

Proteiinien biotinylointiasteen määrittäminen

Mirella Lehtiö

Pro gradu -tutkielma

Luonnonyhdisteiden ja ympäristön kemia/Radiometer Turku Oy

Kemian laitos

Turun yliopisto

Elokuu 2020

Turun yliopiston laatuvarmistuksen mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

MIRELLA LEHTIÖ: Proteiinien biotinylointiasteen määrittäminen

Pro gradu -tutkielma, 72 s., liitteet 8 s.

Kemia

Elokuu 2020

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Prosessia, jossa biotiini sitoutuu kovalenttisesti proteiiniin tai muuhun makromolekyyliin, kutsutaan biotinyloinniksi. Tärkeä osa biotinylointia on määrittää biotinyloituun johdannaiseen sitoutuneiden biotiinien määrä, jota tässä tutkielmassa kutsutaan biotinylointiasteeksi, sillä se vaikuttaa merkittävästi biotinyloidun yhdisteen toimivuuteen. Pro gradu -tutkielman kirjallisessa osiossa perehdytään erilaisiin biotinylointiasteen määrittämenetelmiin ja vertaillaan niiden toimivuutta. Yleisesti käytetyn 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappomäärityksen (HABA-määritys) lisäksi käsitellään entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä, nestekromatografiaa, massaspektrometriaa ja elektroforeettista liikkuvuussiirtymämääritystä. Lisäksi tarkastellaan määrittämenetelmiä, joissa hyödynnetään biotiinin kykyä sammuttaa (strept)avidinin luonnollista fluoresenssia tai Biotektive Green -reagenssia. Kirjallisessa osiossa vertaillaan myös erilaisia tapoja tuottaa detektoitava signaali.

Tutkielman kokeellisessa osiossa optimoitiin Radiometer Turku Oy:n laadunvalvonnassa käytettävää määritystä, jolla mitataan biotinyloidun monoklonaalisen vasta-aineen (Bio-mAb) biotinylointisaanto immunomäärityksen avulla. Biotinylointisaannolla tarkoitetaan tässä tutkielmassa sitä, että kuinka suuri osuus biotinyloiduista vasta-aineista on biotinyloitunut. Päämääränä oli parantaa määrityksen luotettavuutta, tarkkuutta ja toistettavuutta. Lisäksi haluttiin parantaa dissosiaatiotehostetun lantanoidifluoresenssi-immunomäärityksen (DELFI) herkkyyttä, jotta korkean biotinylointisaannon Bio-mAb:ien biotinylointisaannot voidaan määrittää mahdollisimman tarkasti. Myös käyttäjäystävällisyyttä pyrittiin kehittämään ja optimoimaan juuri käyttötarkoitukseen sopivat parametrit. Optimointi suoritettiin testaamalla eri pituisia inkubaatioaikoja, reagenssien pitoisuuksia ja muita vaihtoehtoisia menetelmiä. Lisäksi määritettiin toimivampi standardikäyrä, optimoitiin näytteen ja standardien pitoisuudet sekä näyttereplikoiden määrä. Myös streptavidinin ja eri streptavidinilevyerien vaikutusta määritykseen tutkittiin. Optimoinnin ansiosta määrittäminen parani ja lisäksi saatiin tärkeää tietoa siitä, että miten erilaiset parametrit vaikuttavat määritykseen.

Asiasanat: *Biotiini, biotinylointiaste, biotinylointisaanto, DELFIA, HABA, IgG, immunomääritys, proteiini, streptavidini*

SISÄLLYSLUETTELO

Lyhenteet.....	i
1 Johdanto	1
KIRJALLINEN OSA	3
2 Immunomääritys	4
2.1 Immunomääritystyytit	5
2.1.1 Immunometrinen immunomääritys.....	5
2.1.2 Kilpaileva immunomääritys.....	6
2.1.3 Heterogeeninen ja homogeeninen immunomääritys.....	6
3 Signaalin tuottaminen leiman avulla.....	7
3.1 Radioisotoopit	7
3.2 Luminoivat yhdisteet.....	8
3.3 Fluoresoivat yhdisteet.....	8
3.3.1 Dissosiaatiotehostettu lantanoidifluoresenssi.....	9
3.4 Entsyymit.....	10
3.5 Muut leima-aineet.....	10
4 Biotiinin affiniteetti avidiiniin ja streptavidiniin	10
5 Biotinylointiasteen määrittämenetelmät.....	11
5.1 Näytteiden esikäsittely	11
5.2 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo-määritys	12
5.2.1 Välikappaleen lisääminen.....	13
5.2.2 Proteolyysi ennen määrittystä	14
5.3 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.....	14
5.3.1 Absorbanssidetektointi.....	14
5.3.2 Fluoresenssipolarisaatidetektointi.....	15
5.4 Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa hyödyntävä määrittäys	15

5.4.1	Absorbanssidetektointi.....	15
5.4.2	Fluoresenssidetektointi.....	16
5.5	Massaspektrometriaa hyödyntävä määrittäminen.....	17
5.6	Määrittäminen, joka hyödyntää biotiinin kykyä sammuttaa (strept)avidinin luonnollinen fluoresenssi	17
5.7	Elektroforeettinen liikkuvuussiirtymämäärittäminen	18
5.8	Biotektive Green -reagenssia hyödyntävä määrittäminen	19
5.9	Yhteenveto.....	21
6	Johtopäätökset.....	23
	KOKEELLINEN OSA.....	25
7	Materiaalit ja menetelmät.....	26
7.1	Näytteet	26
7.2	Reagenssit.....	26
7.3	Menetelmät.....	27
7.3.1	Biotinylointisaannon määrittäminen: alkuperäinen menetelmä.....	27
7.3.2	Leima ja sen pitoisuuden optimointi	30
7.3.3	Reaktiokinetiikan testaus	31
7.3.4	Näytteiden ja reagenssien tilavuuksien optimointi	32
7.3.5	Tulosten analysointi biotinylointisaannon laskemiseksi.....	33
7.3.6	Streptavidinilevyerien vertailu.....	34
7.3.7	Streptavidinin vaikutus mittaustuloksiin.....	34
8	Tulokset ja niiden tarkastelu	34
8.1	Näytelaimennosten testaaminen	34
8.2	Leima ja sen pitoisuuden optimointi	35
8.2.1	PerkinElmerin leima.....	35
8.2.2	Kaivogen Oy:n leima	36

8.3	Reaktiokinetiikan testaus.....	39
8.3.1	Biotinyloituneen vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka streptavidiinilevylle 40	
8.3.2	Biotinyloitumattoman vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka hiiren IgG- vasta-ainetta tunnistavalle levylle	44
8.3.3	Leiman sitoutumisen kinetiikka biotinyloitumattomaan vasta-aineeseen.	45
8.4	Näytteiden ja reagenssien tilavuuksien optimointi.....	47
8.4.1	Streptavidiinilevylle lisätyn näytteen tilavuus	47
8.4.2	Streptavidiinilevyltä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle siirretyn näytteen tilavuus.....	53
8.4.3	Vaiheessa 2 lisätyn Bio-mAb-puskurin tilavuus.....	55
8.5	Biotinyloidun vasta-aineen näytepitoisuuden optimointi.....	56
8.6	Tulosten analysointi biotinylointisaannon laskemiseksi	58
8.6.1	Standardikäyrä ja standardien pitoisuudet	58
8.6.2	Replikoiden määrä	62
8.7	Streptavidiinilevyerien vertailu ja streptavidiinin vaikutus määrittelyyn	63
8.8	Optimoitu määrittely.....	65
9	Loppupäätelmät.....	67
	Viitteet.....	69
	Liitteet	i

LYHENTEET

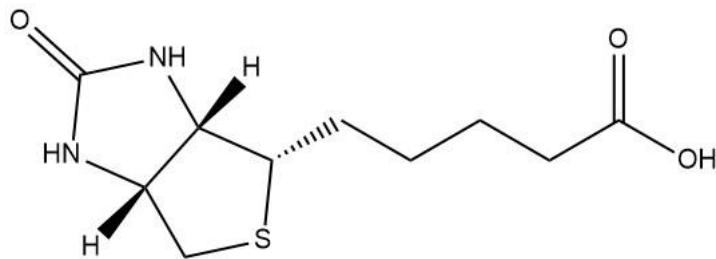
Ab	vasta-aine antibody
Bio	biotini
Bio-Ab	biotinyloitu vasta-aine biotinylated antibody
Bio-mAb	biotinyloitu monoklonaalinen vasta-aine biotinylated monoclonal antibody
BSA	naudan seerumin albumiini bovine serum albumin
DELFLIA	dissosiaatiotehostettu lantanoidifluoresenssi-immunomääritys dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	elektroforeettinen liikkuvuussiirtymämääritys electrophoretic mobility shift assay
ESI	sähkösumutus-ionisaatio electrospray ionization
FAB	nopea atomipommitus fast atom bombardment
FITC	fluoreseiini-isotiosyanaatti fluorescein isothiocyanate
HABA	4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia

	high performance liquid chromatography
HRP	piparjuuriperoksidaasi horseradish peroxidase
HSA	ihmisen seerumin albumiini human serum albumin
IgG	immunoglobuliini G
LC	nestekromatografia liquid chromatography
LOD	toteamisraja limit of detection
mAb	monoklonaalinen vasta-aine monoclonal antibody
MALDI	matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio matrix-assisted laser desorption/ionisation
MS	massaspektrometria
NT-proBNP	N-terminaalinen pro B-tyypin natriureettinen peptidi N-terminal pro B-type natriuretic peptide
RNA	ribonukleiinihappo ribonucleic acid
RP	käänteisfaasi reversed phase
RT	huoneenlämpö room temperature
SA	streptavidiini
SELDI	pinta-avusteinen laser-desorptio-ionisaatio surface-enhanced laser desorption/ionization

TnI	troponiini I
TOF	lentoaika
	time-of-flight

1 JOHDANTO

Prosessia, jossa biotiini (kuva 1) sitoutuu kovalenttisesti proteiinin tai muuhun makromolekyylisiin kutsutaan biotinyloinniksi. Biotinylointi on vasta-aineiden leimausmetodi, jota voidaan hyödyntää useissa biotieteellisissä tutkimuksissa¹⁻⁴ kuten immunomäärityksissä^{5,6}, biotiini-leimatuissa DNA-koettimissa⁶, bioreaktoreissa ja biosensoreissa.⁴ Biotiinin konjugoiminen on helppoa⁷ ja kaupallisesti on myynnissä useita biotinylointireagensseja, joilla voidaan liittää biotiini proteiineihin, hiilihydraatteihin, nukleiinihappoihin ja muihin biomolekyyleihin^{4,8}. Biotiinin suhteellisen pienen koon ansiosta se voidaan konjugoida moniin proteiineihin ilman, että niiden biologiset aktiivisuudet muuttuvat¹.



Kuva 1. Biotiinin rakenne.

Tärkeä osa biotinylointia on määrittää biotinyloituun johdannaiseen sitoutuneiden biotiinien määrä^{4,9}, jota tässä tutkielmassa kutsutaan biotinylointiasteeksi, sillä se vaikuttaa merkittävästi biotinyloidun yhdisteen toimivuuteen. Liian pieni määrä biotiinia voi johtaa siihen, että yhdiste sitoutuu huonosti kohteeseen kuten avidiiniin, streptavidiniin tai anti-biotiiniin, kun taas liian suuri määrä biotiinia voi huonontaa leimatun yhdisteen aktiivisuutta. Proteiiniin kiinnittyneiden funktionaalisten biotiinien määrä antaa siten arvion biotinyloidun reagenssin toimivuudesta.^{4,5,9,10} Määrittämällä biotinylointiaste voidaan myös seurata johdannaisten eristämisen ja puhdistuksen tehokkuutta sekä eri erien yhdenmukaisuutta.⁵ Lisäksi sen avulla voidaan optimoida biotinylointireaktiota.¹⁰⁻¹² Vaikka biotinylointiaste tulisikin määrittää erityisesti hiljattain valmistetuille biotinyloituille yhdisteille, se tulisi tarkistaa säännöllisesti myös varastoiduista materiaaleista, jotta voidaan varmistaa niiden stabiilisuus.¹³

Biotinylointiasteen määrittämistä hankaloittaa se, että biotiini on vaikea detektoida, sillä sen luontainen absorptio on hyvin lähellä proteiinien ja nukleiinihappojen absorptiota.² Biotinylointiasteen määrittämiseksi on kuitenkin

kehitetty erilaisia määrittämenetelmiä. Määrittämissä on voitu käyttää esimerkiksi 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappoa (HABA), entsyymivälitteistä immuno-sorbenttimäärittäystä (ELISA), nestekromatografiaa (LC) tai massaspektrometriaa (MS). Lisäksi on voitu hyödyntää biotiinin kykyä sammuttaa (strept)avidinin luonnollista fluoresenssia tai Biotektive Green -reagenssia. Vastaavasti signaalin havaitsemiseen on käytetty usein absorbanssia tai fluoresenssia, mutta myös esimerkiksi hopeavärjäystä. Biotinylointiasteen määrittämiseksi on myös tarjolla useita kaupallisia määrittäspaketteja, joista monet perustuvat juuri HABA:n hyödyntämiseen.

