

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2021

Kari Kristian

TERBIUM-KELAATIN KÄYTTÖÖNOTTO JA OPTIMOINTI LEIMAUSPROSESSISSA

Kristian Kari

TERBIUM-KELAATIN KÄYTTÖÖNOTTO JA OPTIMOINTI LEIMAUSPROSESSISSA

Opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön uusi terbium-kelaattierä ja optimoida sen käyttöä tuotannon leimausprosessia varten. Käyttöönotto ja optimointi suoritettiin Labmaster Oy:n laadunhallintajärjestelmien sekä lääkinällisiä instrumentteja sekä reagensseja koskevien säädösten mukaisesti. Aiemmin yrityksessä oli käytetty vain yhtä, toisen valmistajan valmistamaa terbium-kelaattia. Työ toteutettiin Labmaster Oy:n Kaarinassa sijaitsevilla laboratoriotiloissa.

Uudella terbium-kelaattierällä tehtiin kaksi leimausta. Leimatut vasta-aineet karakterisoitiin määrittämällä leima-aste levynlukijalla ja vasta-aineen pitoisuus spektrofotometrisesti biofotometrillä. Käytännön kokeellinen toiminnan osoittaminen suoritettiin elektrokemiluminesenssista syntyvää valoa mittaavalla Labmaster LUCIA™ Analyzer -vierianalytiikkalaitteella. Laadunvalvontana toimivat karakterisointi sekä elektrokemiluminesenssin mittaukset. Niillä varmistettiin uuden kelaatin oikeanlaisesta toiminnasta Labmaster Oy:n leimausprosessissa. Tulosten oikeellisuus varmistettiin käyttämällä yrityksen sisäisen ohjeistuksen mukaisia menetelmiä sekä suorittamalla mittaukset rinnakkaisilla näytteillä.

Karakterisoinnin ja laadunvalvonnan tuloksena uusi terbium-kelaattierä voitiin hyväksyä käyttöön yrityksen leimausprosessissa. Sen havaittiin antavan samankaltaisia tuloksia aikaisemmin käytössä olleen kelaattierän kanssa. Uusi terbium-kelaattierä tulee jatkossa mahdollistamaan Labmaster Oy:n tuotannon laajentamista ja Labmaster LUCIA™ Analyzer -vierianalytiikkalaitteella suoritettavien testien kehittämistä.

ASIASANAT:

terbium, vieritestaus, luminesenssi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Materials Engineering

2021 | 28 pages, 0 in appendices

Kristian Kari

INTRODUCTION AND OPTIMIZATION OF TERBIUM CHELATE IN LABELING PROCESS

The aim of the thesis was to introduce a new batch of terbium chelate and optimize its use for the production's labeling process. The introduction and optimization were performed in accordance with Labmaster Oy's quality management systems and regulations for medical instruments and reagents. Previously, the company had used only one terbium chelate from another manufacturer. The practical work of the thesis was carried out in Labmaster Oy's laboratory premises in Kaarina.

Two labels were made with the new batch of terbium chelate. The labeled antibodies were characterized by determining the labeling degree with a plate reader and the antibody concentration spectrophotometrically with a biophotometer. A practical experimental demonstration of performance was performed with a Labmaster LUCIA™ Analyzer point-of-care device measuring light from electrochemiluminescence. Characterization and electrochemiluminescence measurements served as quality control. They ensured the correct operation of the new chelate in Labmaster Oy's labeling process. The accuracy of the results was confirmed by using methods in accordance with the company's internal guidelines and by performing measurements on parallel samples.

As a result of the characterization and the quality control, a new batch of terbium chelate could be approved for use in the company's labeling process. It was found to give similar results to a previously used chelate batch. In the future the new batch of terbium chelate will enable the expansion of Labmaster Oy's production and the development of tests for the Labmaster LUCIA™ Analyzer.

KEYWORDS:

terbium, point-of-care, luminescence

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 LABMASTER OY	8
2.1 Labmaster LUCIA™ Analyzer	8
3 TEORIA	10
3.1 Laatujärjestelmät	10
3.2 Vierianalytiikka	11
3.3 Lantanidikelaatit	11
3.4 DELFIA® -teknologia	13
3.5 Elektrokemiluminesenssi	14
3.6 Kromatografia	15
4 LEIMAUSPROSESSI	16
4.1 Koeleimaus	17
4.1.1 Kelaattiiliuoksen valmistus	17
4.1.2 Leimareaktio	18
4.1.3 Karakterisointi	19
4.1.4 ECL-mittaus	19
4.1.5 Tulokset	19
4.2 Varsinainen leimaus	20
4.2.1 Leimareaktio	20
4.2.2 Karakterisointi	22
4.2.3 ECL-mittaus	23
4.2.4 Tulokset	23
5 POHDINTA JA YHTEENVETO	26
LÄHTEET	27

KAAVAT

Kaava 1. DTPA-ITC-Tb-kelaatin ylimäärä koeleimauksessa.	18
Kaava 2. DTPA-ITC-Tb-kelaatin ylimäärä varsinaisessa leimauksessa.	20

KUVAT

Kuva 1. LUCIA™ Analyzer ja kasetteja.	9
Kuva 2. Esimerkkejä lantanidikelaateista. (Wang ym. 2005, 5.)	12
Kuva 3. Europium-kelaatin emissiospektri. (CD-Bioparticles. (Mukaillen))	12
Kuva 4. Aikaerotteinen fluorometria. (BMG Labtech. (Mukaillen))	14
Kuva 5. FPLC prosessikaavio. (News-Medical.Net 2019. (Mukaillen))	15
Kuva 6. Victor X4 -levynlukija.	18
Kuva 7. Työssä käytetty kromatografialaitteisto, kolonni ja näytelooppi.	21
Kuva 8. Työssä käytetty fraktionkerääjä.	22
Kuva 9. Varsinaisen leimauksen puhdistuskromatogrammi.	23
Kuva 10. Puhdistuskromatogrammin ensimmäinen piikki.	24
Kuva 11. Puhdistuskromatogrammin toinen piikki.	24

KUVIOT

Kuvio 1. Leimausprosessin prosessikaavio.	16
---	----

TAULUKOT

Taulukko 1. Kelaattilaimennosten signaalit	17
Taulukko 2. Koeleimauksen karakterisoinnin tulokset.	19
Taulukko 3. Koeleimausten LUCIA™-mittaustulokset.	20
Taulukko 4. Varsinaisen leimauksen karakterisoinnin tulokset.	24
Taulukko 5. Varsinaisen leimauksen LUCIA™ ECL-mittausten tulokset.	25

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

CRP	C-reaktiivinen proteiini
CV %	Variaatiokerroin, keskihajonnan ja keskiarvon suhdeluku
DTPA	Dietyleenitriamiinipentaetikkahappo
DELFI [®]	Lantanidikelaatteihin ja aikaerotteiseen fluorometriaan perustuva määrittäminen menetelmä (Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay)
ECL	Elektrokemiluminesenssi
FPLC	Nopean proteiinin kromatografia (fast protein liquid chromatography)
IgG	Immunoglobuliini G
ISO	International Organization for Standardization
ITC	Isotiosyanaatti
KA	Keskiarvo
POC	Point-of-care tai vierianalytiikka
μs	Mikrosekunti, 10 ⁻⁶ sekuntia
Tb	Terbium
UP	Ultrapuhdas

1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä suoritettiin uuden DTPA-ITC-Tb-kelaattierän (Dietyleenitriamiinipenta-etikkahappo-isotiosyanaatti-terbium) käyttöönotto ja optimointi leimausprosessissa. Kelaattierä karakterisoitiin ja sille suoritettiin kokeellinen toiminnan ja soveltuvuuden tarkastus Labmaster Oy:n leimausprosessiin. Kelaattierälle suoritettiin kaksi leimausta, joista ensimmäisellä varmistettiin kelaattierän toiminta ja toinen valmistettiin Labmaster Oy:n tuotannon ohjeiden mukaisesti jatkokäyttöä varten.

