polaarisia alueita muuten hydrofobiseen polymeerirakenteeseen. Pinnalla olevien happiatomien määrää voidaan kasvattaa vaikka γ -säteilyllä, joka hapettaa pinnan hapen läsnäollessa. Monille proteiineille tämä lisää pinnan sitoutumiskapasiteettia suuresti.²

3.1 Pinnoitusprosessi

Sandwich-parin aikaan saamiseksi immobilisoitiin Fab1-5, Mab1 sekä RabMab1 vasta-aineet Nunc Maxisorp Mikrotiitteri 96-kuoppaisiin kuoppalevyihin.

Valmistettiin pinnoituspuskuriliuos ja saturointipuskuriliuos.

Taulukko 11. Pinnoituspuskuri ja saturointipuskuri

Pinnoituspuskuri pH 7,4	Saturointipuskuri pH 7,0
16,2 mM Na₂HPO₄	30 mM Na₂HPO₄
3,8 mM NaH₂PO₄	20 mM NaH₂PO₄
150 mM NaCl	6 % Trehaloosi
	0,1 % Germall
	0,1 % BSA-TSA

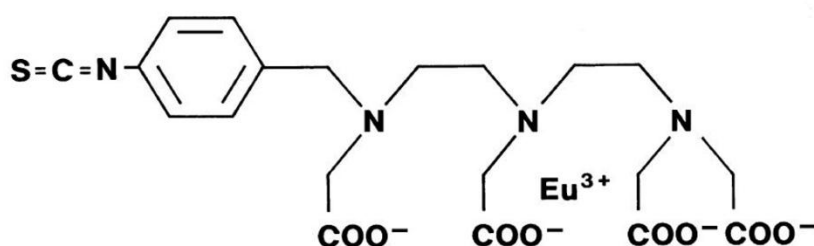
Tarkoituksena oli saada jokaiseen kaivoon 500 ng vasta-ainetta sekä 100 μ l pinnoitusliuosta, joten valmistettiin jokaisesta vasta-aineesta 5 μ l/mg -

pitoisuuksiset liuokset pinnoituspuskuriin. Jokaisesta vasta-aineesta valmistettiin 10 levyä, paitsi Mab1-vasta-aineesta valmistettiin 20 levyä.

Vasta-aineliuosta pipetoitiin rivipipetillä 100 µl jokaiseen kuoppaan, jonka jälkeen levyjä inkuboitiin yön yli olosuhdekaapissa (+35 °C / 30 % ilmankosteus). Seuraavaksi levyt pestiin kaksi kertaa Delfia Wash-liuksella levypesurin avulla. Pesun jälkeen levyihin dispensoitiin 280 µl saturointiliuosta rivipipetillä ja ne inkuboitiin muovilaatikoissa huoneenlämmössä yön yli. Sitten levyt aspiroitiin levypesurilla ja kuivattiin olosuhdekaapissa yön yli (+30 °C / 8 % ilmankosteus). Lopuksi levyt pakattiin foliopusseihin kuivauspussin kanssa säilytystä varten.

4 VASTA-AINEIDEN LEIMAUS

Analyyttipitoisuuden mittaamisen mahdollistamiseksi aikaeroitteisella fluorometrialla, vasta-aineisiin kiinnitettiin N1-Eu –kelaatti, jolloin yhdisteestä muodostui niin sanottu leima.



Kuva 5. N¹-(p-isothiocyanaatobenzyl)-diethylene triamine tetra-acetic acid-Eu³⁺ -kelaatin kemiallinen rakenne⁴

Leiman käyttö perustuu sen vasta-aineosan spesifiseen kiinnittymiseen mitattavaan analyttiin sekä sen kelaattiosaan, joka sisältää fluoresoivaa europiumia tai vaihtoehtoisesti jotain muuta lantanoidia. Kun leima on kiinnittynyt mitattavaan analyttiin, se käsitellään Delfia Enhancement Solution –liuoksella, joka hajottaa kelaatin vapauttaen europiumin, joka voidaan mitata aikaeroitteisella fluorometrialla.

4.1 Leima-vasta-aineiden valmistus

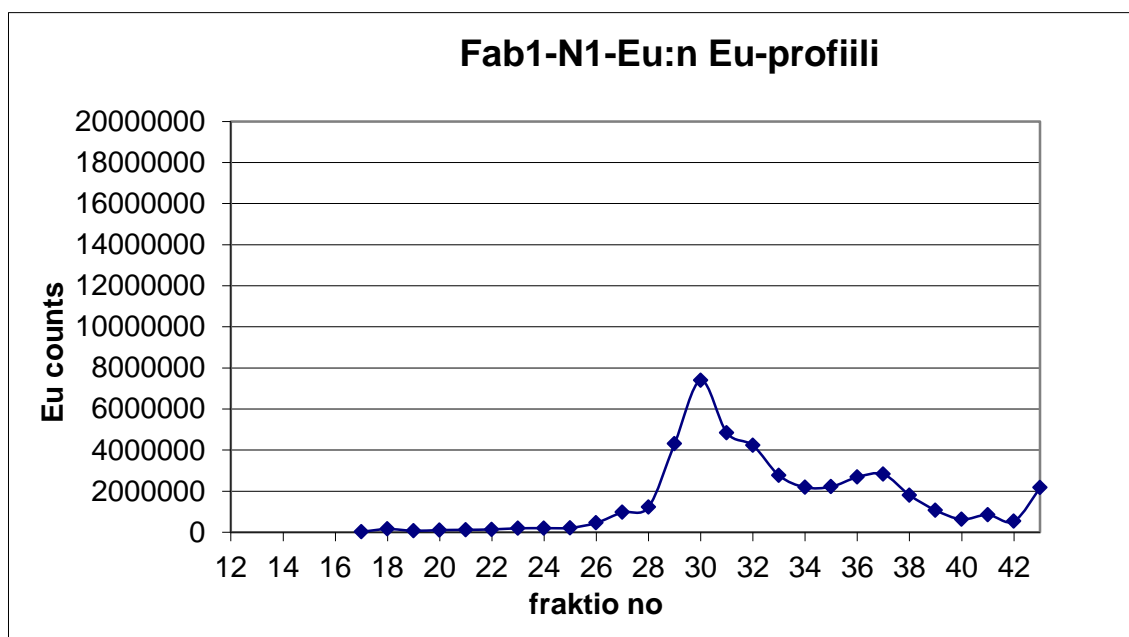
Yhdeksästä työssä käytetyistä vasta-aineista valittiin leimattavaksi kolme, joilla oli parhaimmat dissosiaatiiovakiot.

Taulukko 12. Leimattavat vasta-aineet

Leima	Dissosiaatiiovakio
Fab1	1,1 nM
Fab3	0,016 nM
RabMab1	0,267 nM

Leimaamisprosessin alussa valmisteltiin leimareaktio. Leimattava IgG, puskuri, vesi ja kelaatti pipetoitiin eppendorf-putkeen, sekoitettiin hellävaraisesti ja laitettiin jääkaappiin 18 tunniksi reagoimaan. Puskurina käytettiin 1 M Na₂CO₃ – puskuria ja reaktion pH säädettiin 9,3:een 2M natriumhydroksidilla. Kelaattia laitettiin reaktioon noin 200-kertainen ylimäärä.

Reaktio puhdistettiin ajamalla se Superdex HR 10/30 24 ml –pylvään lävitse käyttämällä eluenttina 50 mM TSA + 0,5 M NaCl. Kerättiin 15 pisaran fraktioita, jolloin yhden fraktion tilavuudeksi tuli noin 500 µl. Jokaisesta fraktiosta otettiin 1 µl, johon lisättiin 1000 µl Delfia Enhancement Solution –liuosta ja mitattiin Europium -pitoisuudet Victorilla. Mittaustuloksista piirrettiin kuvaaja, jonka perusteella päätettiin mitkä fraktiot yhdistetään.