Tämän Pro gradu -tutkielman kokeellisessa osiossa optimoitiin Radiometer Turku Oy:ssä laadunvalvonnassa käytettävää testiä, jolla määritetään biotinyloidun monoklonaalisen vasta-aineen (Bio-mAb) biotinylointisaanto. Tässä tutkielmassa biotinylointisaannolla tarkoitetaan sitä, että kuinka suuri osa biotinyloiduista vasta-aineista on biotinyloitunut. Työssä tutkitut näytteet olivat Radiometer Turku Oy:ssä biotinyloituja monoklonaalisia vasta-aineita (mAb). Bio-mAb-liuoksen kokonaispitoisuus oli määritetty absorbanssin avulla ja biotinyloituneen mAb:in osuus Bio-mAb:issa määritettiin mittaamalla ensin biotinyloitumattoman mAb:in määrä.

Biotinylointisaannon määrittämiseksi määrittämissä hyödynnettiin biotiinin affiniteettia streptavidiniin (SA) sekä dissosiaatiotehostettua lantanoidifluoresenssi-immunomäärittäystä (DELFIJA). Työn tavoitteena oli parantaa määrittäksen luotettavuutta, tarkkuutta ja toistettavuutta. Lisäksi haluttiin parantaa immunomäärittäksen herkkyyttä, jotta korkean biotinylointisaannon Bio-mAb:ien biotinylointisaannot voidaan määrittää mahdollisimman tarkasti. Biotinylointisaanto tulee määrittää, jotta voidaan varmistaa, että biotinylointireaktio toimii hyvin, jolloin biotinylointisaannot ovat mahdollisimman lähellä 100 %:a, mikä taas vähentää materiaalihukkaa tuotannossa. Myös käyttäjäystävällisyyttä pyrittiin kehittämään ja optimoimaan juuri käyttötarkoitukseen sopivat parametrit. Optimointi suoritettiin testaamalla eri pituisia inkubaatioaikoja, reagenssien pitoisuuksia ja muita vaihtoehtoisia menetelmiä. Lisäksi määritettiin toimivampi standardikäyrä, optimoitiin näytteen ja standardien pitoisuudet sekä näyttereplikoiden määrä. Myös SA:n ja eri SA-levyerien vaikutusta määrittäykseen tutkittiin.

KIRJALLINEN OSA

2 IMMUNOMÄÄRITYS

Immunomääritys on tekniikka, jossa käytetään vasta-aineita sitomaan haluttu analyytti näytteestä.¹⁴ Vasta-aineet ovat spesifisesti sitoutuvia ja biologisesti aktiivisia proteiineja, jotka toimivat ihmisten ja eläinten luonnollisessa immunitetissa.⁵ Koska analyyttiä on yleensä vain hyvin pieni määrä, pelkästään sen eristäminen näytteestä ei riitä, vaan tarvitaan myös reagenssi,⁵ joka saa aikaan mitattavan signaalin.¹⁴ Tätä reagenssia kutsutaan leimaksi. Analyysi suoritetaan mittaamalla leiman signaali hyödyntäen esimerkiksi radioaktiivista säteilyä, fluoresenssia tai entsyymiä niin, että fraktio on joko sidottuna tai vapaana. Mittausten avulla voidaan piirtää standardisuora, jonka avulla tuntemattoman analyytin konsentraatio voidaan määrittää.¹⁵ Leimaa käyttämällä määrittäminen on herkempi, havaitsemisrajat ovat hyvin matalia ja määrittäminen on helpompi seurata.^{7,15}

Immunomääritystä hyödynnetään monissa tärkeissä farmaseuttisissa analyyseissä kuten sairauksien diagnosoimisessa, terapeuttisissa lääkeaineiden seurannoissa ja lääkekehitykseen liittyvissä kliinisissä farmakokinetiikka- ja bioekvivalenssimittauksissa.¹⁵ Tämän lisäksi sitä voidaan hyödyntää ympäristö-, oikeuslääke-, sotilas- ja elintarviketieteissä. Immunomääritystä on käytetty jo 1900-luvulla ja se onkin osoittautunut yhdeksi tuottoisimmista teknisistä saavutuksista lääke- ja biotieteissä.¹⁴

Immunomäärityksen etuina ovat luontainen valikoivuus ja herkkyys suurelle joukolla biologisissa näytteissä esiintyvillä analyyteillä.¹⁵ Lisäksi määrittämisessä käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit ovat suhteellisen halpoja. Immunomäärityksen ainutlaatuinen spesifisyys, herkkyys ja monimuotoisuus perustuvat seuraaviin kolmeen vasta-aineen ominaisuuteen:¹⁴

- Vasta-aineen avulla voidaan eristää erittäin laaja-alaisesti erilaisia luonnonmukaisia ja keinokekoisia kemikaaleja, biomolekyylejä, soluja ja viruksia. Tämä ominaisuus perustuu siihen, että vasta-aineet ovat proteiineja ja niiden sitoutumiskohdat muodostuvat aminohapposekvensseistä, joista voidaan muodostaa erittäin suuri joukko erilaisia kombinaatioita. Kaikilla 22 aminohapolla on omat ainutlaatuiset sitoutumis- ja suuntautumisoiminaisuudet ja lisäksi aminohappoketjut voivat kiertyä ja taittua tarjoten useita sitoutumiskohtia.¹⁴
- Vasta-aine sitoutuu hyvin spesifisti juuri tiettyyn kohteeseen.¹⁴
- Vasta-aineen ja analyytin välillä on vahva ei-kovalenttinen sidos, joka kestää käsittelyn ja signaalia tuottavan vaiheen.¹⁴

Jotta analyytin pitoisuus näytteessä voidaan määrittää, tulee määrittää myös standardisuora. Standardisuora tehdään siten, että samassa määrittämisessä tuntemattomien näytteiden lisäksi mitataan eri laimennosten signaalit liuoksesta, joissa analyytin määrä on tunnettu. Kaupallisissa määrittämissä paketeissa hyödynnetään usein etukäteen kalibroituja liuoksia. Standardisuoran avulla saadaan mitattua analyytin määrä kvantitatiivisesti, mutta joissain tapauksissa riittää pelkästään kvalitatiivinen määrittäminen.¹⁴

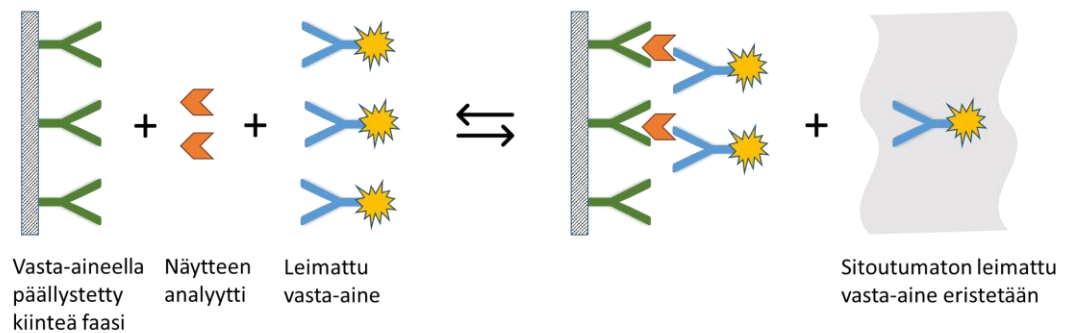
2.1 IMMUNOMÄÄRITYSTYYPIT

Immunomäärittämiset voidaan jakaa muutamisiin päätyyppisiin niiden toimintatavan perusteella. Käytettävä tyyppi valitaan analyytin luonteen, käytettävissä olevan leimausmetodin ja määrittämissä vaatimien analyyttisten parametrien eli herkkyuden, dynaamisen alueen ja tarkkuuden mukaan.¹⁵

2.1.1 Immunometrinen immunomäärittäminen

Yksinkertaisin immunomäärittämismetodi on immunometrinen eli ei-kilpaileva immunomäärittäminen. Tätä määrittämistä hyödynnetään silloin, kun tutkitaan suuria analyyttejä, joissa on enemmän kuin yksi paikka, johon vasta-aine voi sitoutua eli epitoppi. Määrittämisessä vasta-aine sidotaan kiinteään faasiin kuten muovipinnalle, josta se sitoo näytteessä olevan analyytin. Tämän lisäksi detektointia varten tarvitaan leimattu vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti saman analyytin ei-limitäiseen epitoppiin.¹⁴

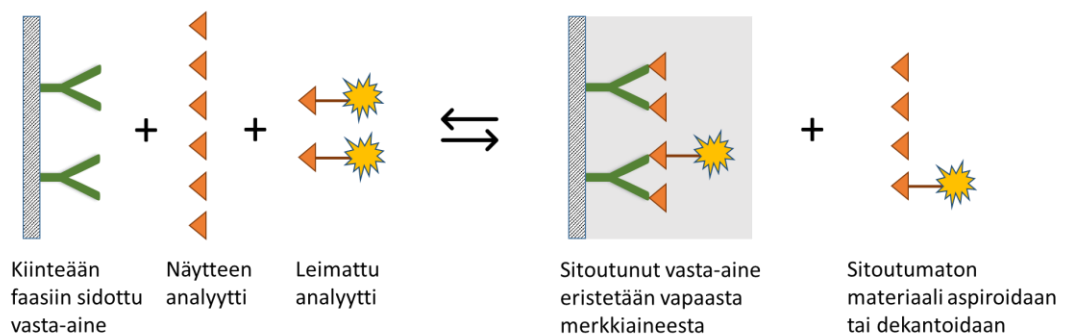
Määrittäminen suoritetaan siten, että analyytin annetaan aluksi sitoutua kiinteään faasiin sidottuun vasta-aineeseen. Seuraavassa vaiheessa lisätään ylimäärin leimattua vasta-ainetta ja inkuboidaan. Lopuksi sitoutumaton leimattu vasta-aine pestään pois, mitataan leimatun vasta-aineen signaali ja tämän avulla määritetään analyytin pitoisuus näytteessä (kaavio 1). Tällaista immunomäärittämistä kutsutaan myös sandwich- eli voileipämäärittämisksi, koska vasta-aineiden ja analyytin muodostama rakennelma muistuttaa voileipää.^{14,15} Vastaavanlainen määrittäminen voidaan muodostaa myös siten, että analyytti on sidottu kiinteään faasiin, jolloin näytteessä oleva vasta-aine sitoutuu siihen. Tähän vasta-aineeseen taas sidotaan toinen leimattu vasta-aine.¹⁴



Kaavio 1. Immunometrisen immunomäärityksen toimintaperiaate.¹⁴

2.1.2 Kilpaileva immunomääritys

Immunometrinen immunomääritys toimii parhaiten silloin, kun analyytti on suuri molekyyli, johon kaksi vasta-ainetta pystyy sitoutumaan samanaikaisesti. Pienten molekyylien kuten lääkeaineiden tapauksessa immunometrinen määrittäminen ei kuitenkaan toimi, jolloin voidaan hyödyntää kilpailevaa immunomääritystä. Tässä määrittäyksessä käytetään vain yhtä vasta-ainetta ja sitäkin on tarkka rajattu määrä (kaavio 2). Kilpailevassa immunomäärityksessä analyytti on leimattu ja sen määrä on myös tarkasti rajattu. Vasta-aineeseen sitoutuneen analyytin määrä on epäsuorasti verrannollinen näytteessä olevan analyytin määrään.¹⁴ Määrittäminen voidaan suorittaa siten, että joko antigeeni tai vasta-aine on sidottu kiinteään faasiin.¹⁵

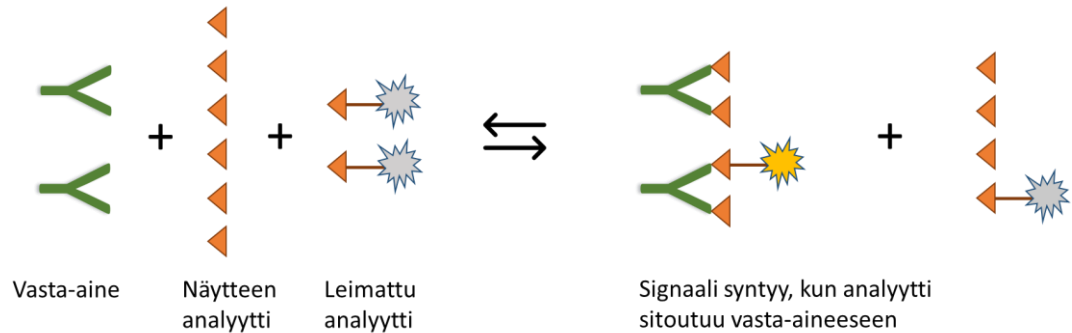


Kaavio 2. Kilpailevan immunomäärityksen toimintaperiaate.¹⁴

2.1.3 Heterogeeninen ja homogeeninen immunomääritys

Heterogeenisessä immunomäärityksessä sitoutumaton leima poistetaan kiinteästä faasista ennen signaalin mittaamista esimerkiksi pesemällä, sillä muussa tapauksessa signaalin suuruus vastaisi lisätyn leiman eikä analyytin pitoisuutta. Homogeeninen immunomääritys toimii taas siten, että leima tuottaa signaalin vain siinä tapauksessa, jos

se on kiinnittynyt analyyttiin tai vasta-aineeseen. Näin ollen leimaa ei tarvitse poistaa ennen signaalin mittaamista.¹⁴ Kaavioiden 1 ja 2 esimerkit ovat heterogeenisiä immunomäärityksiä, ja kaaviossa 3 on esimerkki homogeenisesta immunomäärityksestä.