Opinnäytetyön käytännön työvaiheet toteutettiin Labmaster Oy:n Kaarinassa sijaitseissa laboratoriotiloissa noudattaen ISO 13485:2016 ja ISO 9001:2015-standardien edellyttämiä toimintatapoja. Yhtiössä on aiemmin käytetty vain yhtä kelaattierää, jonka väheneminen on johtanut uuden kelaattierän tarpeeseen toiminnan jatkumisen takaamiseksi. Eri valmistajalta peräisin olevan kelaattierän toiminta Labmaster Oy:n leimausprosessissa tarkastettiin. Sen soveltuvuus testattiin vertaamalla uutta erää aiemmin käytössä olleeseen ja toimivaksi todettuun kelaattierään. Leimattua kelaattierää tullaan hyödyntämään Labmaster Oy:n LUCIA™ Analyzer -diagnostiikkatyökalun kehittämisessä ja tuotannon laajentamisessa.

Opinnäytetyön alussa esitellään kohdeyritys Labmaster Oy sekä yrityksen diagnostiikkatyökalu Labmaster LUCIA™ Analyzer. Teoriaosuudessa käsitellään yrityksen laatujärjestelmiä, vierianalytiikkaa, lantanidikelaatteja ja niiden käyttöä DELFIA®-määrityksessä, elektrokemiluminesenssia sekä kromatografiaa. Teorian jälkeen kuvataan opinnäytetyön käytännön työvaiheet, jotka ovat koeleimaus sekä varsinainen leimaus sekä niistä saadut tulokset. Lopuksi esitetään pohdintaa työnkulusta.

2 LABMASTER OY

Labmaster Oy on Kaarinassa sijaitseva, vuonna 1985 perustettu diagnostiikka-alan yritys. Se keskittyy tuottamaan innovatiivisia point-of-care -diagnostiikkatyökaluja rutiinidiagnostiikan ja tutkimuksen sovelluksiin. Labmaster Oy:n tuotevalikoima sisältää diagnostiikkatyökaluja ihmisille tai eläimille suoritettaviin in vitro-analyysihin.

2.1 Labmaster LUCIA™ Analyzer

Labmaster Oy:n merkittävin tuote on vierianalytiikkalaite Labmaster LUCIA™ Analyzer (Kuva 1). Labmaster LUCIA™ Analyzer on katodiseen elektrokemiluminesenssiin perustuva analyttinen instrumentti, jota käytetään analyttien kvantitatiiviseen tai kvalitatiiviseen määrittämiseen näytteestä. Näytteenä voidaan käyttää puskuriliuoksella laimennettua verta tai verestä erotettuja komponentteja. Esimerkiksi Labmaster LUCIA™ CRP-testillä (C-reaktiivinen proteiini) voidaan määrittää verestä tai seerumi näytteestä CRP-arvo, jonka kohoaminen kertoo mahdollisesta tulehduksesta. LUCIA™-mittauksissa käytetään kertakäyttöisiä kasetteja (Kuva 1). Kasetit on käsitety vasta-aineella, joka määrittää mitattavan analyytin.

Testin tulos perustuu immunokemiallisen kompleksin muodostumiseen vasta-aineiden ja analyytin välillä. Kompleksissa on analyytin tunnistavia vasta-aineita, joilla analyytti sitoutuu LUCIA™-kasetin piisiruun. Luminoforilla leimattu vasta-aine kuivataan membraanikalvolle tai suoraan piisirulle. Näyte annostellaan LUCIA™-kasetin piisirulle, jossa vasta-aine reagoi analyytin kanssa. Sitoutumaton vasta-aine erotetaan automaattisella pesuvaiheella. Leimattu vasta-aine-analyttikompleksi viritetään sähkövirralla. Aiheutuva elektrokemiluminesenssi mitataan mikroprosessorilla, joka laskee analyytin konsentraation. Mittatulos näkyy Labmaster LUCIA™ Analyzerin ruudulla. (Labmaster 2021.)



Kuva 1. Labmaster LUCIA™ Analyzer ja kasetteja.

3 TEORIA

3.1 Laatu järjestelmät

Laatu järjestelmillä tarkoitetaan laadunhallintajärjestelmiä prosessien ja johtamisen laadun osoittamiseksi sekä varmistamiseksi. Laatu järjestelmän voi sertifioida ainoastaan Finaksen akkreditoima, eli päteväksi todettu, sertifiointilaitos. Laatusertifikaatin yritys saa läpäistyään akkreditoidun sertifiointilaitoksen suorittaman auditoinnin, jossa arvioidaan puolueettomasti täyttääkö organisaatio sille asetetut vaatimukset. (Talentree.) Labmaster Oy:llä on ISO 13485:2016 sekä ISO 9001:2015 -standardeille sertifikaatit in vitro -diagnostisten lääkinnällisten laitteiden, reagenssien ja instrumenttien suunnitteluun, kehittämiseen ja valmistukseen. ISO-standardit ovat Kansainvälisen Standardisoimisjärjestön (ISO, International Organization for Standardization) luomia kansainvälisesti tunnustettuja standardeja.

ISO 9001:2015 -standardissa määritellään yleisesti organisaation laadunhallintajärjestelmiä koskevat vaatimukset. Se ja siinä esitetyt vaatimukset ovat yleisiä ja kaikille organisaatioille tarkoitettuja riippumatta niiden koosta, tyypistä tai niiden tuottamista tuotteista ja palveluista. ISO 9001:2015 tarkoituksena on toimia organisaation tai yrityksen todistena osoittaakseen kykynsä tuottaa tuotteita ja palveluita, jotka täyttävät tuotetta tai palvelua koskevat lakien ja viranomaisten vaatimukset sekä asiakkaiden vaatimukset. Lisäksi sen tarkoitus on lisätä asiakastyytyväisyyttä. Siihen pyritään soveltamalla järjestelmää, joka sisältää varmistavia prosesseja järjestelmien parantamiseen sekä viranomaisten ja lakien vaatimusten täyttämiseen. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry 2015.)

ISO 13485:2016 on kansainvälisesti tunnustettu laadunhallintajärjestelmä lääkinnällisille laitteille. Se on tarkoitettu organisaatioille, jotka haluavat osoittaa pystyvänsä tarjoamaan lääkinnällisiä laitteita sekä niihin liittyviä palveluita täyttäen asiakkaiden ja viranomaisten asettamat vaatimukset. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry 2016.) ISO 13485:2016 -sertifikaatin omaava organisaatio osoittaa sitoutumisensa turvallisuuteen ja laatuun sekä sitä usein edellytetään osana lääkinnällisten laitteiden hyväksymisprosessia (DNV).

3.2 Vierianalytiikka

Vierianalytiikka eli point-of-care tai POC on laboratoriotasoista diagnostista analytiikkaa, joka suoritetaan kliinisen laboratorion ulkopuolella vierimittareilla. Vieritesti voidaan suorittaa potilaan vierellä paikasta riippumatta, jolloin yksittäinen testitulos saadaan nopeasti. Tämä nopeuttaa hoitopäätöksiä yksittäisten diagnostisten testien kautta sekä mahdollistaa tiettyjen parametrien pitkäaikaisen seurannan myös hoitoyksikön ulkopuolella. (Roche 2020.)