Kuvio 7. Fab1-N1-Eu-leiman fraktiot

Kuvion 7 perusteella yhdistettiin erikseen fraktiot 29-33 ja 34-38.

Molemmista pooleista mitattiin puhdistuksen jälkeen Eu-pitoisuus. Pooleista valmistettiin laimennossarjat sekä niille rinnakkaiset laimennossarjat.

Taulukko 13. Poolien laimennokset

Pooli	Enhancement Solution	Laimennoskerroin
10 µl	1000 µl	10 ⁻²
10 µl	1000 µl	10 ⁻⁴
10 µl	1000 µl	10 ⁻⁶

Eu-standardista tehtiin myös rinnakkaiset laimennokset 10 µl + 1000 µl Delfia Enhancement Solutionia, jolloin standardin pitoisuus oli 1 nM. Poolin, jonka laimennoskerroin oli 10⁻⁴ ja Eu-standardin pitoisuudet mitattiin Victorilla ja leimapoolien Eu-pitoisuudet laskettiin kertomalla laimennoskerroin leimapoolin mitatulla pitoisuudella ja jakamalla se Eu-standardin mitatulla pitoisuudella.

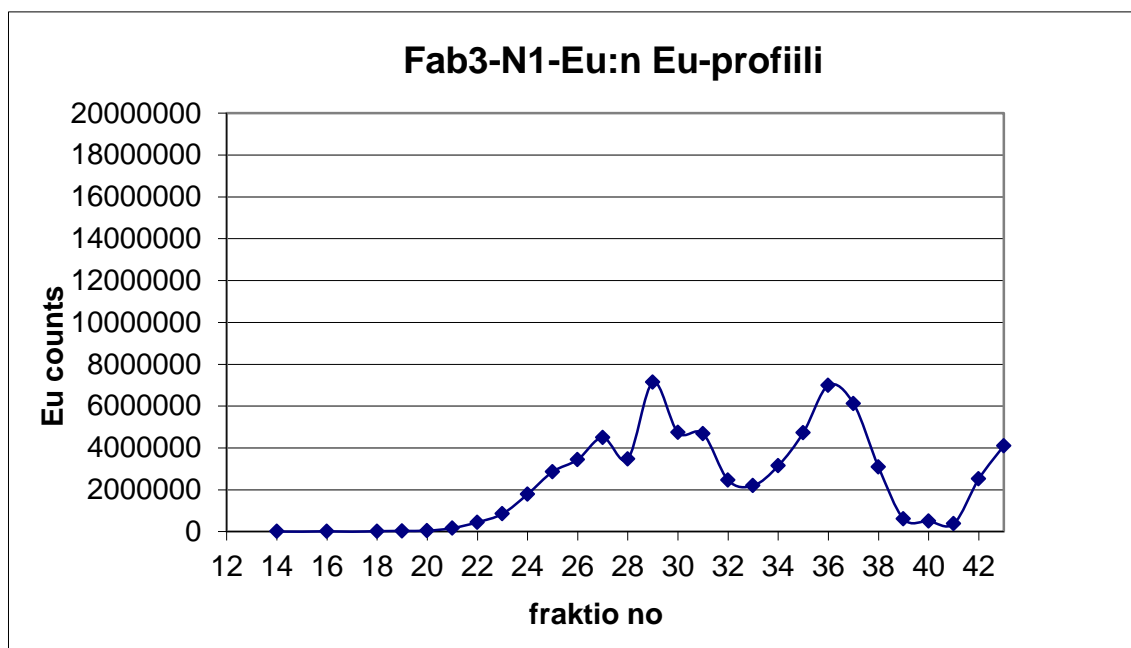
Leimapoolien proteiinipitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 280 nm käyttäen nollanäytteenä 50 mM TSA:ta. Sen avulla saatiin laskettua saantoprosentti sekä nähtiin, kuinka hyvin kelaatti oli kiinnittynyt vasta-aineeseen.

Taulukko 14. Fab1-N1-Eu leimapoolit

Pooli	Eu-pitoisuus	Proteiinipitoisuus	Saantoprosentti	Eu / IgG
29-33	4,06 µM	1333 nM	77 %	3,0
34-38	12,92 µM	-248 nM	-14 %	-52,2

Kuviossa 11 näkyvien tulosten mukaan ainoastaan pooli fraktioista 29-33 sisälsi toimivaa leimaa. Pooliin lisättiin 7,5 % DTPA-BSA:ta 0,1 % poolin tilavuudesta säilyvyyden takaamiseksi.

Samat puhdistus- ja mittausmenetelmät suoritettiin myös vasta-aineille Fab3 ja RabMab3.

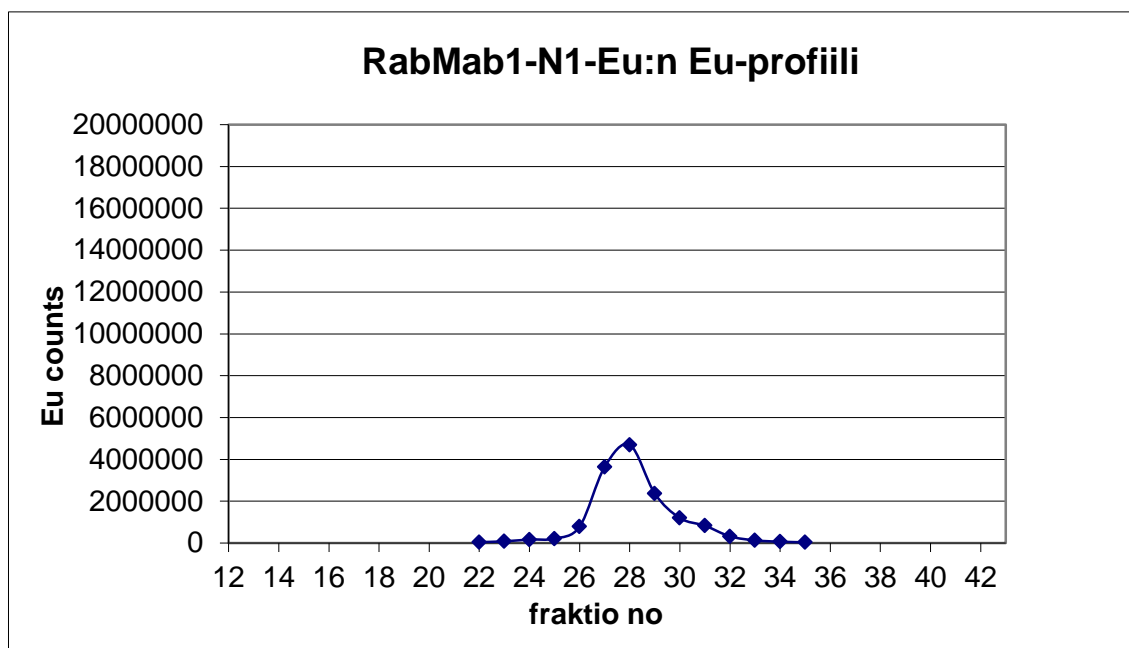


Kuvio 8. Fab3-N1-Eu-leiman fraktiot

Kuvion 8 perusteella yhdistettiin fraktiot 24-28, 29-32 ja 33-38.

Taulukko 15. Fab3-N1-Eu leimapoolit

Pooli	Eu-pitoisuus	Proteiinipitoisuus	Saantoprosentti	Eu / IgG
24-28	5,54 μ M	313 nM	18 %	17,7
29-32	5,76 μ M	306 nM	14 %	18,8
33-38	5,45 μ M	140 nM	10 %	38,9



Kuvio 9. RabMab1-N1-Eu-leiman fraktiot

Kuvion 9 perusteella yhdistettiin fraktiot 27-30.