Kaavio 3. Esimerkki homogeenisesta immunomäärityksestä.¹⁴

3 SIGNAALIN TUOTTAMINEN LEIMAN AVULLA

Leiman käyttäminen tekee immunomäärityksen seuraamisesta helpompaa ja lisäksi se parantaa herkkyyttä ja alentaa toteamisrajoja.^{7,15} Tässä luvussa tutustutaan erilaisiin leima-aineisiin, joilla immunomäärityksessä käytetyt yhdisteet voidaan leimata sekä niiden toimintaperiaatteisiin.

3.1 RADIOISOTOOPIT

1960-luvulla alkanut radioisotooppien hyödyntäminen immunomäärityksissä oli modernin immunomääritysteknologian alku. Radioimmunomäärityksen etuna on sen suuri herkkyys, tarkkuus ja monikäyttöisyys.^{7,15} Lisäksi näyte tai ympäristö ei juurikaan vaikuta määrittelyyn.⁷ Tutkimuksissa hyödynnetään useimmiten radioaktiivisia ¹²⁵I-, ³H- tai ¹⁴C-atomeita,¹⁵ mutta myös esimerkiksi ¹³¹I-leimattua insuliinia¹⁶, ihmisen globuliinia¹⁷ tai ⁵⁷C-leimattua B₁₂-vitamiinia on käytetty. Radioisotooppien hyödyntämisen huono puoli on kuitenkin säteily ja sen aiheuttamat riskit, isotooppien lyhyt elinikä ja radioisotooppien kallis valmistus. Lisäksi radioimmunomääritys on monimutkainen suorittaa, mikä lopulta johti muiden leima-aineiden suosion kasvamiseen.^{7,15}

3.2 LUMINOIVAT YHDISTEET

Luminesenssi viittaa kaikenlaiseen valon emittoitumiseen yhdisteestä, joka on viritystilassa¹⁸, hehkumistilaa lukuun ottamatta. Luminesenssi-immunomäärityksessä hyödynnetään luminoivia tai luminogeenisiä yhdisteitä leima-aineina. Termiä käytetään myös sellaisista immunomäärityksistä, joissa käytetään esimerkiksi entsyymejä, substraatteja tai kofaktoreita leima-aineina valoa tuottavissa reaktioissa. Luminesenssi-immunomäärityksissä hyödynnetään vain kemiluminesenssia, johon kuuluu myös bioluminesenssi. Yleensä kemiluminesenssireaktiot ovat hapetusreaktiota, joissa erilaiset orgaaniset molekyylit hapettuvat. Bioluminesenssin tapauksessa entsyymi katalysoi kyseisen reaktion.⁷ Määrityksen etuna on korkea suorituskyky, alhainen toteamisraja ja hyvä tarkkuus.¹⁵

3.3 FLUORESOIVAT YHDISTEET

Ilmiötä, jossa luminoiva molekyyli viritetään fotonien avulla, kutsutaan fotoluminesenssiksi. Fotoluminesenssi perustuu siihen, että kun molekyyli absorboi valoa, korkeimmalla miehityllä orbitaalilla oleva elektroni siirtyy korkeammalle viritystilalle. Kun tämä viritystilasta purkautuu, molekyyli emittoi fotonin.⁷

Fotoluminesenssi jaetaan edelleen fluoresenssiin ja fosforenssiin. Fluoresenssissa virittyneen elektronin spin on vastakkainen sen perustilalla olevan parin kanssa. Täten paluu perustilaan on spin-sallittu ja tapahtuu nopeasti fotonin emission kautta (10×10^{-9} s). Fosforenssissa virittyneen elektronin spin on saman suuntainen kuin perustilassa olevan elektronin. Koska elektroneilla on samansuuntaiset spinin, paluu perustilaan on spin-kielletty ja emissio tapahtuu hitaasti (0,001–1 s).¹⁸

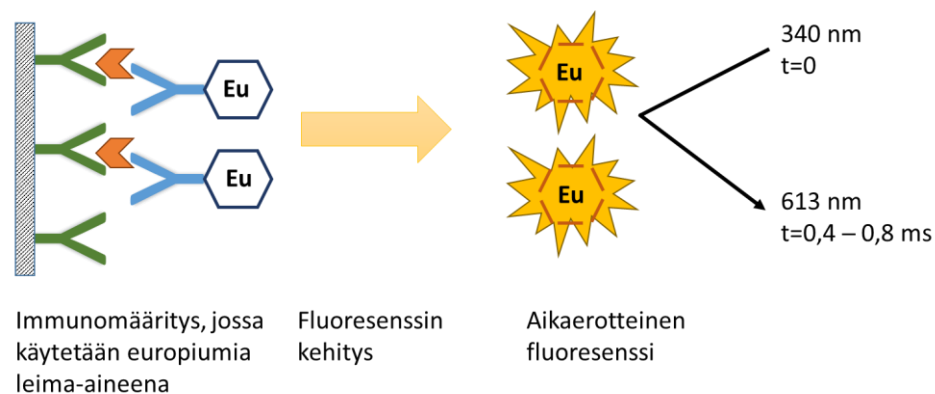
Fluoresenssia hyödyntävissä immunomäärityksissä leimana käytetään fluoresoivia merkkiaineita, fluoresoivilla ilmaisimilla merkittyjä immunoreagensseja tai fluorogeenisiä yhdisteitä.⁷ Fluoresoivat yhdisteet ovat yleensä aromaattisia.¹⁸ Fluoresenssin etuna on sen luontainen spesifisyys, sillä mitattu signaali määritetään sekä virityksen että emissioaallonpituuksien avulla ja spesifisyyttä voidaan vielä parantaa fluoresenssin elinaikaan perustuvan tekniikan avulla, jota kutsutaan aikaerotteiseksi fluoresenssiksi.⁷ Aikaerotteisessa fluoresenssissa leima-aine fluoresoi pidempään kuin tausta joten, kun fluoresenssin vaimenemisen signaali mitataan ajan funktiona, taustesignaali voidaan erottaa näytesignaalista.¹⁸ Aikaerotteista fluorometriaa varten

tarvitaan monimutkaisemmat ja kalliimmat laitteet, mutta se antaa enemmän tietoa molekyylistä.^{15,18}

Spesifisyyden lisäksi fluoresenssiin perustuvalla detektoinnin etuna on hyvä herkkyys.^{7,18} Käytännön sovelluksissa fluorometriset menetelmät ovat kuitenkin herkkiä erilaisille häiriöille.⁷ Lisäksi fluorogeenisiä substraatteja hyödyntävillä määrittelyillä on hyvin rajallinen dynaaminen alue.¹²

3.3.1 Dissosiaatiotehostettu lantanoidifluoresenssi

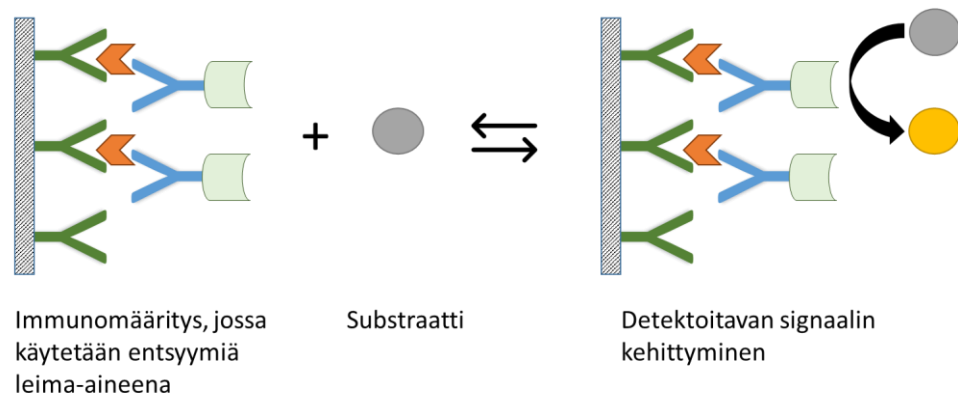
Atomit eivät yleensä fluoresoi, mutta poikkeuksen tekevät fotoluminoivat lantanoidit Eu^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} ja Dy^{3+} .¹⁸ Leimauksessa lantanoidi-ioni kytketään leimattavaan reagenssiin bifunktionaalisen kelatoivan aineen avulla.¹⁹ Tällaiset kelaatit ovat stabiileja, bioyhteensopivia ja sitoutuvat spesifisti.²⁰ Ne eivät kuitenkaan fluoresoi, joten menetelmä vaatii lisävaiheen, joka aktivoi fluoresenssin. DELFIA-menetelmässä leimattu reagenssi saadaan fluoresoivaksi alhaisessa pH:ssa, kun β -diketonia on ylimäärin läsnä. Näissä olosuhteissa lantanoidi-ioni dissosioituu leimatusta reagenssista ja muodostaa uuden kelaatin β -diketonin kanssa. β -Diketoni absorboi valoa ja välittää energian lantanoidille, joka siten virittyy ja emittoi. Koska luminoivat lantanoidikelaatit fluoresoivat pitkään, aikaerotteista fluorometriaa voidaan hyödyntää niiden havaitsemisessa.¹⁹ Määrittelyksen toimintaperiaate on esitetty kaaviossa 4.



Kaavio 4. Dissosiaatiotehostetun lantanoidifluoresenssi-immunomäärityksen (DELFIA) toimintaperiaate.¹⁹

3.4 ENTSYIMIT

Vasta-aineiden tavoin entsyymit ovat proteiineja, jotka kiinnittyvät valikoituihin kohteisiin. Erona vasta-aineisiin on kuitenkin se, että ne pystyvät katalysoimaan tiettyjä reaktioita.^{7,14} Entsyymien katalysoimissa reaktioissa substraatin avulla saadaan aikaa reaktio, joka voi tuottaa väriä tai kehittää fluoresenssia tai luminesenssia. Näitä ominaisuuksia voidaan mitata optisilla tai elektronisilla laitteilla.^{14,15} Jokainen entsyymimolekyyli pystyy kuluttamaan monta substraattimolekyyliä, jonka ansiosta signaaleja syntyy herkästi. Entsyymi-leima-ainetta hyödyntävää määrittystä kutsutaan entsyymivälitteiseksi immunosorbenttimääritykseksi (ELISA) ja sen toimintaperiaate on esitetty kaaviossa 5.¹⁴



Kaavio 5. Entsyymivälitteisen immunosorbenttimäärityksen (ELISA) toimintaperiaate.¹⁴

3.5 MUUT LEIMA-AINEET

Edellä mainittujen lisäksi on testattu myös muita vaihtoehtoisia leima-aineita, joista toiset ovat toimineet ja toiset eivät. Näitä vaihtoehtoisia leima-aineita ovat olleet punasolut, bakteriofagit, vapaat radikaalit, liposomit¹⁵, metallit ja metallikelaatit^{15,7}

4 BIOTIININ AFFINITEETTI AVIDIINIIN JA STREPTAVIDIINIIN

Funktionaalisten biotinyloitujen proteiininen ja peptidien kehittäminen on olennaista avidiinia ja biotiinia hyödyntävissä tekniikoissa²¹. Biotiinilla on suuri affiniteetti avidiiniin ja sen johdannaisiin kuten SA:n^{1,9}. Avidiini on kananmunan valkuaisesta eristetty

emäksinen glykoproteiini, kun taas SA on *Streptomyces avidii* -bakteerista eristetty proteiini, jolla on lähes yhtä suuri molekyylipaino, mutta joka ei ole emäksinen tai glykolysoitu. Molemmilla on kuitenkin yhtä suuri affinitetti biotiiniin ($K_a = 10^{-15} \text{ M}^{-1}$).⁷ Tämä on vahvin ei-kovalenttinen biologinen vuorovaikutus proteiinin ja ligandin välillä.¹ Jokaisessa (strept)avidiinissa on neljä sitoutumiskohtaa, johon biotiini ja biotinyloidut komponentit voivat sitoutua.^{4,8} Biotiini-(strept)avidiini-systeemien käyttö onkin lisääntynyt huomasti erilaisissa bioteknisissä, analyttisissä ja terapeuttisissa sovelluksissa.⁴ Myös monet biotinylointiasteen määrittämenetelmät perustuvat biotiinin ja avidiinin tai biotiinin ja SA:n välisiin vuorovaikutuksiin.⁹

5 BIOTINYLOINTIASTEEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

Biotinylointiasteen määrittämenetelmiä vertailtaessa tulee ottaa huomioon useita asioita. Määrittäksen tulisi olla luotettava, toistettava ja tarkka. Lisäksi näytettä tulisi kulua mahdollisimman vähän. Määrittäminen tulisi myös mielellään olla helppo ja nopea suorittaa, ja sitä varten olisi hyvä löytyä valmiit reagenssit ja laitteet. Alhaiset kustannukset ovat myös toivottuja.