Sisko Vuorisen (2009, 9) mukaan vieritutkimuksia tarvitaan, kun laboratoriopalvelut eivät ole saatavissa ja päätös hoidosta on tehtävä nopeasti. Kliininen käyttöarvo saavutetaan hyvin valitulla ja tarpeeseen sopivalla vieritestillä, jonka laatu on riittäväksi osoitettu ja perinteiseen tutkimukseen verrattuna hyöty potilaalle on riittävä. Vieritutkimusten valitsemiseen vaikuttavia tärkeimpiä tekijöitä ovat laadulliset, tekniset sekä taloudelliset tekijät. Valintaan vaikuttavat siten saatavilla olevien testien taso, käyttöolosuhteet, testien laatu, hinta sekä laitteen ikä. (Vuorinen 2009, 9.)

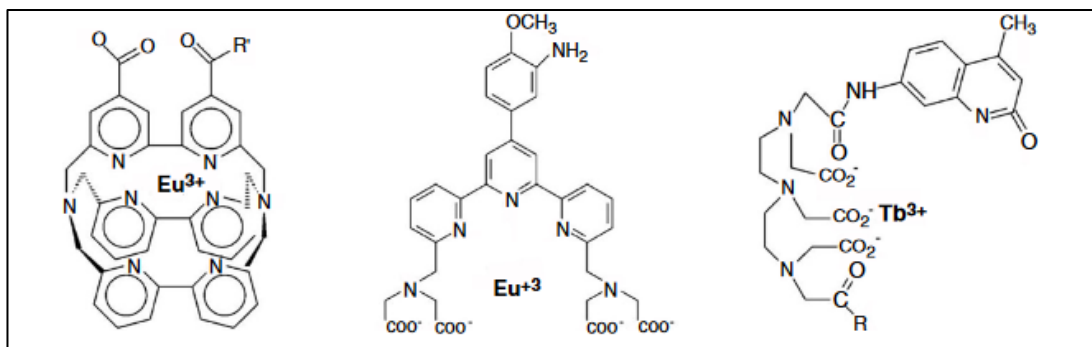
Vierianalytiikan on laadultaan täytettävä tarpeeksi suurella tarkkuudella samat vaatimukset kuin kliinisen laboratorion analytiikkalaitteiston tulee täyttää. Tärkeää on tulosten oikeellisuus, valmistuminen vaaditussa ajassa ja mahdollisuus yhdistää oikea mittauksen suorittaja ja potilas tulokseen. Tarkoituksena on luotettavien tuloksien saaminen tarkoituksenmukaisesti toimivilla laitteilla kliinisen päätöksenteon hyödynnettäväksi. (Roche 2020.)

3.3 Lantanidikelaatit

Lantanideja ovat jaksollisen järjestelmän f-lohko eli alkuaineet järjestysnumeroiltaan 58–71. Lantanideille tyypillisiä ominaisuuksia ovat elektronirakenteesta johtuvat luminesenssi sekä magneettiset ominaisuudet. Niiden käyttö muun muassa luminoivissa materiaaleissa perustuu niistä muodostettavien yhdisteiden emission väriin sekä voimakkuuteen. Lantanidit ovat pehmeitä ja hopeanvärisiä ja kuuluvat harvinaisiin maametalleihin. (Kirkkala 2020, 13–20.)

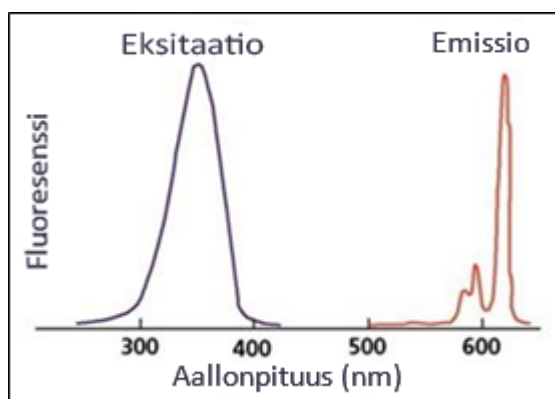
Kelaatti koostuu keskusatomista sekä yhdestä tai useammasta ligandista. Keskusatomi on metalli-ioni ja ligandit keskusatomiin liittyneitä ioneja tai molekyyliä, joilla on yksi tai useampi vapaa elektronipari. Keskusatomin ympärille kovalenttisilla sidoksilla liittyvät ligandit asettuvat sen ympärille muodostaen mahdollisimman pysyvän rakenteen. (Peda.net 2018.)

Lantanidikelaatit (Kuva 2) muodostuvat lantanidista ja yhdestä tai useammasta ligandista. Ne eivät ole itsessään fluoresoivia. Niiden fluoresointi käynnistyy liitettyä ligandia virittämällä. Viritetty ligandi johtaa viritysenergiansa lantanidille. Viritysenergian vastaanottanut lantanidi emittoi valoa ja kyseinen signaali voidaan mitata. Jokaisella lantanidikelaatilla on oma viritystaajuutensa, joka eroaa selkeästi emissiotaajuudesta. (Hagan & Zuchner 2011.)



Kuva 2. Esimerkkejä lantanidikelaateista. (Wang ym. 2005, 5.)

Tämä johtuu lantanidikelaateille ominaisesta suuresta Stokesin siirtymästä, jolloin viritys- ja emissiopeikeillä ei ole päällekkäisyyksiä (Kuva 3). (CD-Bioparticles.)



Kuva 3. Europium-kelaatin emissiospektri. (CD-Bioparticles. (Mukaiillen))

Kuvassa 3 olevan europium-kelaatin emissiospektristä käy ilmi, että europium-kelaatti virittyy parhaiten noin 350 nm alueella ja emittoituu parhaiten yli 600 nm alueella. Viritysvalolla ja emissiovalolla ei ole päällekkäisyyksiä.

3.4 DELFIA® -teknologia

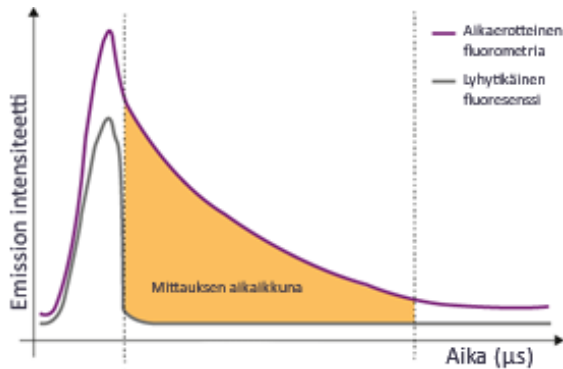
DELFIA® (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) on PerkinElmer Wallac Oy:n kehittämä tekniikka, jolla mitataan intensiteettiä aikaerotteisen fluorometrian ja lantanidikelaattien avulla. Teknologian etuja ovat mm. laaja näytesyhteensopivuus, signaalin pitkä vakaus, suuri mitta-alue sekä skaalautuvuus. (PerkinElmer.)

DELFIA® -määritykset on luotu havaitsemaan yhdiste tai biomolekyyli käyttäen lantanidikelaattiin liitettyjä reagentteja erottamaan sitoutumaton reagentti huuhtomalla ylimääräiset aineet pesuvaiheiden avulla. (PerkinElmer.)