Taulukko 16. RabMab1-N1-Eu leimapolit

Pooli	Eu-pitoisuus	Proteiinipitoisuus	Saantoprosentti	Eu / IgG
27-30	5,37 μ M	384 nM	21 %	14,0

4.2 Leimojen testaus

Ennen määritysten aloittamista Fab1 ja Fab3-leimat testattiin, koska samasta leimasta oli monta poolia.

Leimoja testattiin Mab1-pinnoitetulla mikrotiiterilevyllä. Kuoppiin pipetoitiin ensin 60 μ l Assay Buffer –puskuriliuosta. Sitten kuoppiin pipetoitiin 40 μ l analyytti X:n kalibraattoreita A, B, D ja F, kolmella rinnakkaisella, kuvion 10 mukaisesti. Kuoppia inkuboitiin huoneenlämmössä ja ravistelussa tunnin ajan, jonka jälkeen kuopat pestiin 4 kertaa levypesurissa käyttäen Delfia Wash-liuosta. Pesun jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin kuvion 10 mukaisesti 100 μ l leimaa pitoisuudessa 250 ng/ml. Levyä inkuboitiin taas tunnin ajan

huoneenlämmössä ja ravistelussa, jonka jälkeen kuopat pestiin 4 kertaa levypesurissa. Lopuksi kuoppiin lisättiin 200 µl Delfia Enhancement Solution-liuosta ja annettiin kehittyä 5 minuuttia, kunnes europium-pitoisuudet mitattiin Victorilla.

	1-3	4-6	7-9	10-12
A	Kalibr. A Fab1-N1-Eu pooli 1	Kalibr. B Fab1-N1-Eu pooli 1	Kalibr. D Fab1-N1-Eu pooli 1	Kalibr. F Fab1-N1-Eu pooli 1
B	Kalibr. A Fab1-N1-Eu pooli 2	Kalibr. B Fab1-N1-Eu pooli 2	Kalibr. D Fab1-N1-Eu pooli 2	Kalibr. F Fab1-N1-Eu pooli 2
C	Kalibr. A Fab3-N1-Eu pooli 1	Kalibr. B Fab3-N1-Eu pooli 1	Kalibr. D Fab3-N1-Eu pooli 1	Kalibr. F Fab3-N1-Eu pooli 1
D	Kalibr. A Fab3-N1-Eu pooli 2	Kalibr. B Fab3-N1-Eu pooli 2	Kalibr. D Fab3-N1-Eu pooli 2	Kalibr. F Fab3-N1-Eu pooli 2
E	Kalibr. A Fab3-N1-Eu pooli 3	Kalibr. B Fab3-N1-Eu pooli 3	Kalibr. D Fab3-N1-Eu pooli 3	Kalibr. F Fab3-N1-Eu pooli 3

Kuvio 10. Fab-leimojen testaus, pipetointikaavio

Fab1-N1-Eu-leiman pooli 1 antoi hyväksyttäviä tuloksia, sillä se antoi kalibraattori F:stä yli 25000 counts-yksikköä, mutta pooli 2 sisälsi ilmeisesti vain leimaantunutta epäpuhtautta. Leiman Fab3-N1-Eu poolit 1 ja 2 antoivat myös hyväksyttäviä tuloksia ja ne yhdistettiin antaen loppupitoisuudeksi 37,2 µg/ml.

Leiman Fab3-N1-Eu pooli 3:sta kävi ilmi, että leiman toinen Fab-osa oli proteolyttisesti irronnut ja siitä oli tullut monovalentti.

Leima	Fab1-N1-Eu pooli 1 (29-33)	Fab1-N1-Eu pooli 2 (34-38)	Fab3-N1-Eu pooli 1 (24-28)	Fab3-N1-Eu pooli 2 (29-32)	Fab3-N1-Eu pooli 3 (33-38)
Cal A	847	1244	1207	1374	3575
	820	1053	1033	1217	2952
	891	1037	1515	1379	3141
Cal B	884	1142	1968	2088	3542
	1031	1263	1870	2931	2984
	987	1146	1974	2338	3725
Cal D	1943	1520	8963	8788	7168
	1889	1316	8846	8969	7265
	2146	1418	9474	8535	7514
Cal F	31459	9302	201208	187355	114355
	31377	8959	198033	187430	115503
	31766	9376	204712	189069	116180

Kuvio 11. Mittausten counts-määrät

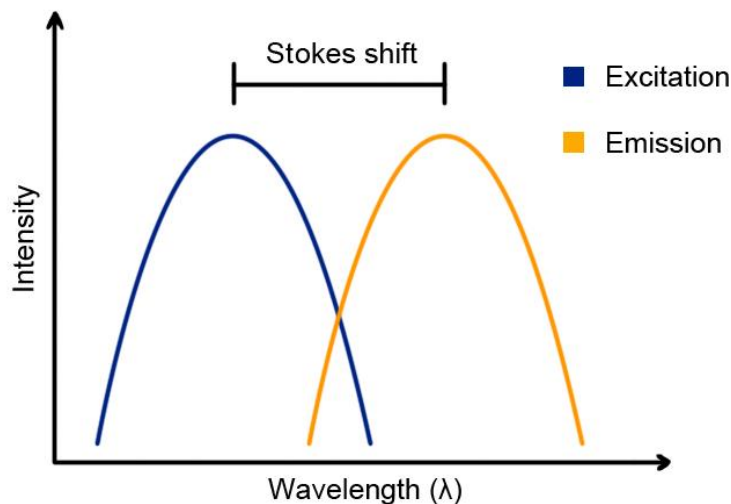
Taulukko 17. Kalibraattorien pitoisuudet

Kalibraattori	Pitoisuus (pg/ml)
A	0
B	17,8
C	39,6
D	166
E	870
F	4392

5 IMMUNOMÄÄRITYS

5.1 Aikaerotteinen fluorometria

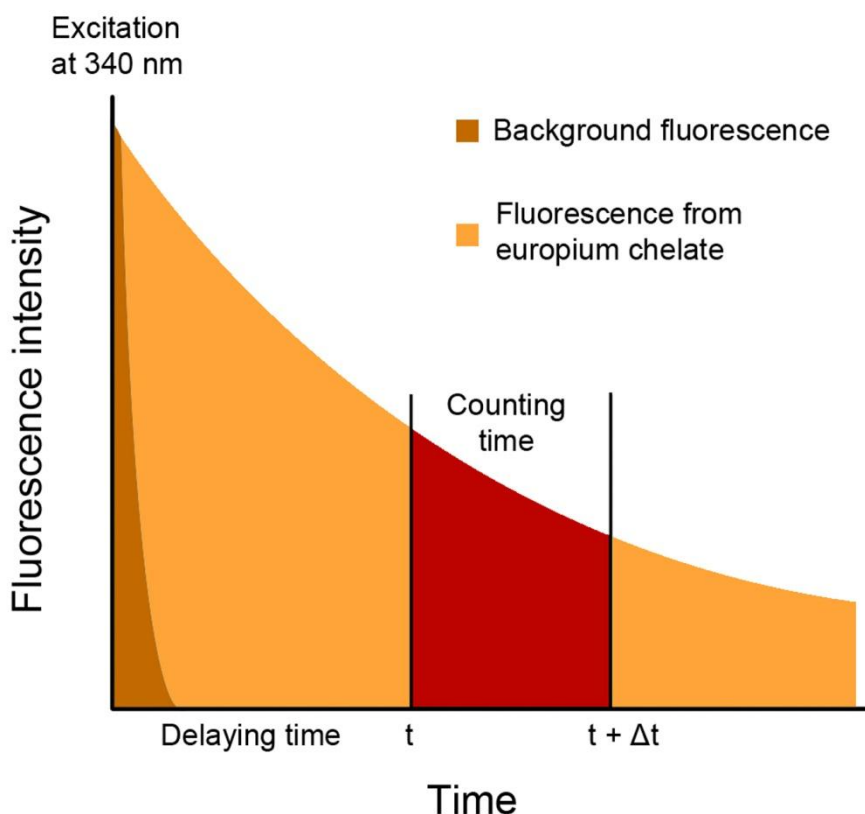
Fluorometria perustuu tiettyjen molekyylien, fluoroforien, kykyyn absorboida valoa tietyllä aallonpituudella ja emittoida valoa toisella, pidemmällä aallonpituudella. Jos fluoroforille annetaan valoa tietyllä aallonpituudella, sen eksitaatio-aallonpituudella, se jännittyy ja alkaa resonoimaan samalla taajuudella, kuin annettu valo. Kun valon syöttö lopetetaan, fluoroforimolekyylipalaa takaisin aiempaan alempaan energiatasoonsa ja purkaa jännityksen emittoimalla valoa. Valon absorptioaallonpituuden ja emissioaallonpituuden erotusta kutsutaan Stokesin siirtymäksi.²