Biotinylointiasteen määrittämiseksi on kehitetty erilaisia määrittäksiä, joita esitellään tässä kappaleessa. Toiset määrittäksistä mittaavat kokonaisuudessaan kaikkien proteiiniin sitoutuneiden biotiinien määrän, kun taas toiset vain funktionaalisten biotiinien eli niiden, jotka pystyvät osallistumaan sidoksen muodostamiseen.^{4,13}

5.1 NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELY

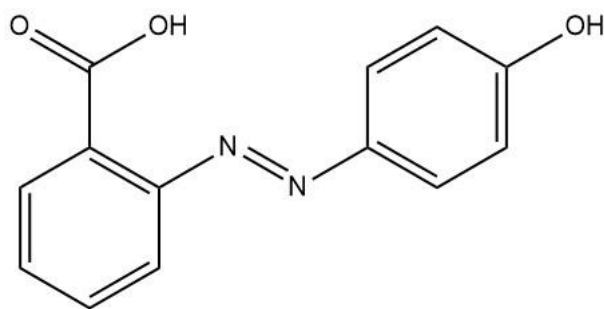
Osa määrittäksistä vaatii esikäsittelevaiheen, jossa biotinyloitu yhdiste hajotetaan esimerkiksi ensyymien^{4,12,13,22–25} tai hydrolyysin^{4,21} avulla ennen varsinaista määrittästä. Proteiinin entsyymaattista hajottamista kutsutaan proteolyysiksi. Jos proteiinia ei ole hajotettu ennen määrittästä, steerinen este ja verkkositoutuminen voivat vääristä tuloksia. Tällöin määrittäminen aliarvioi biotinylointiasteen suuruuden, eikä välttämättä määritä oikein edes funktionaalisten biotiinien määrää.^{4,12,13} Tällaisen esikäsittelevaiheen haittapuolena on se, että hajottamiseen kuluu useita tunteja, eikä se välttämättä takaa sitä, että hajoaminen tapahtuu kokonaan ja steeriset esteet poistuvat.¹⁰

Proteolyysissä voidaan hyödyntää proteinaasi K:ta, joka on *Tritirachium album*-sienestä eristetty entsyymi. Se kykenee hydrolysoimaan luonnollisia proteiineja.²⁶

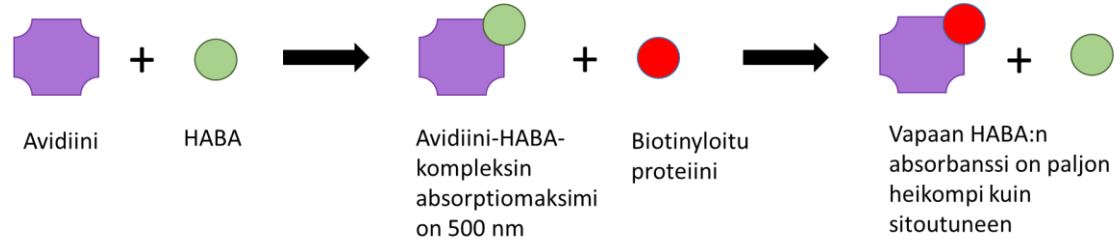
Suurimmassa osassa proteolyysiä hyödyntävissä määrittelyksissä proteolyysin annettiin tapahtua yön yli^{12,22-24}, mutta Bayerin ja Wilchekin¹³ tutkimuksen perusteella jo 3 tunnin inkubaation aikana proteinaasi K hajottaa proteiinin täysin. Kuitenkin Rao et al.:in⁴ mukaan 3 tunnin inkubaatio ei riittänyt biotinyloidun piparjuuriperoksidaasin (HRP) täydelliseen hajottamiseen, eikä biotinyloitu HRP hajonnut täysin edes 24 tunnin inkubaation jälkeen. Proteinaasi K:n määrää lisäämällä saatiin enemmän biotiinia irtoamaan, mutta siltikään kaikkea biotiinia ei saatu irrotettua. Näin ollen Rao et al.⁴ totesivat happohydrolyysin olevan parempi menetelmä biotiinin täydelliseen irrottamiseen proteiinista kuin proteolyysi proteinaasi K:n avulla.

5.2 4'-HYDROKSIATSOBENTSEENI-2-KARBOKSYYLIHAPPO-MÄÄRITYS

4'-Hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo- eli HABA-määritys (kuva 2) on yksi yleisimmin käytetyistä metodeista biotinylointiasteen määrittämiseksi.^{3,4,10,27} Sitä hyödynnetään niin kaupallisissa^{2,22,23,28-31} kuin ei-kaupallisissa^{1,4,25,32,33} määrittelyksissä. Menetelmä perustuu siihen, että HABA:lla on absorptiomaksimi 500 nm³³, kun se on sitoutunut avidiiniin. HABA:n ja avidiini välinen affiniteetti ei ole kuitenkaan kovin suuri ($K_d=5,8 \times 10^{-6} \text{ M}$)³³, joten biotiini voi helposti korvata avidiiniin sitoutuneen HABA:n.^{29,32} Täten kun biotiinia tai biotinyloitua yhdistettä lisätään HABA:a ja avidiinia sisältävään seokseen, ne korvaavat avidiiniin sitoutuneen HABA:n ja absorbanssi laskee. Absorbanssissa tapahtuneen muutoksen avulla voidaan määrittää biotiinin pitoisuus näytteessä (kaavio 6).^{4,32}



Kuva 2. 4'-Hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihapon (HABA) rakenne.



Kaavio 6. 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo- eli HABA-määrityksen toimintaperiaate.

HABA-määritys voidaan tehdä myös siten, että biotinylointiaste määritetään fluoresenssin avulla. Fluoresenssia voidaan hyödyntää, koska avidiini fluoresoi, kun HABA korvautuu biotiinilla. Biotinylointiaste määritetään vertaamalla näytteen fluoresenssia biosytiini-standardikuvaajaan. Thermo Fisher Scientificin:n²⁸ mukaan tämä määritys vaatii huomattavasti vähemmän näytettä ja on paljon herkempi kun kolorimetrinen HABA-määritys.

Kaikkiaan HABA-määritys on yksinkertainen, toistettava ja nopea suorittaa. Steeriset esteet kuitenkin huonontavat sen toimivuutta^{10,25}, sillä kaikki proteiineissa oleva biotiini ei pysty samanaikaisesti sitoutumaan avidiiniin.¹⁰ Lisäksi HABA:n ja biotinyloidun proteiinin välinen korvausreaktio ei mene koskaan loppuun.⁵ Tällöin määritys aliarvioi biotinylointiasteen suuruuden.^{4,5} Näin ollen menetelmä kykenee vain antamaan arvion niiden biotiinien määrästä, jotka pystyvät sitoutumaan avidiiniin, mutta jättää huomiotta ne biotiinit, jotka eivät sitoudu varsinkin, jos proteiineissa on monta biotiinia.⁴ Lisäksi HABA-määritys antaa vain keskimääräisen proteiiniin sitoutuneiden biotiinien määrän eikä kerro mitään niiden jakautumisesta.^{11,34} Absorbanssiin perustuvan määrityksen haittana on myös huono herkkyys, jonka takia useita nanomooleja proteiinia joudutaan kuluttamaan biotinylointiasteen määrittämiseksi.^{4,12,21} Vaikka HABA-määritystä käytetäänkin paljon, Lu ja Zenobin⁵ mukaan se ei ole hyvä määritys biotinylointiasteen määrittämiseksi.

5.2.1 Välikappaleen lisäämiseen

HABA-määrityksessä avidiinin tai SA:n ja biotiinin välillä olevan steerisen esteen vähentämiseksi voidaan käyttää biotinylointiasteita, jotka liittyvät pidemmän välikappaleen biotiinin ja proteiinin väliin^{4,8,35,36}. Greenin²⁵ artikkelin mukaan biotiini reagoi avidiinin kanssa vain silloin, kun biotiinin ja proteiinin välillä on ainakin viisi metyleeniryhmää.

Rao et al.:in⁴ tutkimuksessa vertailtiin pitkäketjuista biotiini johdannaista sellaisen johdannaisen kanssa, jossa ei ollut välikappaletta. Välikappaleen todettiin pienentävän tulosten virhettä, mutta kuitenkin noin 1,3 biotiinia per naudan seerumin albumiini (BSA) oli steerisesti estynyt sitoutumaan avidiiniin. Näin ollen vaikuttaa siltä, että vaikka välikappale parantaakin menetelmän toimivuutta, se ei kuitenkaan kykene ainakaan mittaamaan kokonaisbiotinylointiastetta.

5.2.2 Proteolyysi ennen määrittystä

Tyypillisesti biotinyloiduissa proteiineissa on useita biotiineja eivätkä ne kaikki välttämättä pysty sitoutumaan samanaikaisesti SA:n, sillä SA on monivalenssinen, jolloin suurimpiin proteiineihin kiinnittyneiden biotiinien ei ole mahdollista sitoutua samanaikaisesti kaikkiin neljään sitoutumiskohtaan.¹² Täten osassa HABA-määrittymenetyksissä suositellaan, että biotinyloitu yhdiste hajotetaan ennen HABA-määrittystä. Esimerkiksi Abcam:in²³ määrittymessä kehoitettiin hajottamaan biotinyloitu yhdiste trypsiini-entsyymillä, jos proteiinissa on enemmän kuin viisi biotiinia ja vastaaineessa enemmän kuin kymmenen. Thermo Fisherin Scientific:n²² mukaan biotinyloitu yhdiste voidaan pilkkoa proteinaasisekoituksen avulla ennen absorbanssin mittaamiseen perustuvaa HABA-määrittystä steerisen esteen vähentämiseksi, mutta se ei ole välttämätöntä. Jos proteolyysia ei suoriteta ennen määrittystä, niin silloin saadaan selville funktionaalisten biotiinien määrä.

5.3 ENTSYYMIVÄLITTEINEN IMMUNOSORBENTTIMÄÄRITYS

Tässä kappaleessa esitellään ELISA:aan perustuvia määrittymenetyksiä biotinylointiasteen määrittämiseksi.

5.3.1 Absorbanssidetektointi

Tässä määrittymessä biotinyloitu proteiini hajotettiin ensin proteinaasi K:n avulla, jonka jälkeen suoritettiin kilpaileva ELISA-määrittys siten, että ensin hajotettuja näytteitä inkuboitettiin anti-Bio-Ab:n kanssa. Seuraavaksi ne siirrettiin mikrotiitterilevylle, joka oli päällystetty biotinyloidulla ihmisen seerumin albumiinilla (HSA). Detektoinnissa vertailtiin näytteiden ja referenssien absorbansseja biotinylointiasteen laskemiseksi.¹²

Määrittymessä käytettiin streptavidiniin sijaan anti-Bio-Ab:ia, koska sen avulla saadaan sopiva herkkyysalue ilman, että biotinyloitua proteiinia tarvitsee laimentaa

miljoonakertaisesti, mikä voisi heikentää tarkkuutta. Määritys ei ole niin herkkä, että muista lähteistä tulleet pienet määrät biotiinia vaikuttaisivat tuloksiin, mutta se on kuitenkin tarpeeksi herkkä, jotta ei kuluta turhan paljon tutkimusmateriaalia.¹² Toisaalta Rispens ja Ooijevaar-de Heerin¹² mukaan liian herkkä määritys on hankala rutiinikäytössä. Määrityksen haittapuolena on se, että anti-Bio-Ab:illa voi olla erilainen affiniteetti biotinyloituihin yhdisteisiin, joissa on erilainen välikappale biotiinin ja proteiinin välillä. Näin ollen standardin tulisi olla valmistettu samasta reagenssista kuin se, jolla proteiini on biotinyloitu. Lisäksi HABA-määrityksiin verrattuna tämän määrityksen kesto on suhteellisen pitkä.

5.3.2 Fluoresenssipolarisaatiodetektointi

Tässä kilpailevassa ELISA-määrityksessä anti-biotiini-mAb:iin sitoutumisesta kilpailivat fluoresoivalla fluoreskeinilla leimattu biotiini sekä biotinyloitu proteiini. Biotinylointia määritettiin mittaamalla fluoreskeinilla leimatun biotiinin fluoresenssipolarisaatio.⁹ Fluoresenssipolarisaatiossa fluoresoiva yhdiste viritetään polarisoidun valon avulla, jolloin emissio riippuu yhdisteen rappeutumiskokouksesta ja konjugaatin kiertoliikkeestä.¹⁵ Biotinyloidulle BSA:lle herkkyysarvo oli 2–20 nmol/l ja variaatiokertoimeksi kaikilla mitatuilla konsentraatioilla biotinyloitua BSA:ta saatiin alle 1 %, mikä osoittaa hyvää toistettavuutta.⁹ Määritys on kuitenkin herkkä steerisen esteen vaikutukselle^{4,9}, joten oikeellisen tuloksen takaamiseksi tulisi käyttää biotinyloitua proteiinia, jossa proteiinin ja biotiinin välillä on välikappale steerisen esteen vähentämiseksi.⁹ Rao et al.⁴ kritisoi biotiinin käyttämistä standardina tässä määrityksessä, sillä se voi indusoida erilaisen fluoresenssisignaalin kuin biotinyloitu proteiini.