Teknologia perustuu lantanidikelaattien fluoresenssiin. DELFIA® -teknologiassa käytetään eniten europiumia, samariumia ja terbiumia. Näillä lantanidikelaateilla merkittyjen vasta-aineiden emission hiipumisaika on huomattavasti pidempi kuin perinteisten fluoroforien. Tämä mahdollistaa aikaan perustuvan erottelun tehokkaan hyödyntämisen taustasäteilyn vaikutuksen vähentämiseksi. Suuri Stokesin siirtymä ja kapea emissiopeikki vaikuttavat kasvavaan signaali-kohinasuhteeseen. Lantanidikelaatti hajoitetaan lisäämällä mittaliuosta, jolloin muodostuu uusi, erittäin fluoresoiva kelaattirakenne. Tämä nostaa DELFIA® -määrityksen tarkkuutta. (PerkinElmer.)

Lantanidikelaattien virittyminen tapahtuu, kun valo osuu tietyllä aaltopituudella atomin elektronipilveen siirtäen osan elektroneista perusenergiatasosta korkeammalle energiatasolle. Fluoresoivat yhdisteiden elektronit palaavat perusenergiatasolle säteilemällä energiaa. Tämä energian säteily on emissiovalo. Emissiovalo on aina matala energisempi viritysvaloon verrattuna, sillä prosessissa energiaa muuttuu valon lisäksi myös lämmöksi. (PerkinElmer.)

DELFIA®-määrityksessä lyhyt, jokaiselle lantanidille spesifi virityspulssi virittää merkkiaineen. Ennen varsinaista mittausta aikaa kuluu 400 µs, jonka aikana taustafluoresenssi ehtii laantua. Fluoresenssi luetaan 400–800 µs välillä määrityksen aloittamisesta 615 nm alueella. Millisekunnin kohdalla tulee uusi virityspulssi. Sekunnin aikana mittaus tapahtuu 1 000 kertaa ja tulos on näiden mittausten summa. Kyseistä menetelmää kutsutaan aikaerotteiseksi fluorometriaksi (Kuva 4). (PerkinElmer.)



Kuva 4. Aikaerotteinen fluorometria. (BMG Labtech. (Mukaillen))

3.5 Elektrokemiluminesenssi

Luminesenssi on virittyneestä materiaasta emittoituvaa valoa, kun se palaa perustilaansa. Emittoituvaa valoa voi olla näkyvää, ultraviolettia- tai infrapuna-aalloja ja sitä esiintyy jokaisessa materiaalin olomuodossa. Luminesenssi voidaan jaotella keston mukaan fluoresenssiksi ja fosforesenssiksi. Fluoresenssi kestää tyypillisesti alle 10^{-6} sekuntia ja fosforesenssi yli 10^{-6} sekuntia. (Obodovskiy 2019.) Luminesenssi voidaan jaotella myös viritystavan mukaan. Se voidaan saavuttaa valolla, mekaanisella ärsytyksellä, sähkömagneettisella säteilyllä, lämpöenergialla tai kemiallisilla reaktioilla. Näistä jälkimmäistä kutsutaan kemiluminesenssiksi. (Rautiainen 2017, 5.)

Kemiluminesenssissa luminesenssin saa aikaan kemiallisesta reaktiosta johtuva elektronien virittyminen. Siinä virittynyt välituote emittoi valoa hajotessaan lopputuotteeksi. Kemiluminesenssia on kahta erilaista. Elektrokemiallisesta reaktiosta syntyvää kemiluminesenssia kutsutaan elektrokemiluminesenssiksi ja biokemiallisesta reaktiosta syntyvää bioluminesenssiksi. (Rautiainen 2017, 5.) Virittyminen voi tapahtua kemiallisesti kahdella tavalla, jotka ovat luminoforin hajoaminen ja elektroninsiirtoreaktio (Fredriksson 2019, 4).

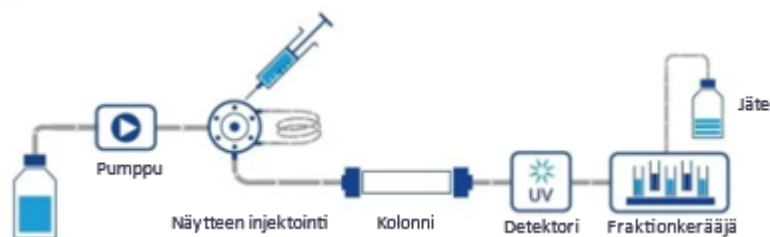
Elektrokemiluminesenssissa kemiallinen viritys tapahtuu elektrolyytisesti tuotettujen yhdisteiden avulla. Elektrodille syötetään jännitettä, joka käynnistää elektroninsiirtoketjun. Tämän johdosta elektrodin läheisyydessä tapahtuu luminesenssia. Elektrokemiluminesenssin etuja on matalan taustasignaalin takia matala herkkyys ja mahdollisuus virittää sama luminofori useaan kertaan. (Fredriksson 2019, 4.)

3.6 Kromatografia

Kromatografia on kemiallisten yhdisteiden eristämiseksi, puhdistamiseksi ja määrittämiseksi kehitetty menetelmä. Sitä voidaan käyttää analyttisenä työkaluna detektorin kanssa selvittämään liuoksen komponentit tai puhdistustyökaluna erottamaan liuoksen komponentit toisistaan. Kromatografiassa on kaksi faasia: liikkuva faasi ja kiinteä faasi. Liikkuvan faasin perusteella kromatografia voidaan jakaa neste-, kaasu ja kiinteäkromatografiaan. Kiinteän faasin mukaan kromatografia voidaan jakaa paperi-, pylväs-, ioni-, ohutkerros-, korkeapaine- ja affiniteetikromatografiaan sekä geelisuodatukseen. (ThermoFisher Scientific 2019.)

Kromatografia on selektiivinen erotusmenetelmä. Sen tarkoituksena on erottaa kaksi tai useampi yhdiste toisistaan. Kromatografia perustuu adsorbenttimateriaalilla täytetyn kolonnin eli pylvään sisällä kulkevien yhdisteiden erilaisiin etenemisnopeuksiin. Kolonni on täytetty kiintoaineella, johon yhdisteet adsorboituvat. Adsorptio tarkoittaa aineen tarttumista toisen aineen pintaan. Adsorboitumisen ollessa voimakasta, yhdisteet kulkeutuvat kolonnin läpi hitaasti. Vastaavasti adsorboitumisen ollessa heikkoa eteneminen on nopeaa. (LUT University.)