Kuva 6. Stokesin siirtymä³

Immunomäärityksissä tavallisten fluorometrinen mittausten tarkkuus on rajallinen taustasignaalin häirinnän suuruuteen. Tämän taustasignaalin häiriön pystyy poistamaan mikäli asetetaan aikaväli eksitaation ja mittauksen välille, varsinkin, jos fluoroforilla on suhteellisen pitkä purkautumisaika. Tämä toimii aikaeroitteisen fluorometrian perustana.²

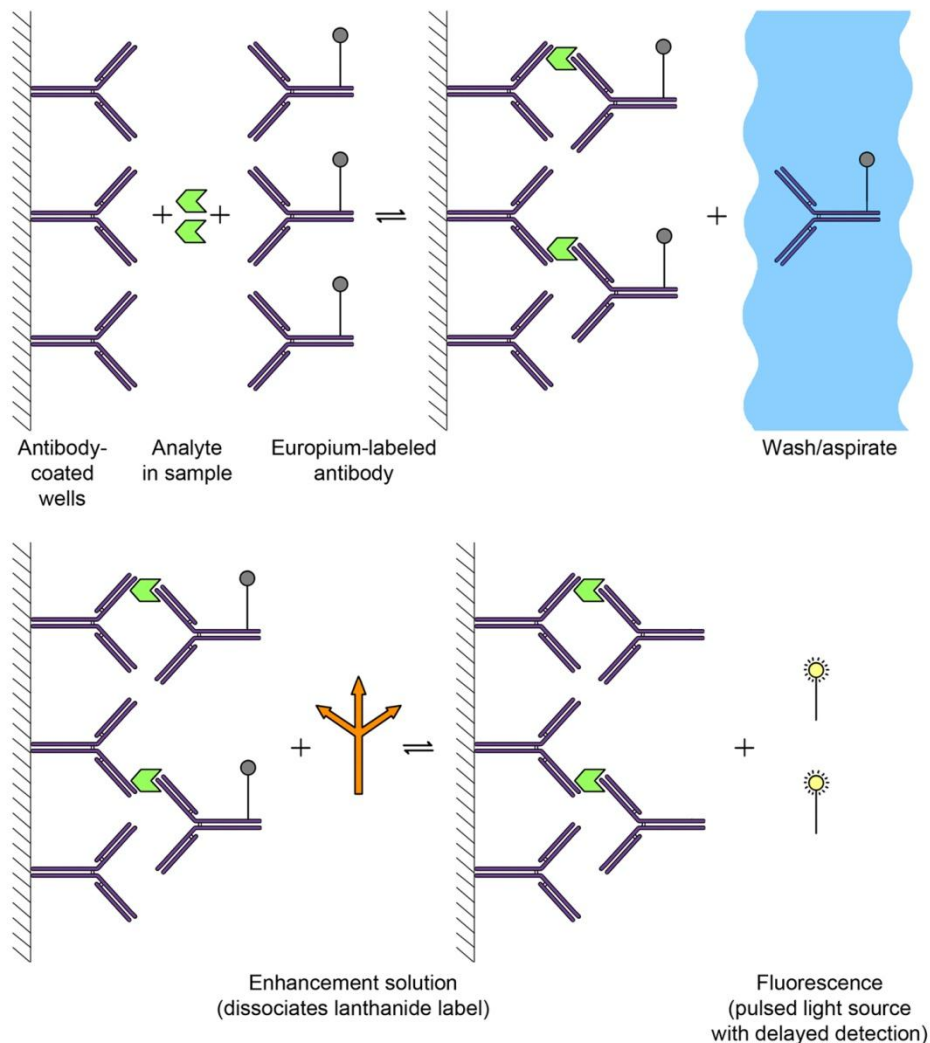
Jotkin lantanoidit, kuten europium (Eu), muodostavat hyvin fluoresoivia kelaatteja tiettyjen orgaanisten ligandien kanssa, jotka absorboivat eksitaatiovalon ja siirtävät sen energian. Näillä kelaateilla on hyvin suuri Stokesin siirtymä (> 200 nm), pitkät purkautumisajat (> 500 ns) ja korkeat kvanttisaannot (30 – 100 %). Pitkät purkautumisajat tekevät näistä fluoroforeista ideaaleja aikaeroitteeseen fluorometriaan, ja suuret Stokesin siirtymät minimoivat häiriön muista näytteen fluoresoivista komponenteista, jotka aiheuttavat lyhytikäistä fluoresenssia, ja valon hajonnasta. Nämä vähentävät taustasta johtuvia häiriöitä mitattavaan signaaliin, joten määritykset ovat hyvin herkkiä.²



Kuva 7. Aikaeroitteisen fluorometrin mittaus³

Käytössä oli siis Fab1-5, Mab1 ja RabMab1 –vasta-aineilla pinnoitettuja levyjä sekä Fab1, Fab3, RabMab1 ja Mab1 –vasta-aineleimoja, joista oli tarkoitus löytää sopivin pari kyseisen analyytin X:n pitoisuuden määrittämiseen. Parasta

sandwich-paria lähdettiin etsimään käyttämällä eri leimoja ja levyjä ristiin. Leimoista kontrollina oli Mab1-leima, joka oli teollisesti valmistettu.



Kuva 8. Ei-kilpailevan immunomäärityksen vaiheet

5.2 Immunomäärityksessä käytetty menetelmä

Määrityksissä käytetty menetelmä oli samanlainen kuin Fab-leimojen testauksessa käytetty menetelmä. Käytettyihin kuoppiin pipetoitiin ensin 60 μ l AB-puskuria, minkä jälkeen lisättiin 40 μ l analyytti X:n kalibraattoreita A-F ja noin 100 pg/ml analyytti X:ää sisältävää seeruminäytettä kuvion 11 mukaisesti. Jokaista kalibraattoria ja näytettä kohti tehtiin kolme replikaattia. Pipetoinnin jälkeen levyä inkuboitiin yhden tunnin ajan huoneenlämmössä, ravistelussa.

Inkuboinnin jälkeen levy pestiin levypesuria käyttäen Delfia Wash-liuoksella 4 kertaa. Pesun jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 100 µl leimaa, joka oli laimennettu AB-puskuriin ja oli pitoisuudeltaan 250 ng/ml. Leiman annostelun jälkeen levyä inkuboitiin uudelleen yhden tunnin ajan ravistelussa, huoneenlämmössä. Sitten levy pestiin levypesurilla käyttäen Delfia Wash-liuosta. Pesun jälkeen kuoppiin lisättiin Delfia Enhancement Solutionin kaltaista Delfia Inducer –mittaliuosta ja annettiin kehittyä ravistelussa viisi minuuttia, minkä jälkeen kuoppien europium-pitoisuudet mitattiin Victorilla.