5.4 KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIAA HYÖDYNTÄVÄ MÄÄRITYS

Myös HPLC:tä on voitu hyödyntää biotinylointiasteen määrittämisessä ja tässä kappaleessa esitetään määritykset, joista toisessa hyödynnetään absorbanssidetektointia ja toisessa fluoresenssidetektointia.

5.4.1 Absorbanssidetektointi

Smith et al.:in²¹ määrityksessä hyödynnettiin HPLC:tä, johon oli kytketty hydrolyysiderivoija. Tämä määritys toimii kuitenkin vain sellaisilla biotinyloituilla yhdisteillä, joissa biotiinin ja proteiinin tai peptidin välissä on 6-aminoheksaanihappo-

välikkappale, sillä analyysi perustuu 6-aminoheksaanihapon johdannaisten fenyylitiokabamyylien kvantitoimiseen. Määrittämisessä tehdään täten ensin happohydrolyysi, sitten muodostetaan fenyylitiokarbamyyli-johdannainen ja lopuksi suoritetaan käänteisfaasi-HPLC-mittaus (RP-HPLC).

Määrittämisessä voidaan mitata matalia jopa pikomolaarisuuruista määriä biotinyloituja yhdisteitä. Määrittämisessä etuna on myös se, että samassa mittauksessa saadaan kvantitatiivisesti sekä biotiinin että proteiinin tai peptidin määrät. Happohydrolyysi ei lisäksi vaikuttanut 6-aminoheksaanihappoon, sillä sen retentioaika oli sama ennen hydrolyysiä ja sen jälkeen. Määrittämisessä käytettävyyttä rajoittaa kuitenkin se, että se toimii vain sellaisilla yhdisteillä, joissa on 6-aminoheksaanihappo-välikkappale. HPLC-menetelmä myös hukkaa yleensä jonkin verran materiaalia.²¹

5.4.2 Fluoresenssidetektointi

Tässä määrittämisessä biotinyloidulle proteiinille (HRP, BSA ja alkalinen fosfataasi) tehtiin proteolyysi proteinaasi K:n avulla tai happohydrolyysi, jolloin biotiini saatiin irrotettua biotinyloidusta proteiinista. Seuraavaksi irronnut biotiini eristettiin RP-HPLC:n avulla. HPLC:stä tulleeseen effluenttiinvirtaan sekoitettiin reagenssivirran avulla fluoreseiini-isotiosyanaatilla (FITC) leimattua streptavidiniä, jonka fluoresenssi vahvistuu, kun biotiini sitoutuu siihen. Kolonnin jälkeisessä detektoinnissa hyödynnettiin fluoresenssia mittaavaa sitoutumismäärittäystä.⁴ Tässä määrittämisessä biotinyloidun yhdisteen täydellinen hajottaminen on välttämätöntä, sillä vapaa biotiini ja biotinyloidut peptidit tehostavat fluoresenssia eri tavalla.³⁷ Biotinyloimattomat aminohapot eivät kuitenkaan tehosta streptavidini-FITC:n fluoresenssia.⁴

Rao et al.:in⁴ määrittämisessä etuna on matala havaitsemisraja, mikä pienentää määrittämisessä tarvittavan biotinyloidun proteiinin määrää. Tällä määrittämisellä määritetyt biotinylointiaisteet olivat lisäksi suurempia kuin HABA-määrittämisellä mitatut, sillä toisin kuin HABA-määrittämisessä, tämä määrittäminen perustuu biotinyloidusta konjugaatista irronneiden biotiinien mittaamiseen, jolloin steeriset esteet eivät vääristä tuloksia. Lisäksi happohydrolyysin avulla saatiin irrotettua kaikki biotinyloituihin proteiineihin sitoutunut biotiini. Fluoresenssidetektointia käyttävällä HPLC-määrittämisellä on myös selkeästi alhaisempi toteamisraja (LOD) kuin absorbanssidetektointia hyödyntävällä (taulukko 1). Määrittämisessä heikkoutena on kuitenkin se, että happohydrolyysin kestää 18–24 tuntia, mikä hidastaa määrittämisessä suorittamista.

5.5 MASSASPEKTROMETRIAA HYÖDYNTÄVÄ MÄÄRITYS

Myös massaspektrometriaa on hyödynnetty biotinylointiasteen määrittämisessä. Ionisaatiotekniikoista esimerkiksi matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio (MALDI)^{2,5,38,39}, nopea atomipommitus (FAB)²¹, sähkösumutus-ionisaatio (ESI)^{11,39} ja pinta-avusteinen laser-desorptio-ionisaatio (SELDI)³⁴ ovat osoittautuneet toimiviksi ja biotinylointiaste on voitu määrittää, kun on verrattu proteiinin massaa ennen ja jälkeen biotinyloinnin.¹⁰ Nestekromatografia-ESI-MS- eli LC-ESI-MS-tekniikkaa hyödyntämällä biotinylointiaste on toisaalta voitu määrittää pääpiikin avulla.³⁹

Massaspektrometriaan perustuvan määrittämisen etuna on se, että sen avulla voidaan analysoida näytteen koostumus eli näytteessä olevat eri biotinylointiasteiset biotinyloidut johdannaiset ja niiden suhteelliset määrät. Se on myös helppo ja nopea suorittaa.⁵ Proteiinin koko ja heterogeenisyys kuitenkin rajoittavat määrittämisen käyttöä ja kustannukset ovat myös korkeat.^{10,40} Lisäksi esimerkiksi MALDI-MS hyödyntäminen vaatii, että näytettä esikäsitellään paljon ennen määrittämistä.³⁴ MALDI-MS myös yliarvioi johdannaisen määrän, mikä johtuu ilmeisesti addukteista kuten alkalimetalleista tai pienistä molekyyleistä. LC-ESI-MS on tarkempi kuin MALDI-MS, sillä jopa 7 massayksikön muutoksia voidaan mitata sen avulla.^{11,39} Lisäksi ESI-MS:ssä ionisaatio on pehmeä, joten fragmentaatiota tapahtuu vain vähän tai ei yhtään.¹¹ SELDI- lentoaika- eli SELDI-TOF-menetelmän etuna on taas se, että biotiinia ei tarvitse irrottaa biotinyloidusta molekyylistä. Lisäksi se on nopea, tarkka ja yksinkertainen suorittaa. Kultaproteiinin sirua (Ciperghen) käyttämällä ei myöskään tarvitse poistaa edes reagoimatonta tai inaktiivista biotinylointiasteita, mikä edelleen nopeuttaa määrittämisen suorittamista.³⁴ Täten vaikka MALDI-MS onkin toimiva menetelmä, sen sijaan kannattaisi kuitenkin suosia esimerkiksi ESI-MS- tai SELDI-TOF-menetelmiä.

5.6 MÄÄRITYS, JOKA HYÖDYNTÄÄ BIOTIININ KYKYÄ SAMMUTTAA (STREPT)AVIDIININ LUONNOLLINEN FLUORESENSSI

Der-Balian et al.:in⁴¹ kehittämän määrittämismenetelmän avulla voidaan määrittää biotinyloidun proteiinin funktionaalisten biotiinien määrä. Tässä menetelmässä hyödynnettiin biotiinin kykyä sammuttaa avidiinin tai SA:n tryptofaaniryhmän fluoresenssia.^{41,42} Määrittäminen suoritettiin titraamalla SA:ta sisältävää Bisfenoli S -liuosta

biotiniiliuoksella ja mittaamalla fluoresenssi aina lisäyksen jälkeen. Biotiinia lisäämällä 40 % SA:n fluoresenssista saatiin sammutettua.⁴¹

Kun vastaava mittaus tehdään siten, että biotiinin tilalla on biotinyloitu proteiini, niin proteiinin luontainen fluoresenssi pitäisi tuntea, sillä se saattaa nostaa kokonaisfluoresenssia. Der-Balian et al.⁴¹ suorittivat vastaavanlaisen titrauksen siten, että titranttina oli vapaa biotiini ja SA:ta, johon oli lisätty biotinyloitua proteiinia, titrattiin. Tämän titrauksen avulla voidaan määrittää niiden sitoutumispaikkojen määrä, joihin biotiini ei ole tarttunut biotinyloidussa proteiinissa. Kun tätä verrataan siihen määrään biotiinia, joka tarvitaan, jotta saavutetaan käännekohta, kun biotinyloitua proteiinia ei ole läsnä, niin proteiinin biotinyloitumisaste voidaan määrittää, kun tiedetään vapaan biotiinin pitoisuus ja biotinyloidun proteiinin määrä.⁴¹

Rao et al.:in⁴ mukaan vaikka tämä määrittäminen onkin yksinkertainen, herkkä ja toistettava, se on steerisesti hyvin estynyt, minkä takia se aliarvioi biotinylointiasteen suuruuden. Der-Balian et al.:in⁴¹ mukaan steerinen este ei kuitenkaan haittaa määrittämistä, sillä tärkeintä on tietää funktionaalisten biotiinien määrä, joka kertoo suoraan sen, että kuinka hyvin biotinyloidun proteiinin voidaan olettaa toimivan immunomäärittämisessä.⁴¹ Näin ollen menetelmä sopii parhaiten juuri funktionaalisten biotiinien määrittämiseen.

5.7 ELEKTROFOREETTINEN LIIKKUVUUSSIIRTYMÄMÄÄRITYS

Tässä määrittämisessä hyödynnettiin elektroforeettista liikkuvuussiirtymämäärittämistä (EMSA). Tutkimuksen kohteena oli biotinyloitu RNA (Bio-RNA), jonka hidastamisessa käytettiin SA:ta denaturoimattomalla polyakryyliamidigeelillä. Muodostettuja SA-Bio-RNA-komplekseja detektoitiin hopeavärjäyksen avulla. Hopeavärjäyksen etuna on se, että luonnollisia nukleiinihappoja ei tarvitse leimata ja lisäksi biotinylointiaste voidaan arvioida jopa silmämääräisesti. Menetelmä toimii kuitenkin vain matalan biotinylointiasteen näytteillä, joissa on nukleiinihappo. Mikäli halutaan parantaa määrittäksen tarkkuutta, voidaan hyödyntää radioaktiivista leimaa, sillä hopeavärjäyksen intensiteetti ei kasva lineaarisesti värjättyjen nukleiinihappojen pitoisuuden kanssa.

Ennen kuin biotinyloidut näytteet siirrettiin denaturoimattomille geeleille, niitä inkuboitiin SA-ylimäärän kanssa. Näin ollen sitoutuneen SA:n määrä vastaa sitoutuneiden biotiinien määrää. SA:n tulisi muuttaa Bio-RNA:n elektroforeettista liikkuvuutta sen verran, että voidaan erottaa biotinyloidut RNA-molekyylit toisistaan

niihin sitoutuneiden biotiinien mukaan. Määrityksen avulla pystyttiin oletettavasti erottamaan Bio-RNA:t, joissa oli 0–3 biotiinia. SA ei osoittanut ei-spesifistä sitoutumista nukleiinihappoihin näissä olosuhteissa, sillä ei-biotinyloidun RNA:n elektroforeettinen liikkuvuus ei muuttunut, kun niitä inkuboitii ja elektroforesoitii SA:n kanssa. Avidiini taas sitoutui epäspesifisesti jopa denaturoidulla geelillä.⁴³

Määritys ei vaikuta parhaalta mahdolliselta vaihtoehdolta biotinylointiasteen määrittämiseen, sillä silmämääräiseen arviointiin perustuva menetelmä ei ole erityisen tarkka. Vaikka radioaktiivisen leiman avulla voitaisiin parantaa herkkyyttä, sen hyödyntäminen on kuitenkin hankalaa kuten kappaleessa 4.1 mainittiin. Määrityksen heikkoutena on myös se, että sen avulla pystytään mittaamaan biotinyloituja yhdisteitä, joissa on maksimissaan 3 biotiinia.