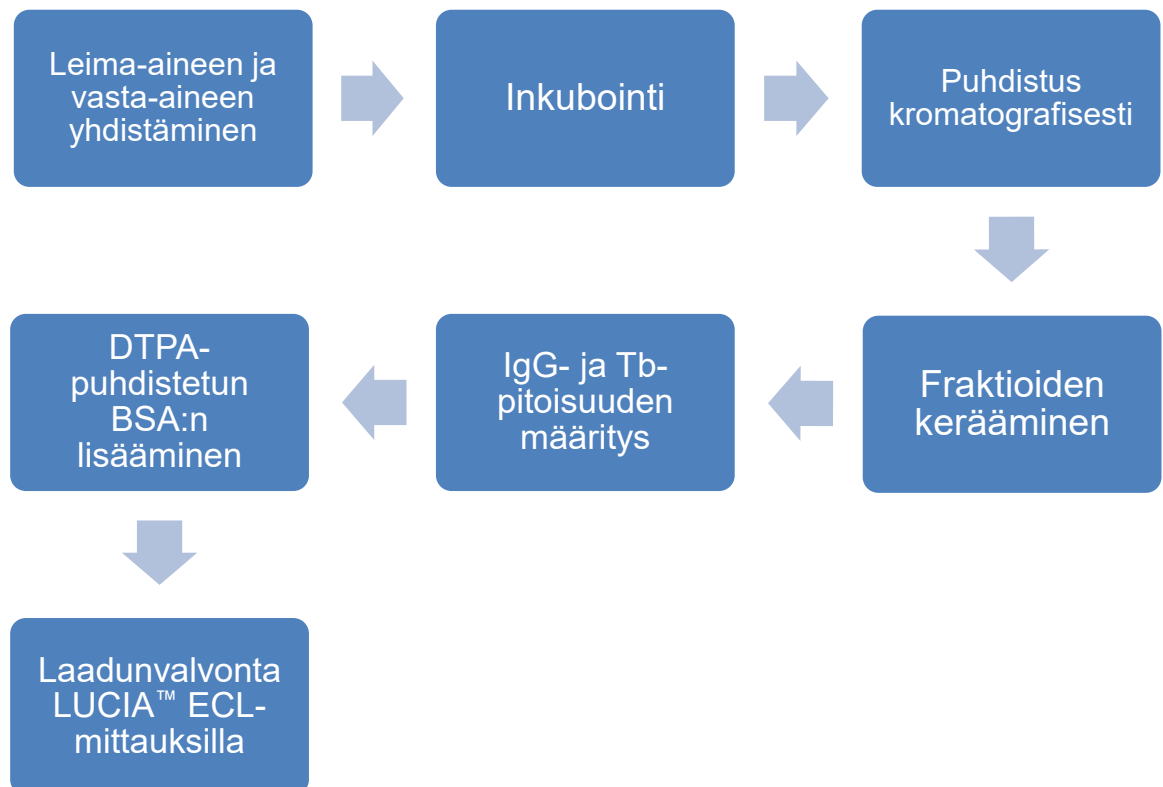
Opinnäytetyössä käytettiin nopean proteiinin nestekromatografiaa (FPLC tai fast protein liquid chromatography). FPLC-tekniikka on tarkoitettu proteiinien ja muiden suurten biomolekyylien puhdistamiseen. FPLC-järjestelmä sisältää tyypillisesti pumpun, UV/VIS-detektorin, sähkönjohtokykymittarin ja fraktionkerääjän (Kuva 5). Näyte syötetään kromatografiin ja sitä pumpataan eluutioliuoksen kanssa valitun kolonnin läpi UV/VIS-detektorille, jonka jälkeen fraktionkerääjä kerää eluaatin talteen. UV/VIS-detektorin piirtämän kromatogrammin mukaan voidaan valita oikeat fraktiot. (Bio-Rad Laboratories.)



Kuva 5. FPLC prosessikaavio. (News-Medical.Net 2019. (Mukaiillen))

4 LEIMAUSPROSESSI

Työn tavoitteena oli uuden valmistajan DTPA-ITC-Tb-kelaattierän (Dietyleenitriamiini-pentaetikkahappo-isotiosyanaatti-terbium) toiminnan ja soveltuvuuden määrittäminen Labmaster Oy:n leimausprosessiin (Kuvio 1). Työn suoritus suunniteltiin tapahtuvaksi kahdessa vaiheessa, jotka olivat koeleimaus ja varsinainen leimaus. Koeleimaus tehtiin nopeammilla, mutta vähemmän tarkoilla puhdistusmenetelmillä kuin varsinainen leimaus. Hyväksyntäkriteerit uudelle DTPA-ITC-Tb-kelaattierälle olivat kelaatilla tehtyjen vasta-ainekonjugaattien toiminta LUCIA™ elektrokemiluminesenssi-systeemissä (ECL-systeemissä) ja anti CRP-Tb vasta-aineelle asetetun hyväksyntärajan täytyminen. Leima-asteen hyväksyttävät rajat ovat aiemmin Labmaster Oy:ssa määritetyt leima-asteet 7–12 Tb/IgG. Leima-asteella tarkoitetaan terbiumin ja immunoglobuliini G:n (IgG) suhdetta toisiinsa.



Kuvio 1. Leimausprosessin prosessikaavio.

4.1 Koeleimaus

Koeleimauksessa tavoitteena oli leimatun vasta-aineen karakterisointi ja uuden kelaatin toimivuuden kokeellinen toimivuuden varmistaminen Labmasterin LUCIA™ CRP-mittauksissa.

4.1.1 Kelaattiliuoksen valmistus

Kelaattiliuos valmistettiin liuottamalla noin 1,5 mg DTPA-ITC-Tb-kelaattia 500 µl ultra-puhdasta vettä. Kelaattiliuoksen pitoisuus määritettiin PerkinElmerin Victor X4 -levynlukijalla (Kuva 6 Kuva 1) käyttäen aikaerotteista fluorometriaa. Näytteet valmistettiin tekemällä kuoppalevyille 10^{-4} – 10^{-7} laimennossarja DELFIA® Enhancement Solution -kehitysluokseen. Laimennoksia inkuboitiin ravistelussa huoneenlämmössä 30 min. Laimennuksiin lisättiin levydispenserillä 50 µl Tb-kehitysluosta. Kuoppalevyä inkuboitiin viisi minuuttia ravistelussa ja 5 minuuttia ilman ravistelua. Levy mitattiin Victor X4 -levynlukijalla, josta pitoisuus saatiin vertaamalla 1 nM Tb-standardin antamaan signaaliin. Saadut tulokset ovat esitettynä alla olevassa taulukossa (Taulukko 1). Suhteuttamalla laimennokista saatu signaali 1 nM Tb-standardin antamaan signaaliin, saadaan kelaattiliuoksen pitoisuudeksi 4,05 mM.

Taulukko 1. Kelaattilaimennosten signaalit

Laimennosten signaalin KA	1,72E+12
1nM Tb standardin KA	4,24E+05



Kuva 6. Victor X4 -levynlukija.

4.1.2 Leimareaktio

Leimareaktiota varten valmistettiin Na-karbonaattipuskuria 10,45 pH:lla. Reaktioon pipetoitiin vasta-ainetta ja Na-karbonaattipuskuria, sekä suhteessa vasta-aineen määrään 44-kertainen molekylaarinen ylimäärä DTPA-ITC-Tb-kelaattia (

Kaava 1). 44-kertainen kelaattiylimäärä perustuu aiemmin Labmasterilla käytettyihin laskennallisiin ylimääriin. Reaktioseosta inkuboitiin +4 °C:ssa yön yli.

Kaava 1. DTPA-ITC-Tb-kelaatin ylimäärä koeleimauksessa.

$$\frac{\text{Ylimäärä} * \frac{\text{Leimattava vasta ainemäärä}}{\text{Vasta ainemolekyylin molekyylimassa}}}{\text{Kelaatin pitoisuus}} \rightarrow \frac{44 * \frac{0,5 \text{ mg}}{150000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}}{4048 \mu\text{M}} \rightarrow 36,2 \mu\text{l}$$

Reaktioseosta puhdistettiin käyttämällä Cytivan NAP-5 ja NAP-10-geelisuodatuspylväitä. Reaktioseosta puhdistettiin ensin NAP-5-pylväällä, jonka eluaatti suodatettiin NAP-10-pylväällä. NAP-10-pylvään eluaatista kerättiin noin 70 %, jolloin välttyttiin keräämästä vapaata kelaattia.