	1-3	4-6	7-9	10-12
A	1. Kalibraattori A 2. Leima	1. Kalibraattori B 2. Leima	1. Kalibraattori C 2. Leima	1. Kalibraattori D 2. Leima
B	1. Kalibraattori E 2. Leima	1. Kalibraattori F 2. Leima	1. Näyte 100 pg/ml 2. Leima	

Kuvio 12. Immunomäärityksen pipetointikaavio

5.3 Immunomäärityksen tulokset

Mikäli saatavilla ei ole datan käsittelyohjelmia, joilla pystytään tekemään monimutkaisiakin sovitusfunktioita, jotka voivat soveltua immunomäärityksille paremmin, tulokset on laskettava perinteisemmillä ohjelmilla, kuten Excelillä. Suorat piirrettiin laskemalla ensin counts-määristä ja kalibraattorien pitoisuuksista logaritmit. Pisteistä otettiin lineaarinen regressio, joka oli pakotettu kulkemaan nollan kautta siten, että y-akselin counts-määristä oli vähennetty nollanäytteen (Cal A) antamien counts-määrien keskiarvo. Mikäli rinnakkaismäärityksen tulos erosi tuloksien keskiarvosta yli 24 % tai taustan poistamisen jälkeen määritysten signaalit olivat negatiivisia, ne hylättiin. Näytteiden pitoisuus laskettiin standardisuoran regressiosuoran yhtälön mukaan.

Esimerkkinä Mab1-levy/RabMab1-leima –määrityksen suoran yhtälö:

$$y = 0,9138x + 1,1396 \rightarrow x = \frac{y-1,1396}{0,9138}$$

Yhtälöstä ratkaistiin x , joka on mitatun näytteen konsentraation logaritmi. Tämän jälkeen luvusta otettiin sen käänteislogaritmi 10^x , jolloin saatiin tulos yksikössä pg/ml.

Levy	Mab1	Fab1	Fab3	RabMab1	RabMab1	Mab1	Fab3	Fab1
Leima	RabMab1	RabMab1	RabMab1	Fab3	Mab1	Fab3	Mab1	Mab1
Keskiarvo	308,6	461,2	345,1	332,8	43,5	130,8	194,4	62,5

Kuvio 13. Immunomääritysten tulokset laskettuna Excelillä (pg/ml)

Merkittävä sitoutuminen määräytyi sen mukaan, mikä oli mitattu europium määrä väkevimmässä analytytti X:n kalibraattorissa F. Mikäli valon määrä counts-yksikköinä oli yli 100 000, sitoutuminen oli huomattavan suurta.

Mab1-levy/RabMab1-leima –yhdistelmässä sitoutuminen oli alhaista kalibraattorien sekä näytteen kohdalla. Nollakalibraattorin ja laimeimman kalibraattorin rinnakkaismäärityksissä oli suurta hajontaa. Nollakalibraattorin counts-keskiarvo oli noin 3500. Väkevimmän kalibraattorin counts-luvut olivat alle 40 000, joten vasta-ainekombinaatio ei ollut sopiva kyseiselle määrittelykselle. Pitoisuudeksi laskettiin 308,6 pg/ml.(Liite 1)

Fab1-levy/RabMab1-leima –yhdistelmässä oli kaikkien määrittelysten korkein tausta, eli nollakalibraattorin counts-keskiarvo oli yli 13 000. Väkevimmän kalibraattorin counts-keskiarvo oli myös noin 40 000, eli sitoutuminen oli myös heikkoa. Määrittelyksessä laskettu pitoisuus oli kaikista suurin 461,2 pg/ml.(Liite 2)

Fab3-levy/RabMab1-leima –yhdistelmässä oli toiseksi korkein tausta counts-keskiarvolla 11 000. Kolmen laimeimman kalibraattorin signaalit erottuivat hädintuskin taustan signaalista. Väkevimmän kalibraattorin counts-keskiarvo oli alle 30 000, josta voidaan päätellä, että sitoutuminen kyseisen vasta-ainekombinaation kanssa oli hyvin huonoa. Pitoisuudeksi saatiin määrittelyksellä 345,1 pg/ml.(Liite 3)

RabMab1-levy/Fab3-leima –yhdistelmässä taustan signaalien keskiarvo oli noin 8000 counts-yksikköä. Kolmen laimeimman kalibraattorin signaalit peittyivät taustan signaaliin kokonaan, joten standardisuora koostui vain kahdesta kalibraattoripisteestä. Väkevimmän kalibraattorin counts-keskiarvo oli myös alle

40 000. Sitoutuminen oli siis huonoa. Suoran yhtälöllä saatiin pitoisuudeksi 332,8 pg/ml.(Liite 4)

RabMab1-levy/Mab1-leima –yhdistelmässä taustan signaalin keskiarvo oli noin 3000 ja kaikki kalibraattoripitoisuudet erottuivat taustasta hyvin. Väkevimmän kalibraattorin counts-keskiarvo oli noin 180 000, joten sitoutuminen oli hyvää. Näytteen sitoutuminen vasta-ainekombinaatioon tosin oli huono. Kaksi kolmesta rinnakkaisesta määrytyksestä antoi signaalit, jotka peittyivät taustaan ja kolmas signaali oli hyvin matala. Pitoisuudeksi laskettiin 43,5 pg/ml. (Liite 5)

Mab1-levy/Fab3-leima –yhdistelmässä huomattavaa sitoutumista oli havaittavissa vain Fab3-leiman kanssa. Mitattu analyytti X-näytteen pitoisuus oli tosin melko korkea. Sillä näytteen pitoisuus oli 100 pg/ml, mutta määrytys antoi pitoisuudeksi 130,8 pg/ml. Nollakalibraattorin counts-keskiarvo oli alle 3000 ja väkevimmän kalibraattorin yli 250 000.(Liite 6)

Fab3-levy/Mab1-leima –yhdistelmässä nollakalibraattorin signaalikeskiarvo oli noin 5000 ja väkevimmän kalibraattorin yli 230 000. Sitoutuminen oli huomattavaa, mutta analyytti X-näytteen pitoisuudeksi laskettiin 194,4 pg/ml.(Liite 7)

Fab1-levy/Mab1-leima –yhdistelmässä huomattiin olevan melkein yhtä hyvä sitoutuminen kuin Mab1-levy/Fab3-leima –kombinaatiossa, mutta mitattu analyytti X-näytteen pitoisuus oli haluttua matalampi 62,5 pg/ml. Määrytyksessä oli tosin kaikkein alhaisin taustasignaali, alle 900 counts-yksikköä.(Liite 8)

6 TULOSTEN TULKINTA JA YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli siis pystyttää immunomääritys, jolla pystyi mittaamaan analyytti X:n pitoisuuden seeruminäytteestä käyttämällä kahden vasta-aineen sandwich-paria.

Tehokkaimmaksi sandwich-pariksi osoittautui Fab3 ja Mab1 –vasta-aineiden kombinaatio. Pari antoi huomattavaa sitoutumista molemmissa orientaatioissa Fab3-levy/Mab1-leima sekä Fab3-leima/Mab1-levy. Fab1-levy ja Mab1-leima – pari osoitti myös huomattavaa sitoutumista, mutta antoi toivottua alhaisemman pitoisuuden analyytti X-näytteestä. Muissa kombinaatioissa sitoutuminen oli hyvin alhaista, eikä näytteen pitoisuuden mittaamisessa saatu toivottuja tuloksia.

RabMab1-3 vasta-aineita puhdistettiin eluimalla ne 0,1 M sitruunahapolla Protein A –pylvästä. Sitruunahappo eluutiopuskurina on voinut olla liian hapan ja aiheuttaa RabMab2 ja 3 –vasta-aineiden inaktivoitumisen hajottamalla niitä. Toisaalta RabMab2 ja 3 –vasta-aineille suoritettiin affiniteettimittaus puhdistamattomana, eivätkä ne silloinkaan antaneet mitään vastetta.