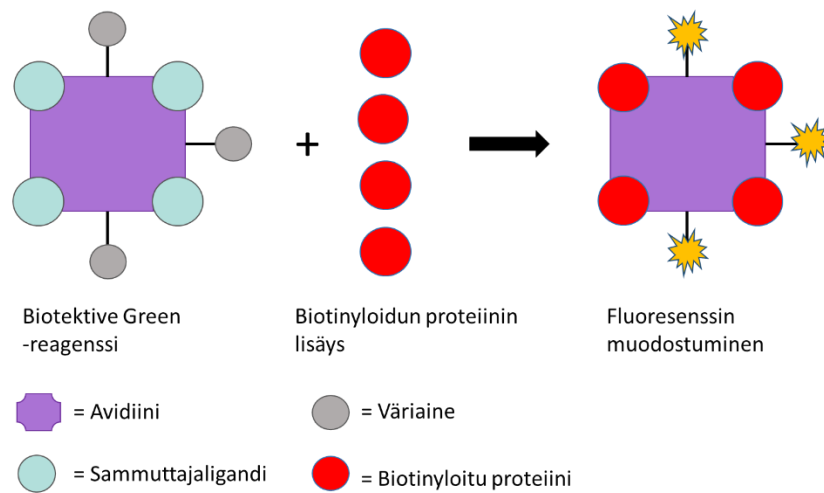
5.8 BIOTEKTIVE GREEN -REAGENSIA HYÖDYNTÄVÄ MÄÄRITYS

Sekä Batchelor et al.:in² että Thermo Fisher Scientific:in²⁴ määrityksessä hyödynnettiin Biotektive Green -reagenssia. Tämä reagenssi muodostuu avidiinista, joka on leimattu fluoresoivalla väriaineella ja sammuttajaligandeilla, jotka ovat kiinnittyneet biotiinia sitoviin kohtiin. Sammuttajaligandit sammuttavat väriaineen fluoresenssin resonanssienergian siirtymän avulla (kaavio 6). Batchelor et al.:in² määrityksessä väriaineena käytettiin Alexa Fluor[®] 488:ia ja sammuttajaligandina toimi HABA. Kun proteiiniin sitoutunut biotiini korvaa fluoresenssin sammuttavan väriaineen, se saa aikaa fluoresenssin, joka on verrannollinen lisätyn biotiinin määrään. Steerisen esteen vähentämiseksi, ennen määrittystä voidaan suorittaa lisävaihe, jossa biotinyloitu proteiini hajotetaan proteinaasin avulla. Tästäkin huolimatta Batchelor et al.:in² tulosten mukaan määrityksellä mitattu kokonaisbiotinylointiaste oli hieman alhaisempi kuin oletettu arvo. Syynä saattaa olla se, että biotiinjohdannaisilla on alempi affiniteetti Biotektive Green -reagenssiin kuin vapaalla biotiinilla. Täten vapaata biotiinia ei tulisi käyttää standardina.

Tällä menetelmällä voidaan määrittää sekä kokonaisbiotinylointiaste että funktionaalisten biotiinien määrä. Määrityksen etuina ovat myös nopeus, suuri suoritusteho ja herkkyys.² Lisäksi kun HABA-määritys vaatii noin 1 mg proteiininäytettä, niin tämä menetelmä vaatii minimissään 600 ng yksinkertaisesti biotinyloitua immunoglobuliini G:tä (IgG), jonka molekyylipaino on 150 000. Molekyyleille, joilla on

pienempi molekyylipaino tai joissa on enemmän biotiinia, vähempikin määrä näytettä riittää.²⁴

Vaikka tässä määrittäksessä käytetäänkin Biotektive Green -reagenssia, määrittäminen toimii hyvin pitkälti samalla tavalla kuin HABA-määrittäminen. Erona on vain se, että detektointi on tässä menetelmässä oletettavasti tarkempi kuin HABA-määrittäksessä, sillä HABA-määrittäksessä käytetään yleensä absorbanssia detektointissa.



Kaavio 7. Biotektive Green -reagenssin toimintaperiaate.²⁴

5.9 YHTEENVETO

Taulukkoon 1 on koottu tässä tutkielmassa mainittuja biotinylointiasteen määrittämenetelmiä ja niiden ominaisuuksia.

Taulukko 1. Yhteenveto kirjallisessa osiossa esitetyistä biotinylointiasteen määrittämenetelmistä. RNA: ribonukleiinihappo, HABA: 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo, ELISA: entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, RP-HPLC: käänteisfaasi-korkean erotuskyvyn nestekromatografia, ESI-MS: sähkösumutus-ionisaatio-massaspektrometria, SELDI-TOF-MS: pinta-avusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria, MALDI-TOF-MS: matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria, EMSA: elektroforeettinen liikkuvuussiirtymämääritys, Bio: biotiini, IgG: immunoglobuliini G ja LOD: toteamisraja.

Biotinyloitu yhdiste	Biotinyloidun yhdisteen hajottaminen	Menetelmä	Detektointi	Lineaarinen alue	Näytteen kulutus	LOD/pmol	Määrittäksen kesto	Viite
Proteiini		HABA	Absorbanssi			200 ²		33
Proteiini	Ei/Proteolyysi	HABA	Absorbanssi					22
Proteiini		HABA	Fluoresenssi	10–60 pmol biotiinia	750 ng Bio-IgG:tä		5 min	28
Proteiini		HABA	Absorbanssi	2–16 µM biotiinia			5 min	29
Proteiini	Ei/Proteolyysi	HABA	Absorbanssi	10–300 µM biotiinia		60	15 min	23
Proteiini		HABA	Absorbanssi	2–16 µM biotiinia			5 min	30

Proteiini		HABA	Absorbanssi	2–16 µM biotiinia			5 min	31
Proteiini	Proteolyysi	ELISA	Absorbanssi		1 µg Bio-proteiinia		5 h	12
Proteiini		ELISA	Fluoresenssi-polarisaatio		1–10 µg Bio-proteiinia			9
Proteiini/peptidi	Happo-hydrolyysi	RP-HPLC	Absorbanssi			1	1 h (hydrolyysi mukaan lukien)	21
Proteiini	Happo-hydrolyysi	RP-HPLC	Fluoresenssi			4×10^{-4}		4
Proteiini		ESI-MS	Massa					11
Proteiini/peptidi		SELDI-TOF-MS	Massa					34
Proteiini		MALDI-TOF-MS	Massa					5
Proteiini		Titraus	Fluoresenssi		1–10µg Bio-proteiinia			41
RNA		EMSA	Hopeavärjäys				yli 1 h	43
Proteiini		Biotektive Green -reagenssi	Fluoresenssi				5 min	2
Proteiini	Ei/Proteolyysi	Biotektive Green -reagenssi	Fluoresenssi		0,6 µg Bio-IgG:tä	4–80	5 min	24

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Huomioiden sen, että kuinka paljon biotinyloituja yhdisteitä hyödynnetään erilaisissa tutkimuksissa, proteiinien biotinylointiasteen määrittämiseen liittyviä tutkimusartikkeleita löytyy suhteellisen vähän. Lisäksi se, ettei monissa artikkeleissa mainittu määrittämisen LOD:ia, näytteenkulutusta tai määrittämisen kestoa, hankaloitti niiden vertaamista keskenään. Kaikkiaan kuitenkin vaikutti siltä, että kullakin määrittämismenetelmällä oli omat etunsa ja heikkoutensa. Siinä missä HABA- ja Biotektive Green -määrittämiset olivat helppoja ja nopeita suorittaa, ne kärsivät steerisistä esteistä eivätkä anna tarkinta tulosta välttämättä edes proteiiniin sitoutuneiden funktionaalisten biotiinien määrästä.⁴ Vaikka steeristä estettä onkin voitu vähentää välikappaleiden tai biotinyloidun proteiinin hajottamisen avulla, niin toisinaan nekin eivät välttämättä riittäneet mahdollisimman oikeellisen tuloksen määrittämiseksi. MS-tekniikat olivat ehdottomasti tarkimpia, sillä niiden avulla voidaan määrittää, jopa näytteen sisältämät eriasteisesti biotinyloituneet proteiinit sekä niiden jakautuminen näytteessä. Toisaalta MS-menetelmässä tarvittavat laitteet ovat hyvin kalliita ja näytettä joudutaan mahdollisesti esikäsittelemään paljon ennen määrittämistä.

Ne määrittämiset, jotka perustuvat proteiiniin sitoutuneen biotiinin kykyyn sitoutua kovalenttisesti avidiiniin tai SA:han, määrittävät funktionaalisten eli sidokseen osallistuvien biotiinien määrän absoluuttisen kvantitatiivisen määrän sijaan. Täten ne yleensä aliarvioivat proteiiniin tai peptidiin sitoutuneen biotiinin määrän. Toisaalta, koska suurinta osaa biotinyloiduista yhdisteistä hyödynnetään juuri (strept)avidini-biotiini-systeemeissä, tämä on usein riittävä tieto.^{21,41,44} Täten kuten Batchelor et al.:kin² kirjoittaa artikkelissaan, ennen määrittämismenetelmän valintaa tärkeinä on tietää, että haluaako selvittää näytteen kokonaisbiotinylointiasteen vai riittääkö funktionaalisten biotiinien määrän tietäminen. Funktionaalisten biotiinien määrää mittaavat määrittämiset ovat keskimäärin paljon helpompi ja nopeampi suorittaa, sillä esimerkiksi biotinyloidun yhdisteen hajottaminen proteolyysin tai happohydrolyysin avulla vie useita tunteja.

Siinä missä kirjallisessa osiossa mainitut määrittämiset pyrkivät selvittämään joko funktionaalisten biotiinien määrän tai kuhunkin proteiiniin tai peptidiin kiinnittyneiden biotiinien lukumäärän, pro gradu -tutkielman kokeellisen osion määrittämisen tavoitteena oli selvittää, että kuinka moneen biotinyloituun vasta-aineeseen biotiini oli sitoutunut eli biotinylointisaanto. Kokeellisessa osiossa tavoitteena ei ollut löytää vaihtoehtoja

määritysmenetelmää, vaan optimoida käytössä oleva määrittäminen, jotta se toimisi mahdollisimman hyvin tutkitulla Bio-mAb:illa.

Määrittäminen taas suoritettiin siten, että tutkittavaa Bio-mAb-liuosta inkuboitiin ensin streptavidinilevyllä (SA-levy), jolloin biotinyloitu mAb sitoutuu SA:iin. Seuraavassa työvaiheessa SA-levyltä otettiin näyte, jonka tulisi sisältää ainoastaan biotinyloimatonta mAb:ia. Tälle näytteelle suoritettiin DELFIA-immunomäärittäminen, jolloin fluoresenssisignaalin avulla voitiin määrittää biotinyloimattoman mAb:in määrä ja sen avulla laskea biotinyloidun vasta-aineen määrä ja vastaavasti biotinylointisaanto.

KOKEELLINEN OSA

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tässä luvussa esitetään työssä käytetyt materiaalit ja tutkimusmenetelmät.

7.1 NÄYTTEET

Työssä käytettiin näytteinä sekä Bio-mAb:eja (taulukko 2) että mAb:ia.

Taulukko 2. Työssä käytetyt biotinyloidut monoklonaaliset vasta-aineet (Bio-mAb) sekä niiden biotinylointisaanto alkuperäisellä protokollalla mitattuna. Vasta-aineet on biotinyloitu Radiometer Turku Oy:ssä. mAb: monoklonaalinen vasta-aine, NT-proBNP: N-terminaalinen pro B-tyypin natriureettinen peptidi ja TnI: troponiini I.

Eränumero	mAb:n tunnistama antigeeni	Biotinylointisaanto (%)
KE7370	NT-proBNP	95
14791	TnI	94
KE7467	NT-proBNP	88
KE7406	NT-proBNP	83
KE7301	NT-proBNP	75
KE7259	NT-proBNP	68
KE7052	NT-proBNP	65
KE7017	NT-proBNP	46

7.2 REAGENSIT

Työssä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 3. Vesi puhdistettiin Milli-Q Direct 8 Water Purification System -laitteella (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Taulukko 3. Työssä käytetyt reagenssit. IgG: immunoglobuliini G.

Reagenssi	Valmistaja
Bio-mAb-puskuri	Radiometer Turku Oy
SA-irtokaivot	Radiometer Turku Oy
Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava levy	Wallac Oy
Kanissa tuotettu hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava Eu-N1-leimavasta-aine	PerkinElmer Inc.
Kanissa tuotettu hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava Eu-N1-leimavasta-aine	Kaivogen Oy
Kehitysliuos (Europium Fluorescence Intensifier)	Kaivogen Oy
Pesuliuoskonsentraatti 10x	Radiometer Turku Oy
Pesuliuoskonsentraatti 20x	Radiometer Turku Oy
500 mM TSA	Radiometer Turku Oy
Streptavidini	IBA GmbH

7.3 MENETELMÄT

Tässä kappaleessa esitellään tutkimuksessa käytetyt menetelmät.