4.1.3 Karakterisointi

Geelisuodatusten jälkeen eluaatti mitattiin spektrofotometrisesti biofotometrillä ja sen terbiumpitoisuuden keskiarvoksi saatiin 0,32 mg/ml. Leima-aste määritettiin Victor X4 -luevynlukijalla. Koeleimauksen karakterisoinnin tuloksien laskemiseen käytettiin Labmaster Oy:n laskupohjaa. Koeleimauksen karakterisoinnin tulokset löytyvät taulukosta 2 (Taulukko 2. Koeleimauksen karakterisoinnin tulokset.).

4.1.4 ECL-mittaus

Elektrokemiluminesenssimittaukset tehtiin Labmaster Oy:n Labmaster LUCIA™ Analyzer -laitteella. ECL-mittausta varten valmistettiin laimennettua vasta-ainepoolia, jota käytettiin LUCIA™ Analyzer:ssä toimivien membraanien valmisteluun. Membraanit valmistellaan annostelemalla vasta-ainetta membraanille. Valmisteltuja membraaneja käytettiin CRP-mittauksien tekemiseen käytetyissä kaseteissa LUCIA™-järjestelmällä. Uusien membraanien lisäksi mitattiin myös aikaisemmin testattua kelaattia, jonka leima-aste oli 12. Mittauksia tehtiin molemmilla kelaateilla, jokaisella näytteen pitoisuudella 3 rinnakaista. Koeleimauksen LUCIA™ ECL-mittaustulokset ovat esitettyinä taulukossa 3 (Taulukko 3. Koeleimausten LUCIA™-mittaustulokset.)

4.1.5 Tulokset

Koeleimauksen karakterisoinnin (Taulukko 2) sekä LUCIA™-mittaustulokset (Taulukko 3) ovat esitettyinä alla olevissa taulukoissa. Koeleimauksen LUCIA™-mittaustulokset olivat signaalitasoiltaan sekä signaali/tausta-suhteeltaan yhdenmukaiset vertailukohteen kanssa.

Karakterisoinnin tuloksena saatiin uudelle kelaatille terbium-pitoisuudeksi 16,3 µM, pitoisuudeksi 0,228 mg/ml, leima-asteeksi 10,7 Tb/IgG ja saannoksi 27 %.

Taulukko 2. Koeleimauksen karakterisoinnin tulokset.

Tb-pitoisuus (µM)	Korjattu pitoisuus (mg/ml)	Leima-aste (Tb/IgG)	Saanto

16,3	0,228	10,7	27 %
------	-------	------	------

Taulukko 3. Koeleimausten LUCIA™-mittaustulokset.

Membraani	Näyte mg/L	Emission KA	S/N
Uusi	0	879	-
Uusi	50	59214	67
Vertailu	0	809	-
Vertailu	50	57068	71

4.2 Varsinainen leimaus

Varsinaisen leimauksen tavoitteena oli valmistaa leimattua vasta-ainetta mahdollisimman suurella saannolla Labmasterin tuotannon käyttöön. Leimaus toteutettiin Labmaster Oy:n tuotanto-ohjeiden mukaisesti kromatografisesti. Leimauksessa käytettiin kohdassa 4.1.1 valmistettua kelaattiliuosta.

4.2.1 Leimareaktio

Leimareaktiossa tarkoituksena on yhdistää vasta-aine käytettyyn kelaattiin siten, että saanto sekä seoksen laatu pysyvät korkeina. Leimareaktiota varten valmistettiin Na-karbonaattipuskuria, jolle säädettiin 10,45 pH reaktion optimaalista toimintaa varten. Reaktioon pipetoitiin vasta-ainetta ja Na-karbonaattipuskuria, sekä suhteessa käytetyn vasta-aineen määrään 44-kertainen molekylaarinen ylimäärä Tb-DTPA-ITC-kelaattia (

Kaava 1). Reaktiota inkuboitiin +4 °C:ssa yön yli.

Kaava 2. DTPA-ITC-Tb-kelaatin ylimäärä varsinaisessa leimauksessa.

$$\frac{\text{Ylimäärä} * \frac{\text{Leimattava vasta ainemäärä}}{\text{Vasta ainemolekyylin molekyylimassa}}}{\text{Kelaatin pitoisuus}} \rightarrow \frac{44 * \frac{1 \text{ mg}}{150000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}}{4048 \mu\text{M}} \rightarrow 72,5 \mu\text{l}$$

Kromatografialaitteistoa (

Kuva 7

Kuva 7. Työssä käytetty kromatografialaitteisto, kolonni ja näytelooppi.) käytettiin 1 ml näyteloopilla. Letkujen sisältö vaihdettiin 20 % EtOH:sta ultrapuhtaaseen veteen. Laitteistoon kiinnitettiin pylväs, jota tasapainotettiin yön yli TSA:lla. Pylvään taustasignaali tarkistettiin Victor X4 -levynlukijalla. Pylvään signaalin keskiarvo oli 780 ja taustasignaali 562. Signaalit olivat Labmaster Oy:n tuotannon ohjeissa määritettyjen hyväksymisrajojen sisällä.



Kuva 7. Työssä käytetty kromatografialaitteisto, kolonni ja näytelooppi.

Leimareaktio suodatettiin 0,22 μm suodattimella. Injektoitiin suodatettu reaktioliuos kromatografialaitteiston looppiin oikean ohjelman ollessa käynnissä. Vasta-ainetta sisältävät fraktiot otettiin talteen fraktionkerääjällä (Kuva 8) kromatografian absorbanssikäyrän (Kuva 9) mukaan. Absorbanssikäyrään muodostui piikkejä leimatun IgG:n ja vasta-aineettoman Tb-kelaatin kulkiessa UV/VIS-detektorin ohitse. Piikkien perusteella valittiin käyttöön sopivat fraktiot. Fraktioiden yhteenlasketuksi tilavuudeksi mitattiin 2,2 ml.



Kuva 8. Työssä käytetty fraktionkerääjä.

4.2.2 Karakterisointi

Karakterisointi suoritetaan leimatulle vasta-aineelle sen käyttökelpoisuuden sekä laadun tarkastamiseksi. Leimattua vasta-aine poolia laimennettiin 1/100 0,5 M HCL:llä. Siitä tehtiin 1/10 jatkolaimennoksia kehitysliuokseen (DELFLIA® Enhancement solution) 10^{-6} asti. 10^{-3} – 10^{-6} -laimennoksia pipetoitiin kuoppalevyyn kolmena rinnakkaisena. Kehitysliuosta pipetoitiin taustanäytteeksi kolme rinnakkaista. Levyä inkuboitiin ravistelussa, jonka jälkeen kaivoihin lisättiin Tb-kehitysliuosta levydispenserillä. Levyä inkuboitiin ravistelussa sekä pöydällä. Kolmeen kaivoon pipetoitiin 1 nM Tb-standardia. Näytteiden Tb-signaali mitattiin levynlukija Victor X4:llä terbium-kelaatille käytetylle ohjelmalla.

Vasta-aineen pitoisuus mitattiin neljällä rinnakkaisella mittauksella biofotometrillä. Tulos hyväksyttiin CV %:n ollessa alle 10 %. Seos säilöttiin lisäämällä siihen DTPA puhdistettua BSA:ta.