Pinnoitusprosessissa oli tärkeää pinnoitus- sekä saturointipuskurien koostumukset, jotta sitoutumiselle oli optimi pH sekä liuoksen ionivahvuus. On myös syytä säätää oikeanlaiset kuivausolosuhteet sekä määrittää sopivat pinnoitusajat.

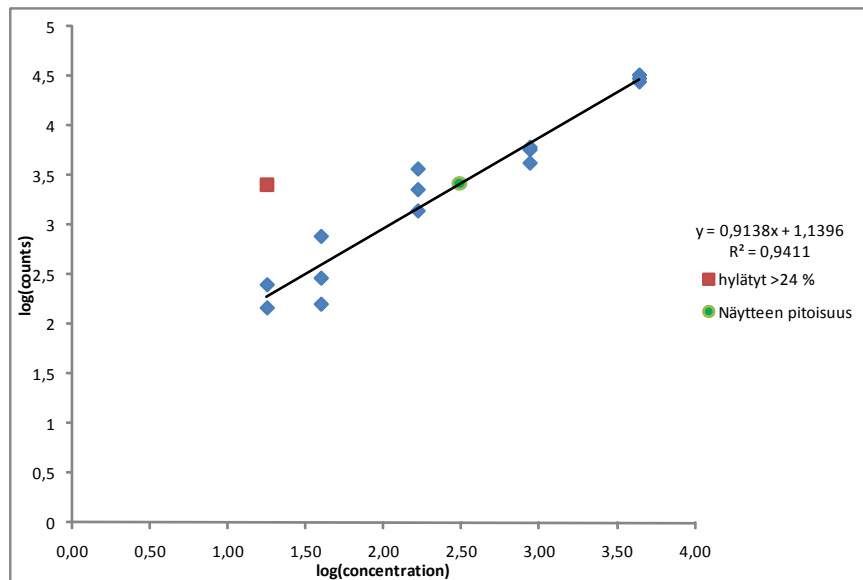
Leiman valmistuksessa oli tärkeää, että reaktioseoksen komponentteja oli oikea määrä. Leiman puhdistuksessa virheitä aiheutti välineiden europium-kontaminaatio, jota ei kokonaan saatu eliminoitua. Huomioitavaa on myös, että Fab3-N1-Eu –leiman pooli 3:n vasta-aineiden toinen Fab-osa irtosi proteolyttisesti ja se muuttui monovalentiksi.

Määrityksissä tarvitsee pitää huolta siitä, että on tarpeeksi pitkät inkubointi- sekä ravisteluajat, jotta sitoutuminen sekä kelaatin hajoaminen tapahtuisi.

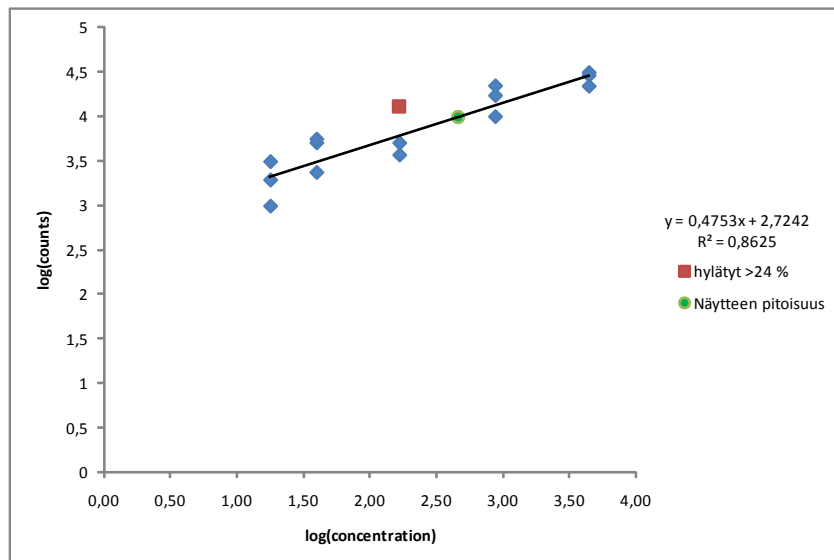
7 LÄHTEET

1. AbdSerotec HuCal Antibodies Technical Manual, First Edition by Francisco Ylera
2. The Immunoassay Handbook, Third Edition by David Wild ©2005, Published by Elsevier Ltd. ISBN: 0080445268
3. Lehtonen, Janina Leima-annostelun ja kuivauksen vaikutus kuivakaivomäärityksen taustaan. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
4. DELFIA® Eu-Labeling kit 1244-302 (viitattu online 06.10.2010) pdf-muodossa: http://las.perkinelmer.com/content/Manuals/man_1244-302.pdf
5. Rabbit Monoclonal Antibodies, A comparative study between a novel category of Immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies, Sabrina Rossi, MD, Licia Laurino, MD, et al. (viitattu online 07.10.2010) pdf-muodossa: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/124/2/295.long>
6. Epitomics Inc. Rabbit Monoclonal Technology (viitattu online 07.10.2010) www-muodossa: <https://www.epitomics.com/technology/tech.php>
7. Applications of time-resolved fluorometry with the DELFIA® method, PerkinElmer life sciences (viitattu online 06.11.2010) pdf-muodossa: http://las.perkinelmer.com/content/RelatedMaterials/Brochures/FLY_DELFIAApplicationsOfTRF.pdf

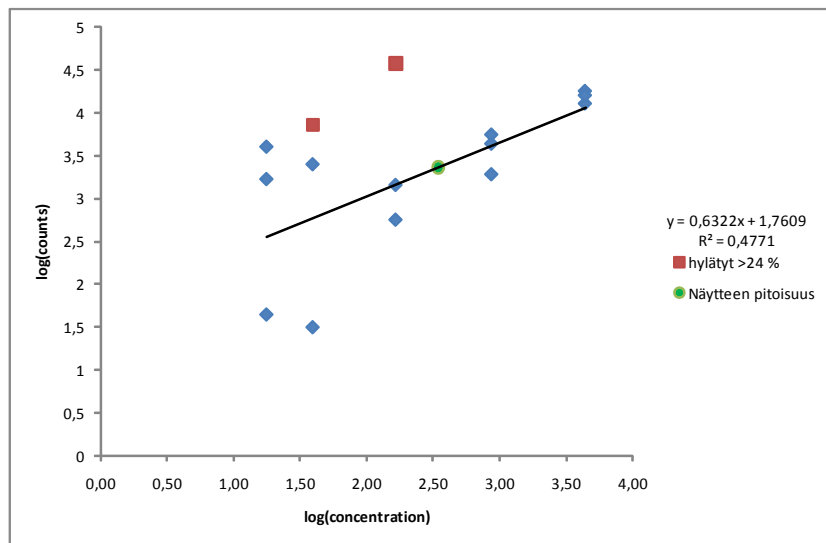
Mab1-levy RabMab1-leima	Määrittysten counts-määrät	Määrittysten keskiarvot	Ero keskiarvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts- määrien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuden logaritmi
Cal 0	4400	3463	27,06 %			
	3470		0,20 %			
	3456		-0,20 %			
Cal 17,8	3607	4445	-18,85 %	144	2,16	1,25
	6018		35,39 %	2555	3,41	1,25
	3710		-16,54 %	247	2,39	
Cal 39,6	3751	3865	-2,96 %	288	2,46	1,60
	3620		-6,35 %	157	2,20	1,60
	4225		9,30 %	762	2,88	1,60
Cal 166	7127	5899	20,82 %	3664	3,56	2,22
	5728		-2,90 %	2265	3,36	2,22
	4842		-17,92 %	1379	3,14	2,22
Cal 870	7667	8801	-12,88 %	4204	3,62	2,94
	9193		4,45 %	5730	3,76	2,94
	9543		8,43 %	6080	3,78	2,94
Cal 4392	36170	33710	7,30 %	32707	4,51	3,64
	31339		-7,03 %	27876	4,45	3,64
	33621		-0,26 %	30158	4,48	3,64
Analyytti X-näyte	5464	6198	-11,84 %	2001	3,30	
	7496		20,95 %	4033	3,61	
	5633		-9,11 %	2170	3,34	
Analyytti X:n pitoisuus logaritmina	2,3656					
	2,6987					
	2,4041					
Keskiarvo	2,4894					
10^(keskiarvo)	308,6					