7.3.1 Biotinylointisaannon määritysmenetelmä: alkuperäinen menetelmä

Työssä optimoitiin mikrotiitterilevyllä tehtävää menetelmää, jonka alkuperäinen protokolla on seuraava (kuva 3):

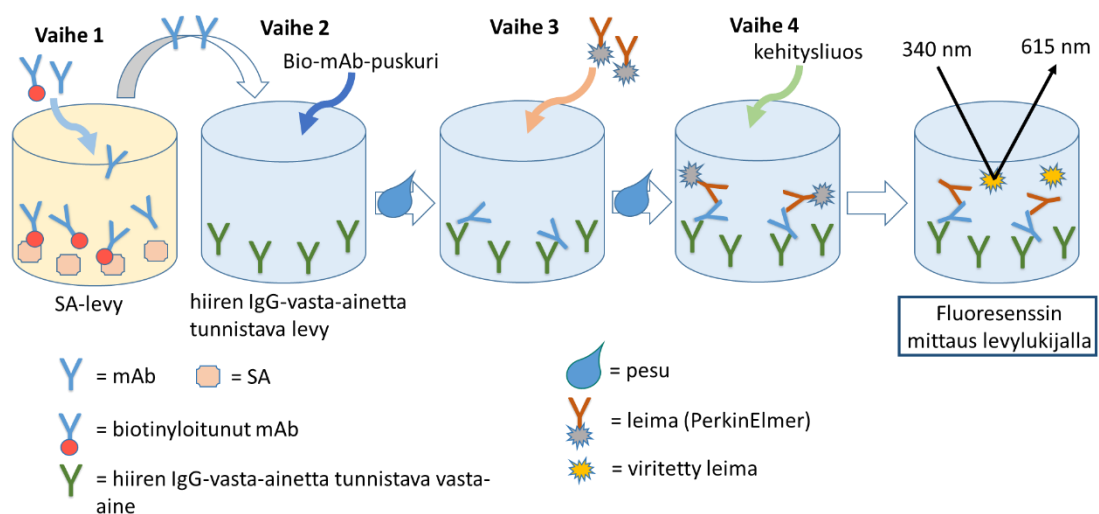
Vaihe 1: Bio-mAb-liuos laimennettiin konsentraatioon 0,50 tai 0,25 ng/μl Bio-mAb-puskurilla (näyte). SA:lla päällystetty 96-formaatin mikrotiitterilevy pestiin kaksi kertaa pesuliuoksella DELFIA-mikrotiitterilevypesurilla (ADIL Instruments, Strasbourg Schiltigheim, Ranska) ja sen jälkeen SA-levyn yhdeksään kuoppaan pipetoitiin 200 μl

laimennettua Bio-mAb:ia. Levyn annettiin inkuboitua kevyessä ravistelussa Wallac-levyravistelijassa (Wallac Oy, Suomi/Heidolph, Länsi-Saksa) huoneenlämmössä (RT) 1,0 tunnin ajan. Inkuboinnin aikana valmistettiin standardilaimennokset 0; 0,010; 0,050; 0,10 ja 0,20 ng/μl Bio-mAb-liuoksesta.

Vaihe 2: Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava levy pestiin kerran pesuliuksella. Inkuboinnin jälkeen siirrettiin 100 μl liuosta jokaisesta SA-levyn kuopasta hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavan levyn vastaavaan kuoppaan ja lisäksi pipetoitiin jokaista standardilaimennosta kolmeen tyhjään kuoppaan 100 μl. Kaikkiin kuoppiin lisättiin vielä 100 μl Bio-mAb-puskuria ja levyn annettiin inkuboitua kevyessä ravistelussa RT:ssä kaksi tuntia.

Vaihe 3: Ennen inkuboinnin päättymistä valmistettiin PerkinElmerin leimatusta vasta-aineesta eli leimasta (kanissa tuotettu hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava Eu-N1-leimavasta-aine) 0,50 ng/μl laimennos. Inkuboinnin päätyttyä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava levy pestiin kaksi kertaa pesuliuksella ja jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 200 μl leiman laimennosta, minkä jälkeen näytteitä inkuboitiin jälleen kaksi tuntia ravistelussa RT:ssä.

Vaihe 4: Inkuboinnin päätyttyä stripsit pestiin kuusi kertaa pesuliuksella ja niihin annosteltiin 200 μl kehitysluosta 1296-041 DELFIA® Plate Dispense -annostelijalla (Wallac Oy, Turku, Suomi). Tämän jälkeen inkuboitiin vielä 5 min ravistelussa RT:ssä ja tulokset mitattiin Victor™ X4 -levylukijalla (PerkinElmer, Singapore) Europium 1 s -protokollalla (taulukko 4).



Kuva 3. Biotinylointisaannon alkuperäinen määrittäminen menetelmä.

Taulukko 4. Levylukijan mittausparametrit.

Emissioaallonpituus	615 nm
Viritysaallonpituus	340 nm
Viive	400 μ s
Aikaikkuna	400 μ s

Tällä menetelmällä tutkittiin useita eri eriä N-terminaalisen pro B-tyypin natriureettisen peptidin (NT-proBNP) tunnistavia Bio-mAb:eja sekä yhtä erää troponiini I:tä (TnI) tunnistavaa Bio-mAb:a. Jokaisesta näytteestä ja standardista tehtiin kuitenkin useampi laimennos kuin alkuperäisessä menetelmässä. Tutkimukset suoritettiin tätä protokollaa mukaillen ja tehdyt optimoinnit ja muutokset mainitaan kunkin testin tai kuvan yhteydessä.

Lisäksi testattiin menetelmän modifikaatiota siten, että testi suoritettiin kokonaan SA-levyllä, jolloin immunomääritysvaihe jätettiin suorittamatta. Tässä modifikaatiossa testinäytteet ja standardit pipetoitiin suoraan SA-levylle ja niitä inkuboitiin 1 h. Inkuboinnin jälkeen SA-levy pestiin kaksi kertaa ja leima annosteltiin suoraan SA-levylle. Leiman lisäyksen jälkeen kuppeja inkuboitiin 2 h, ne pestiin ja niihin lisättiin kehitysliuos. Protokolla suoritettiin loppuun kuten alkuperäisessä menetelmässä.

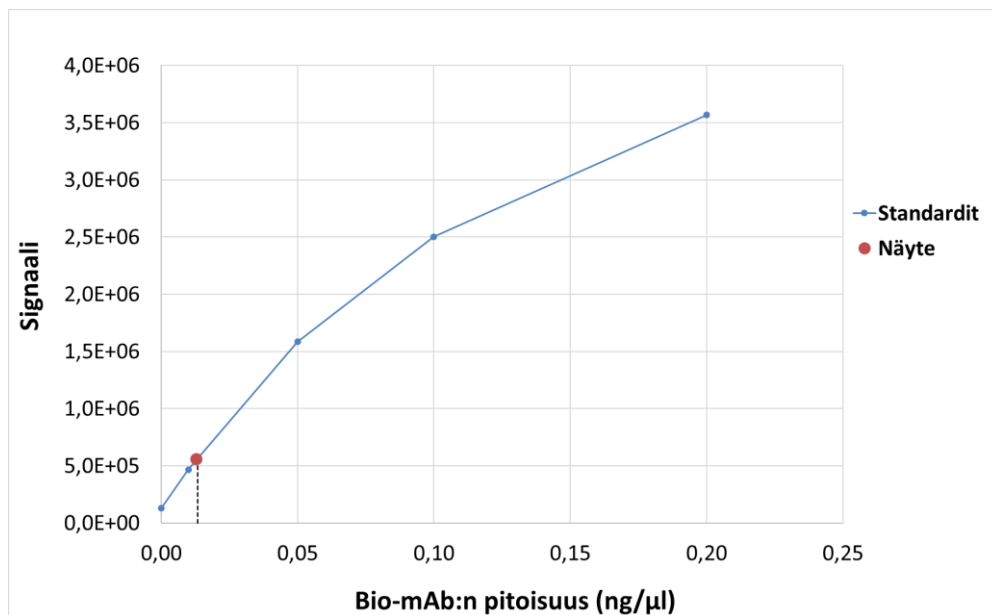
7.3.1.1 Biotinylointisaannon laskeminen

Biotinylointisaantoa laskettiin kahden lähimmän datapisteen avulla lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Näytteen sisältämän biotinyloitumattoman mAb:n pitoisuus saatiin näiden kahden datapisteen määrittämältä suoralta ja sen avulla laskettiin biotinylointisaanto.

Esimerkiksi Bio-mAb-liuoksesta laimennetulle näytteelle (Bio-mAb-erä KE7370), jossa analyyttiä oli 0,25 ng/ μ l ja standardilaimennoksille mitattiin alkuperäisellä protokollalla kuvan 4 mukaiset signaalit. Lineaarista interpolaatiota hyödyntäen piirretyn standardikäyrän ja näytteen signaalin leikkauspisteen avulla voidaan määrittää hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle siirtyneen noin 0,013

ng/μl biotinyloitumaton mAb:a. Täten Bio-mAb:n biotinylointisaannoksi voidaan laskea:

$$\begin{aligned} \text{Biotinylointisaanto} &= \frac{c(\text{biotinyloitunut mAb})}{c(\text{Bio-mAb})} \\ &= \frac{c(\text{Bio-mAb}) - c(\text{biotinyloitumaton mAb})}{c(\text{Bio-mAb})} \\ &= \frac{0,25 \text{ ng}/\mu\text{l} - 0,013 \text{ ng}/\mu\text{l}}{0,25 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 95 \% \end{aligned}$$



Kuva 4. Alkuperäisellä protokollalla mitattu näytteen signaali näytepitoisuudella 0,25 ng/μl ja standardilaimennosten signaalit Bio-mAb:n pitoisuuden funktiona.

7.3.2 Leima ja sen pitoisuuden optimointi

Tässä työvaiheessa testattiin leimaa eri pitoisuuksilla käyttäen standardina Bio-mAb-erää KE7370. Lisäksi testattiin toisen valmistajan vastaava leima.

7.3.2.1 PerkinElmerin leima

PerkinElmerin leimaa testattiin immunomääritystä (vaiheet 2–4) hyödyntäen seuraavasti: Kuutta standardikäyrää varten pipetoitiin kutakin Bio-mAb-laimennosta 0; 0,0025; 0,10 ja 0,40 ng/μl kolme rinnakkaista näytettä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levyille. Kahden tunnin inkubaation jälkeen lisättiin kullekin standardilaimennossarjalle leimaa

seuraavissa pitoisuuksissa: 0,031; 0,063; 0,13; 0,25; 0,50 ja 1,0 ng/ μ l. Loput vaiheet suoritettiin kuten alkuperäisessä protokollassa.

7.3.2.2 Kaivogen Oy:n leima

Kaivogen Oy:n leimaa testattiin tekemällä immunomääritys (vaiheet 2–4) kahdella eri leiman pitoisuudella: 0,50 ja 0,063 ng/ μ l. Vertailun vuoksi sama testi suoritettiin PerkinElmerin leimalla, jotta voitiin testata Kaivogen Oy:n leiman toimivuutta PerkinElmerin leimaan verrattuna. Tämän jälkeen optimoitiin Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus kuten kappaleessa 7.3.2.1.

7.3.3 Reaktiokinetiikan testaus

Näissä testeissä testattiin eri inkubaatioaikoja ja yritettiin nopeuttaa reaktiotasapainon saavuttamista.

7.3.3.1 Biotinyloituneen vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka streptavidinilevylle

Prosessin, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle vaiheessa 1 (kuva 3), kinetiikkaa tutkittiin mittaamalla Bio-mAb-erän KE7370 näytteiden signaalit kahdessa eri pitoisuudessa ja testaamalla inkubaatioaikoja aikavälillä 0,5–1,5 tuntia noin 15 minuutin välein. Tämän jälkeen suoritettiin testi, jossa testattiin Bio-mAb-erällä KE7259 inkubaatioaikoja 1 ja 2,5 h. Edellisen mittauksen jälkeen testattiin vielä Bio-mAb-erillä KE7370 ja KE7052 inkubaatioaikoja aikavälillä 1,3–3 tuntia noin 20 minuutin välein. Menetelmää tutkittiin myös inkuboimalla SA-levyä lämpötilassa 35 °C (inkubaattori: iEMS incubator/shaker (Thermo Fisher Scientific Oy, Finland)).

7.3.3.2 Biotinyloitumattoman vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle

Biotinyloitumattoman mAb:n sitoutumista hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle vaiheessa 2 (kuva 3) testattiin suorittamalla immunomääritys (vaiheet 2–4) ja mittaamalla signaali Bio-mAb-erästä KE7370 laimennetuille standardeille eri inkubaatioajoilla. Inkubaatioaikoja testattiin puolen tunnin välein aikavälillä 0,5–3 tuntia.

7.3.3.3 Leiman sitoutumisen kinetiikka biotinyloitumattomaan vasta-aineeseen

Leiman sitoutumista biotinyloitumattomaan mAb:iin vaiheessa 3 (kuva 3) tutkittiin suorittamalla immunomääritys (vaiheet 2–4) Bio-mAb-erästä KE7370 valmistetuille standardeille ja inkuboimalla niitä vaiheessa 3 puolen tunnin välein aikavälillä 0,5–3

tuntia. Lisäksi tehtiin testi, jossa myös suoritettiin immunomääritys standardeille, mutta 25 ng leimaa lisättiin tilavuudessa 50 tai 200 µl. Inkubaatioaika testattiin aikavälillä 0,5–2 tuntia puolen tunnin välein leiman tilavuudella 50 µl. Leiman tilavuudella 200 µl testattiin vain 2 tunnin inkubaatioaika.

7.3.4 Näytteiden ja reagenssien tilavuuksien optimointi

Määrityksen toimivuutta tutkittiin lisäämällä näyte SA-levylle pienemmässä tilavuudessa. Lisäksi testattiin erilaista protokollaa vaiheessa 2 ja Bio-mAb-puskurilisäyksen tarpeellisuutta.