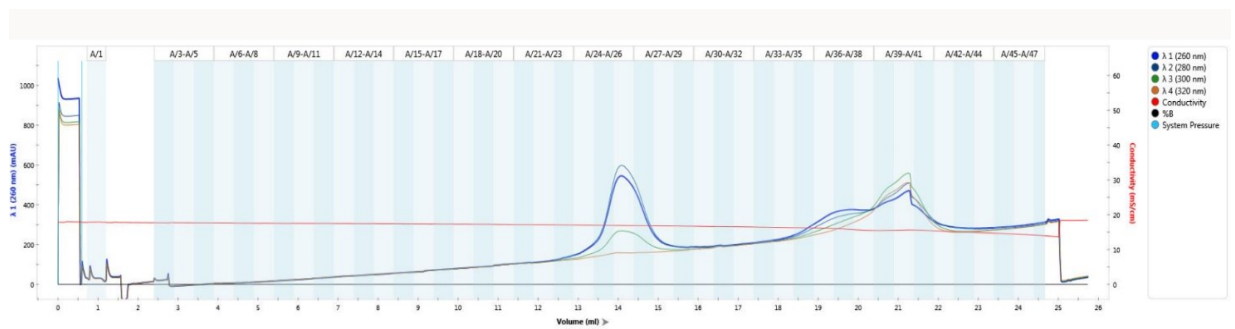
4.2.3 ECL-mittaus

Elektrokemiluminesenssimittaukset tehtiin Labmaster Oy:n Labmaster LUCIA™ Analyzer -laitteella. ECL-mittausta varten valmistettiin laimennettua vasta-ainepoolia, jota käytettiin LUCIA™ Analyzer:ssä toimivien membraanien valmisteluun. Membraanit valmistellaan annostelemalla vasta-ainetta membraanille. Vasta-aineella päällystettyjä membraaneja käytettiin CRP-mittauksissa käytettävien kasettien kokoamiseen. Uuden kelaatin vertailukelaattina käytettiin aikaisemmin toimivaksi todettua, leima-asteeltaan 12 Tb/IgG kelaattia. Mittauksia tehtiin molemmilla kelaateilla, jokaisella näytteen pitoisuudella 3 rinnakkaista. Varsinaisen leimauksen ECL-mittauksien tulokset löytyvät taulukosta 5 (Taulukko 5. Varsinaisen leimauksen LUCIA™ ECL-mittausten tulokset.)

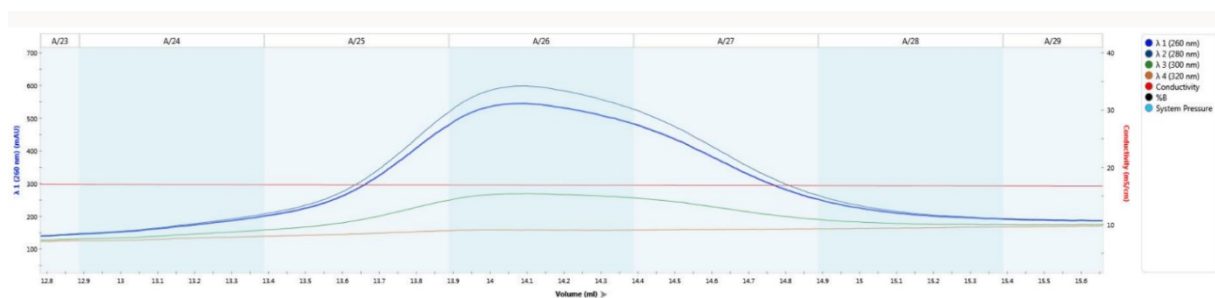
4.2.4 Tulokset

Varsinaisen leimauksen kromatogrammit (Kuva 9, Kuva 10, Kuva 11), karakterisoinnin tulokset (Taulukko 4) sekä LUCIA™ -mittauksien tulokset (Taulukko 5) ovat esitettynä alla olevissa kuvissa ja taulukoissa.

Kromatogrammeissa näkyy A/24–A/26 kohdalla ensimmäinen piikki, joka on leimattua IgG:tä ja A/39–A/40 kohdalla toinen piikki, joka on vapaaksi jäänyttä Tb-kelaattia. Leimattu IgG painaa enemmän, kuin Tb-kelaatti ilman vasta-ainetta, joten se kulkeutuu pylvään läpi nopeammin ja siten havaitaan UV/VIS-detektorilla ensin muodostaen ensimmäisen piikin.

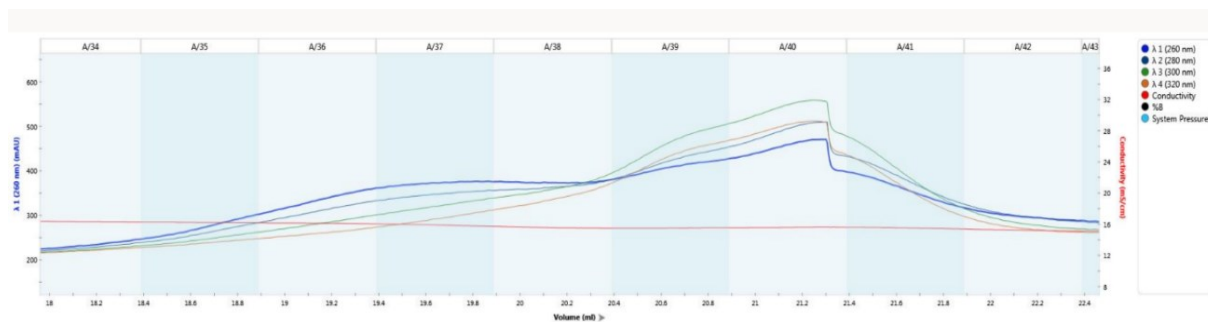


Kuva 9. Varsinaisen leimauksen puhdistuskromatogrammi.



Kuva 10. Puhdistuskromatogrammin ensimmäinen piikki.

Kuvassa 10 on suurennettuna kuvassa 9 näkyvä ensimmäinen piikki. Kromatogrammissa on leimatun IgG:n havaitsemisesta UV/VIS-detektorin muodostama kromatogrammi.



Kuva 11. Puhdistuskromatogrammin toinen piikki.

Kuvassa 11 on suurennettuna kuvassa 9 näkyvä toinen piikki. Kromatogrammissa on vapaaksi jääneen Tb-kelaatin havaitsemisesta UV/VIS-detektorin muodostama kromatogrammi.

Taulukko 4:n tulokset on laskettu Labmasterin laskupohjalla. Karakterisoinnin tuloksena saatiin uudelle kelaatille liuoksen kelaattipitoisuudeksi 0,33 mg/ml, terbium-pitoisuudeksi 15,0 μM , leima-asteeksi 7 Tb/IgG ja saannoksi 72,6 %. Saanto-%:lla tarkoitetaan prosenttuaalista määrää kelaattista, joka on säilynyt prosessin läpi.

Taulukko 4. Varsinaisen leimauksen karakterisoinnin tulokset.

Tb-pitoisuus (μM)	Pitoisuus (mg/ml)	Leima-aste (Tb/IgG)	Saanto-%
15,0	0,33	7	72,6

Taulukko 5:ssä on esitetty kahden eri leiman emissioiden keskiarvot, signaali/tausta-suhde ja ero signaali/tausta-suhteessa verrattaessa uutta ja vertailu-leimaa. Nollanäyt-teiden emissioiden keskiarvo on taustan suuruus.

Taulukko 5. Varsinaisen leimauksen LUCIA™ ECL-mittausten tulokset.

Näyte mg/L	Leima	Emission keskiarvo	S/N	Ero S/N %
0	Uusi	353	-	-
0	Vertailu	887	-	-
5	Uusi	3138	8,9	48,7
5	Vertailu	5301	6,0	-
200	Uusi	194598	551	106,5
200	Vertailu	236744	267	-

Taulukon 5 emissioiden keskiarvo kertoo Labmaster LUCIA™ Analyzer:lla tehtyjen mit-tauksien tuloksien keskiarvon. Uutta ja vertailu leimaa on vertailtu signaali/tausta-suh-teen perusteella. Uuden ja vertailuleiman välillä 5 mg/L näytteessä ero oli 48,7 % ja 200 mg/L näytteessä 106,5 %. Tämä tarkoittaa uudella leimalla tarkempaa mittaustulosta vanhaan verrattuna.