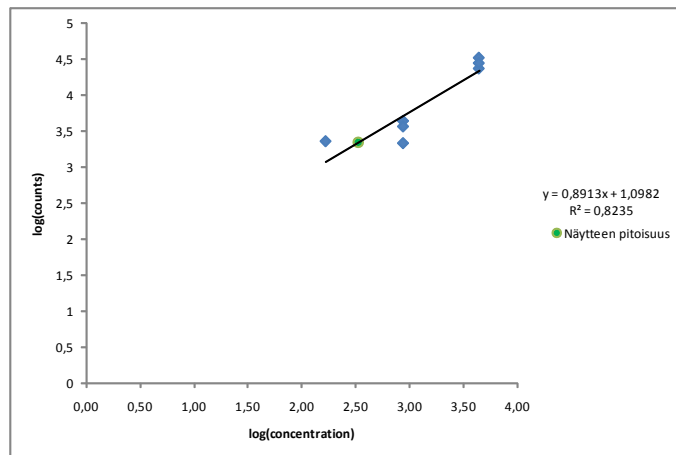
Fab1-levy RabMab1-leima	Määrittysten counts-määrät	Määrittysten keskiarvot	Ero keskiarvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien countsien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	11689	13991	-16,46 %			
	14717		5,19 %			
	15568		11,27 %			
Cal 17,8	17078	15985	6,84 %	3087	3,49	1,25
	14968		-6,36 %	977	2,99	1,25
	15910		-0,47 %	1919	3,28	1,25
Cal 39,6	16326	18287	-10,72 %	2335	3,37	1,60
	19016		3,99 %	5025	3,70	1,60
	19519		6,74 %	5528	3,74	1,60
Cal 166	17656	21165	-16,58 %	3665	3,56	2,22
	18995		-10,25 %	5004	3,70	2,22
	26844		26,83 %	12853	4,11	2,22
Cal 870	31070	30305	2,52 %	17079	4,23	2,94
	35951		18,63 %	21960	4,34	2,94
	23895		-21,15 %	9904	4,00	2,94
Cal 4392	45021	41191	9,30 %	31030	4,49	3,64
	35753		-13,20 %	21762	4,34	3,64
	42798		3,90 %	28807	4,46	3,64
Analyytti X-näyte	23418	28844	-18,81 %	9427	3,97	
	38976		35,13 %	24985	4,40	
	24139		-16,31 %	10148	4,01	
Analyytti Xn pitoisuus logaritmina	2,6303 3,5209 2,6976					
Keskiarvo	2,6639					
10^(keskiarvo)	461,2					



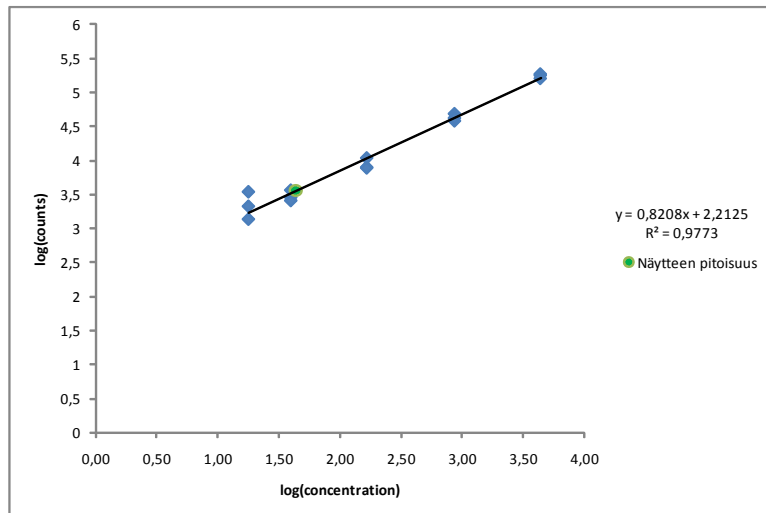
Fab3-levy RabMab1-leima	Määritysten counts-määrät	Määritysten keskiarvot	Ero keskiarvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts-määrien	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	11648	11271	3,34 %			
	11768		4,41 %			
	10397		-7,75 %			
Cal 17,8	11316	13205	-14,30 %	45	1,65	1,25
	15325		16,06 %	4054	3,61	1,25
	12973		-1,75 %	1702	3,23	1,25
Cal 39,6	13803	14542	-5,08 %	2532	3,40	1,60
	18520		27,36 %	7249	3,86	1,60
	11303		-22,27 %	32	1,51	1,60
Cal 166	11843	12284	-3,59 %	572	2,76	2,22
	12724		3,59 %	1453	3,16	2,22
	49104		299,76 %	37833	4,58	2,22
Cal 870	15668	15255	2,71 %	4397	3,64	2,94
	16888		10,71 %	5617	3,75	2,94
	13208		-13,42 %	1937	3,29	2,94
Cal 4392	29357	26978	8,82 %	18086	4,26	3,64
	24204		-10,28 %	12933	4,11	3,64
	27374		1,47 %	16103	4,21	3,64
Analyytti X-näyte	13780	13608	1,26 %	2509	3,40	
	13211		-2,92 %	1940	3,29	
	13834		1,66 %	2563	3,41	
Analyytti X:n pitoisuus logaritmina	2,5919 2,4152 2,6065					
Keskiarvo	2,5379					
10^(keskiarvo)	345,1					



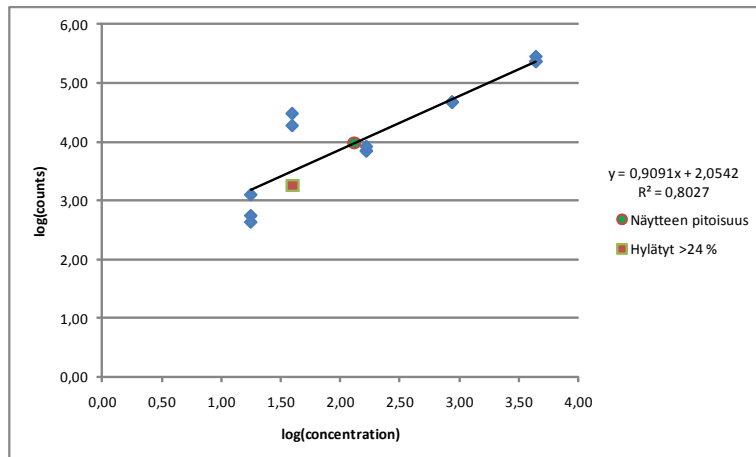
RabMab1-levy Fab3-leima	Määritysten counts-määrät	Määritysten keskianvot	Ero keskianvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts-määrien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	7843 8180 8072	8032	-2,35 % 1,85 % 0,50 %			
Cal 17,8	4758 12233 4017	4388	8,44 % 178,81 % -8,44 %	-3274 4201 -4015	- 3,62 -	1,25 1,25 1,25
Cal 39,6	5073 3263 4829	4388	15,60 % -25,64 % 10,04 %	-2959 -4769 -3203	- - -	1,60 1,60 1,60
Cal 166	6001 7359 10373	8866	-32,31 % -17,00 % 17,00 %	-2031 -673 2341	- - 3,37	2,22 2,22 2,22
Cal 870	12481 10232 11768	11494	8,59 % -10,98 % 2,39 %	4449 2200 3736	3,65 3,34 3,57	2,94 2,94 2,94
Cal 4392	41009 31519 35904	36144	13,46 % -12,80 % -0,66 %	32977 23487 27872	4,52 4,37 4,45	3,64 3,64 3,64
Analyytti X-näyte	47393 10251 7382	8817	437,55 % 16,27 % -16,27 %	39361 2219 -650	4,60 3,35 -	
Analyytti Xn pitoisuus logaritmina	4,6908 2,5222 -					
Keskianvo	2,5222					
10^(keskianvo)	332,8					



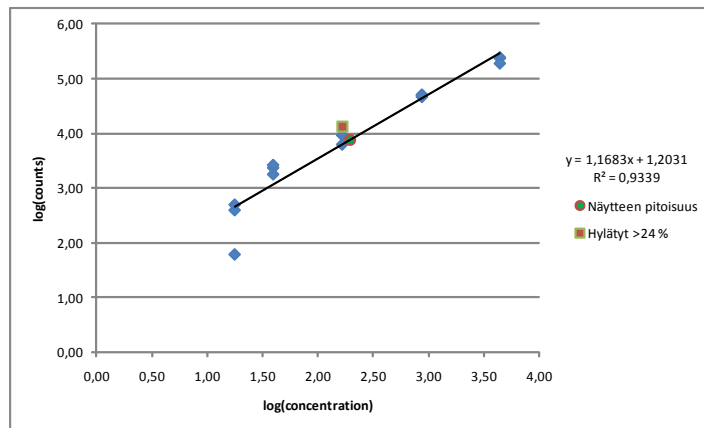
RabMab1-levy Mab1-leima	Määritysten counts-määrät	Määritysten keskiarvot	Ero keskiarvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts-määrien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	6733	3411	97,42 %			
	3621		6,17 %			
Cal 17,8	6866	5722	19,99 %	3456	3,54	1,25
	5525		-3,45 %	2115	3,33	1,25
	4776		-16,54 %	1366	3,14	1,25
Cal 39,6	6275	6438	-2,53 %	2865	3,46	1,60
	5978		-7,15 %	2568	3,41	1,60
	7061		9,68 %	3651	3,56	1,60
Cal 166	11359	12269	-7,41 %	7949	3,90	2,22
	11170		-8,96 %	7760	3,89	2,22
	14277		16,37 %	10867	4,04	2,22
Cal 870	52060	46382	12,24 %	48650	4,69	2,94
	41639		-10,23 %	38229	4,58	2,94
	45448		-2,01 %	42038	4,62	2,94
Cal 4392	189897	178684	6,28 %	186487	5,27	3,64
	181959		1,83 %	178549	5,25	3,64
	164197		-8,11 %	160787	5,21	3,64
Analyytti	2697	7016	-61,56 %	-714	-	
X-näyte	3742		-46,66 %	332	2,52	
	7016		0,00 %	3606	3,56	
Analyytti X:n pitoisuus logaritmina	-					
	0,3752					
Keskiarvo	1,6380					
10^(keskiarvo)	43,5					



Mab1-levy Fab3-leima	Määrittysten counts-määrät	Määrittysten keskiarvot	Ero keskiarvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts-määrien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	2912	2673	8,95 %			
	2600		-2,72 %			
	2506		-6,24 %			
Cal 17,8	3228	3422	-5,66 %	555	2,74	1,25
	3104		-9,28 %	431	2,63	1,25
	3933		14,94 %	1260	3,10	1,25
Cal 39,6	21635	27360	-20,92 %	18962	4,28	1,60
	33085		20,92 %	30412	4,48	1,60
	4487		-83,60 %	1814	3,26	1,60
Cal 166	9662	10155	-4,85 %	6989	3,84	2,22
	9769		-3,80 %	7096	3,85	2,22
	11033		8,65 %	8360	3,92	2,22
Cal 870	50450	50176	0,55 %	47777	4,68	2,94
	50081		-0,19 %	47408	4,68	2,94
	49997		-0,36 %	47324	4,68	2,94
Cal 4392	235311	253489	-7,17 %	232638	5,37	3,64
	287004		13,22 %	284331	5,45	3,64
	238152		-6,05 %	235479	5,37	3,64
Analyytti X-näyte	10378	12289	-15,55 %	7705	3,89	
	13462		9,54 %	10789	4,03	
	13028		6,01 %	10355	4,02	
Analyytti	2,0158					
X:n pitoisuus logaritmina	2,1767					
Keskiarvo	2,1165					
10^(keskiarvo)	130,8					



Fab3-levy Mab1-leima	Määrittysten counts-määrät	Määrittysten keskianvot	Ero keskianvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts-määrien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	4350 6195 5330	5292	-17,80 % 17,07 % 0,72 %			
Cal 17,8	5354 5693 5797	5615	-4,64 % 1,40 % 3,25 %	62 401 505	1,79 2,60 2,70	1,25 1,25 1,25
Cal 39,6	7103 7681 7972	7585	-6,36 % 1,26 % 5,10 %	1811 2389 2680	3,26 3,38 3,43	1,60 1,60 1,60
Cal 166	14681 11646 18592	14973	-1,95 % -22,22 % 24,17 %	9389 6354 13300	3,97 3,80 4,12	2,22 2,22 2,22
Cal 870	52418 55028 56878	54775	-4,30 % 0,46 % 3,84 %	47126 49736 51586	4,67 4,70 4,71	2,94 2,94 2,94
Cal 4392	253530 244490 197553	231858	9,35 % 5,45 % -14,80 %	248238 239198 192261	5,39 5,38 5,28	3,64 3,64 3,64
Analyytti X-näyte	12171 14923 11741	12945	-5,98 % 15,28 % -9,30 %	6879 9631 6449	3,84 3,98 3,81	
Analyytti X:n pitoisuus logaritmina	2,2549 2,3800 2,2309					
Keskianvo	2,2886					
10^(keskianvo)	194,4					



Fab1-levy Mab1-leima	Määritysten counts-määrät	Määritysten keskiarvot	Ero keskiarvosta	Taustattomat counts-määrät	Taustattomien counts-määrien logaritmi	Kalibraattorien pitoisuuksien logaritmi
Cal 0	950	863	10,08 %			
	785		-9,04 %			
	854		-1,04 %			
Cal 17,8	2197	2057	6,82 %	1334	3,13	1,25
	2026		-1,49 %	1163	3,07	1,25
	1947		-5,33 %	1084	3,04	1,25
Cal 39,6	2756	2599	6,05 %	1893	3,28	1,60
	2823		8,63 %	1960	3,29	1,60
	2217		-14,69 %	1354	3,13	1,60
Cal 166	7490	7628	-1,80 %	6627	3,82	2,22
	7765		1,80 %	6902	3,84	2,22
	7363		-3,47 %	6500	3,81	2,22
Cal 870	26770	35088	-23,71 %	25907	4,41	2,94
	40453		15,29 %	39590	4,60	2,94
	38041		8,42 %	37178	4,57	2,94
Cal 4392	185576	214931	-13,66 %	184713	5,27	3,64
	210314		-2,15 %	209451	5,32	3,64
	248902		15,81 %	248039	5,39	3,64
Analyytti X-näyte	148756 3243 4812	4028	3593,51 % -19,48 % 19,48 %	147893 2380 3949	5,17 3,38 3,60	
Analyytti Xn pitoisuus logaritmina	3,5560 1,6809 1,9108					
Keskiarvo	1,7958					
10 ⁿ (keskiarvo)	62,5					