5 POHDINTA JA YHTEENVETO

Opinnäytetyön tarkoitus oli uuden DTPA-ITC-Tb-kelaattierän käyttöönotto. Ennen opinnäytetyön aloittamista Labmaster Oy:n tuotannossa oli käytetty vain yhtä, toisen valmistajan tuottamaa kelaattierää. Tavoitteena oli tarkastella uuden kelaattierän toimintaa ja soveltuvuutta Labmasterin leimausprosessiin. Tarkastelu suoritettiin toteuttamalla kaksi erillistä leimausta. Leimaukset olivat onnistuneita ja uuden kelaattierän toiminta ja soveltuvuus todettiin Labmaster Oy:n tuotantoon sopivaksi. Opinnäytetyön tulosten seurauksena kelaattierää voidaan tulevaisuudessa käyttää Labmaster Oy:n tuotannossa.

Leimattu kelaatti karakterisoitiin sekä sen toimintaa ja soveltuvuutta tarkoitukseensa testattiin kokeellisesti LUCIA™ ECL-mittauksilla. Todettiin uudella DTPA-ITC-Tb-kelaatilla tehtyjen vasta-ainekonjugaattien toimivan LUCIA™ ECL-systeemissä ja täyttävän anti CRP-Tb vasta-aineelle asetetun leima-asteen hyväksyntärajan. Matalammasta leima-asteesta johtuen uudella kelaatilla tehdyn konjugaattierän signaalitaso (7 Tb/IgG) oli alhaisempi kuin verrokkierän (12 Tb/IgG). Uudella konjugaatilla saatiin kuitenkin korkeampi signaali/tausta-suhde molemmilla kalibraatiopisteillä. Korkeampi signaali/tausta-suhde tarkoittaa korkeampilaatuista ja selkeämpää tulosta.

Ennen leimauksia kelaatti liuotettiin veteen, jonka on havaittu vaikuttavan negatiivisesti kelaatin aktiivisuuteen ajan kuluessa. Jatkossa aktiivisuuden säilyttämisen varmistamiseksi kelaatin liuotus tehdään natriumasetaatilla.

Tuloksissa olevien kromatogrammien käyrä on jatkuvasti nouseva kuten kuvasta 9 havaitaan. Tämä johtuu käytetyn kromatografian ja kolonnin kunnosta ja erityisesti systeemin sisälle päässeistä ilmakuplista. Opinnäytetyön leimauksissa käytettiin tutkimus- ja kehityskäyttöön tarkoitettua kromatografia sekä kolonnia. Jatkossa tämä tullaan eliminimaan tuotannon kromatografian ja parempikuntoisen kolonnin käytöllä. Käyrän nousun vaikutuksen arvioidaan vaikuttavan valmistetun kelaatin laatuun minimaalisesti, jos ollenkaan. Arviointi on suoritettu vertaamalla uudella ja vertailukelaateilla saatuja tuloksia.

LÄHTEET

Bio-Rad Laboratories. Fast Protein Liquid Chromatography Systems. Viitattu 24.11.2021. <https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?ID=MWHBF4CZF>

BMG Labtech. Time-resolved fluorescence. Viitattu 22.09.2021. <https://www.bmg-labtech.com/es/time-resolved-fluorescence/>

CD Bioparticles. Time-resolved Fluorescent Microspheres. Viitattu 22.09.2021. <https://www.cd-bioparticles.com/products/time-resolved-fluorescent-microspheres.html>

DNV. ISO 13485 -laadunhallintajärjestelmä lääkinnällisille laitteille. Viitattu 25.11.2021. <https://www.dnv.fi/services/iso-13485-laadunhallintajarjestelma-laakinnallisille-laitteille--3282>

Fredriksson, L. 2019. Vasta-ainepinnan sitomiskapasiteetin kasvattaminen katodiseen elektrokemiluminesenssiin perustuvassa määrityksessä. Diplomityö. Turun Yliopisto. Biokemian laitos. Viitattu 05.10.2021

Hagan, A.K., Zuchner, T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. Analytical Bioanalytical Chemistry 400, 2847–2864 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5047-7>

Kirkkala, T. 2020. Lantanoidi- ja siirtymämetalleja sisältävät heterometalliset metalliorganiset verkkorakenteet. Pro gradu -työ. Kemian laitos. Epäorgaanisen ja analyttisen kemian osasto. Jyväskylä: Jyväskylän yliopisto. Viitattu 22.09.2021. <https://jyx.jyu.fi/handle/123456789/69999?show=full>

Labmaster Oy. C94 v1 07/2021 LUCIA™ MxA Kit Insert (EN). 2021.

LUT University. Kromatografia. Viitattu 30.09.2021. <https://www.lut.fi/school-of-engineering-science/tutkimusryhmat/kromatografia>

News-Medical.Net. High Quality Purification of Proteins Through Liquid Chromatography. 2019. Viitattu 06.10.2021. <https://www.news-medical.net/news/20190115/High-Quality-Purification-of-Proteins-Through-Liquid-Chromatography.aspx>

Obodovskiy, I. 2019. 12.1 Luminescence. Radiation. Viitattu 30.09.2021 <https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/luminescence>

Peda.net. Siirtymämetallien erityisominaisuuksia. Materiaalit ja teknologia, KE4. 2018. Viitattu 22.09.2021. https://peda.net/sievi/sievin-lukio/oppiaineet2/kemia/kemia41/tkapp/m:file/download/1a580894f13b1d7431be6850f2b61be2b6bb3292/Materiaalit_ja_teknologia_KE4_LUKU4.2.pdf

PerkinElmer. DELFIA Time-Resolved Fluorescence Assays. Viitattu 22.09.2021. <https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/delfia/delfia-trf-assays.html>

Rautiainen, P. 2017. Binäärikomponenttiset elektrodipinnoitteet elektrokemiluminesenssimittauksiin. Diplomityö. Aalto-Yliopisto. Kemian tekniikan koulutusohjelma. Viitattu.29.09.2021. https://aaltoodoc.aalto.fi/bitstream/handle/123456789/28909/master_Rautiainen_Panu_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Roche.Vierianalytiikka-POC. Viitattu 22.09.2021. https://www.roche.fi/fi/diagnostiikka/laboratoriot_terv_ammattilaiset/Vierianalytiikka.html

SFS-EN ISO 9001:2015. 2015. Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.

SFS-EN ISO 13485:2016. 2016. Suomen Standardisointiliitto SFS ry. Viitattu 25.11.2021. <https://sales.sfs.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/1/412802.html.stx>

Talentree. Laatu järjestelmät. Viitattu 25.11.2021. <https://talentree.fi/aihe/laatujaarjestelma/>

Thermo Fisher Scientific. What is Chromatography and How Does it Work? 2019. Viitattu 22.11.2021. <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-chromatography/>

Vuorinen, S. 2009. Vieritestausopas Keuruun ja Multilan kotihoidolle. Opinnäytetyö. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Viitattu 22.09.2021. https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/5963/Vuorinen_Sisko.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Wang, F.; Beng Tan, W. & Zhang, Yong. 2005. Luminescent nanomaterials for biological labelling. Institute of Physics Publishing. Viitattu 22.09.2021. https://www.researchgate.net/publication/231059373_Luminescent_nanomaterials_for_biological_labeling