7.3.4.1 *Streptavidinilevylle lisätyn näytteen tilavuus*

Tässä testissä vaiheessa 1 (kuva 3) SA-levylle lisättiin näyte tilavuuksissa 30–200 µl eri analyytin pitoisuuksilla. Aluksi testattiin Bio-mAb-erällä KE7370 näytetilavuudet 30, 50, 100 ja 200 µl ja vaiheen 1 inkubaatioajat 1 ja 2,5 h. Seuraavissa testeissä testattiin vielä tilavuudet 30 ja 50 µl vaiheen 1 inkubaatioajoilla 1–3 tai 0,5–3 h puolen tunnin välein. Lopuksi tehtiin vielä varmistustesti, jossa Bio-mAb-erien KE7370 ja KE7052 näytetilavuus oli 30 µl, analyyttiä oli näytteessä 0,10; 0,40 tai 1,5 ng/µl ja vaiheen 1 inkubaatioaika oli 0,17–3 h.

Kun Bio-mAb-liuosta pipetoitiin SA-levylle alle 200 µl tilavuus, näytteisiin lisättiin inkuboinnin jälkeen Bio-mAb-puskuria, jotta SA-levyllä olevan näytteen tilavuus olisi 200 µl ennen hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle siirtämistä. Tämän jälkeen SA-levyä ravisteltiin hetki ja vaiheet 2–4 suoritettiin kuten alkuperäisessä menetelmässä. Samalla testattiin myös protokollaa, jossa SA-levyltä pipetoitiin 100 µl:n sijaan 30 µl näytettä, joka siirrettiin hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle, johon oli lisätty 70 µl Bio-mAb-puskuria.

7.3.4.2 *Streptavidinilevyltä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle lisätyn näytteen tilavuus*

Tässä testattiin erilaista protokollaa vaiheessa 2 (kuva 3). Kaikkiaan yhdelletoista Bio-mAb-erästä KE7052 valmistetulle laimennokselle (pitoisuudet välillä 0,02–10 ng/µl) suoritettiin alkuperäisen menetelmän mukainen määrittäminen, mutta osalle näytteistä käytettiin erilaista protokollaa, kun ne siirrettiin hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle. Tässä protokollassa SA-levyltä pipetoitiin 100 µl:n sijaan vain 30 µl näytettä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle, johon oli valmiiksi lisätty 70 µl Bio-mAb-

puskuria. Täten lopputilavuus hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oli 100 µl. Loput vaiheet suoritettiin alkuperäisen menetelmän mukaisesti muutoksin, jotka mainitaan kunkin kuvan yhteydessä.

7.3.4.3 Vaiheessa 2 lisätty Bio-mAb-puskuri

Tässä kokeiltiin, että onko vaiheessa 2 (kuva 3) tapahtuvalla 100 µl Bio-mAb-puskurin lisäyksellä vaikutusta määrittelyn toimivuuteen. Määrittelyä testattiin Bio-mAb-erän KE7370 laimennoksille 0,53 ja 1,7 ng/µl.

7.3.4.4 Biotinyloidun vasta-aineen mittauspitoisuuden optimointi

Tässä testissä suoritettiin määrittely, mitattiin signaali ja määritettiin biotinylointisaanto neljälle Bio-mAb-erälle (KE7370, KE7467, KE7301 ja KE7052) yhdellätoista eri näytelaimennoksella pitoisuusvälillä 0,020–10 ng/µl. Bio-mAb-erällä KE7052 testattiin myös vastaavaa protokollaa kuin kappaleessa 7.3.4.2.

7.3.5 Tulosten analysointi biotinylointisaannon laskemiseksi

Tässä kokeessa määritettiin immunomäärittelyn (vaiheet 2–4) dynaaminen alue ja standardikäyrän muoto Kaivogen Oy:n leimaa käyttäen. Sen lisäksi tutkittiin määrittelyn tarkkuutta ja toistettavuutta eri näytereplikoiden määrällä.

7.3.5.1 Standardikäyrän sovitus ja standardien pitoisuudet

Tässä hyödynnettiin kohdassa 7.3.5 mainitussa testissä mitattuja standardeja. Bio-mAb-eristä tehtiin kaikkiaan neljätoista standardilaimennosta, joille suoritettiin immunomäärittely (vaiheet 2–4) ja mitattiin signaalit. Standardilaimennosten pitoisuudet olivat: 0; 0,00050; 0,00090; 0,0016; 0,0028; 0,0050; 0,0089; 0,016; 0,028; 0,050; 0,089; 0,16; 0,28 ja 0,50 ng/µl.

7.3.5.2 Näytereplikoiden määrä

Bio-mAb-erien KE7370 ja KE7052 kantaliuokset laimennettiin pitoisuuteen 1,5 ng/µl ja määrittely suoritettiin hyödyntäen vaiheessa 2 alkuperäistä ja kappaleen 7.3.4.2 mukaista protokollaa. Käyttäen tiettyjä valikoituja standardipitoisuuksia signaalit mitattiin kuudella replikalla. Tuloksia vertailtiin laskemalla keskivirheet eri replikoiden määrällä potenssifunktion $\ln(\text{signaali}) = a * \ln(\text{pitoisuus (ng/µl)}) + b$ esiintyvälle parametreille a ja b. Regressio tehtiin pienimmän neliösumman menetelmällä.

7.3.6 Streptavidiinilevyerien vertailu

Tässä testissä testattiin eri SA-levyerien vaikutusta määritettyyn biotinylointisaantoon. Kaksitoista eri SA-levyerää testattiin kolmella Bio-mAb-erän KE7370 laimennoksella, joiden pitoisuudet olivat 0,50; 1,5 ja 5,0 ng/μl. Näytteellä, jonka pitoisuus oli 1,5 ng/μl, testattiin myös vaiheessa 2 kohdan 7.3.4.2 mukaista protokollaa.

7.3.7 Streptavidiinin vaikutus mittaustuloksiin

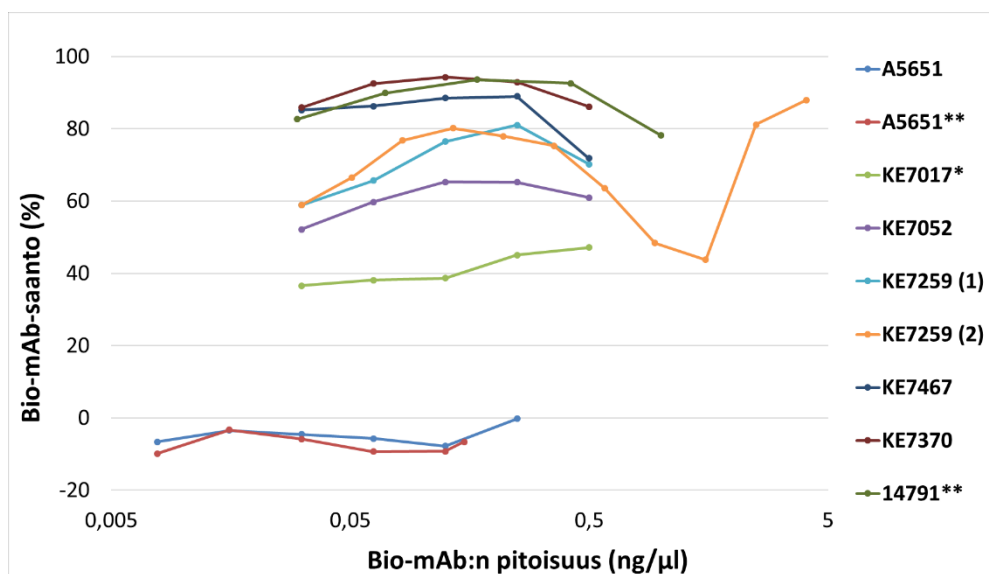
Mahdollisen SA-levyltä irtoavan SA:n vaikutusta mittaustuloksiin mitattiin kahden standardisarjan avulla, joissa oli Bio-mAb:a kuudessa eri pitoisuudessa: 0; 0,00050; 0,0028; 0,016; 0,089 ja 0,50 ng/μl. Ensimmäinen standardisarja mitattiin optimoidun protokollan mukaan, mutta toiseen standardisarjaan lisättiin 50 mM TSA:han liuotettua SA:a sen verran, että sen määrä oli molaarisesti 100-kertainen Bio-mAb:iin verrattuna.

8 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tässä kappaleessa tarkastellaan alkuperäisellä menetelmällä saatuja tuloksia sekä tutkitaan erilaisten parametrien optimoinnin vaikutusta määrittämiseen. Lopuksi tarkastellaan optimoidun menetelmän toimivuutta.

8.1 NÄYTELAIMENNOSTEN TESTAAMINEN

Alkuperäisellä menetelmällä tutkittiin viittä eri erää NT-proBNP-antigeenia tunnistavia Bio-mAb:eja, yhtä erää TnI-antigeenia tunnistavaa Bio-mAb:a ja yhtä erää biotinyloimatonta mAb:a. Kuvassa 5 on esitetty biotinylointisaanto Bio-mAb:n pitoisuuden funktiona. Kuvan 5 perusteella voidaan todeta, että näytteen pitoisuus vaikuttaa mitattuun biotinylointisaantoon. Tulosten perusteella ei voida kuitenkaan havaita mitään selkeää trendiä siitä, että miten biotinylointisaanto muuttuu eri näytelaimennoksilla. Määrittämisen toimivuuden parantamiseksi tulisi kuitenkin määrittää Bio-mAb:n pitoisuus tai pitoisuusalue, jolla voidaan mitata NT-proBNP-antigeenia tunnistaville Bio-mAb:eille mahdollisimman oikeellisia biotinylointisaantoja.



Kuva 5. Eri Bio-mAb-erillä mitattu biotinylointisaanto eri näytepitoisuuksilla. Biotinylointisaanto laskettiin lineaarisesta interpolaatiosta hyödyntäen. PerkinElmerin leiman pitoisuus oli 0,063, 0,13* tai 0,50 ng/μl**. Näytteen KE7259 mittaus toistettiin kerran (testit 1 ja 2).

Työssä testattiin myös määrittystä, joka tehtiin kokonaan SA-levyllä ilman immunomäärittysvaihetta, mutta tulokset eivät olleet toistettavia (liite 1, kuvat 44–48).

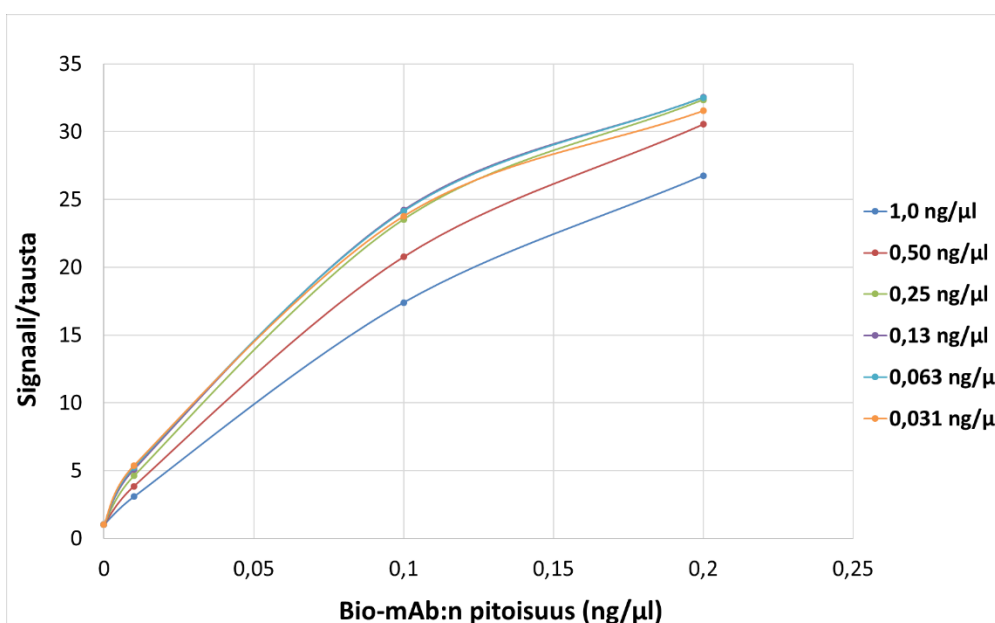
8.2 LEIMA JA SEN PITOISUUDEN OPTIMOINTI

Määrittys pyrittiin optimoimaan Bio-mAb:lle, jonka biotinylointiaste on korkea (80–100 %), sillä Radiometer Turku Oy:ssä Bio-mAb:ien biotinylointisaannot ovat keskimäärin korkeita. Täten määrittäksessä oltiin erityisesti kiinnostuneita mittaamaan matalia mAb-konsentraatioita, sillä korkean biotinylointiasteen Bio-mAb:sta siirtyy hyvin vähän mAb:a hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle. Tämä vaatisi mittaamenetelmän herkkyuden parantamista. Näin ollen testattiin, että millainen vaikutus leiman pitoisuudella olisi herkkyteen. Mikäli käytettävän leiman määrää pystyttäisiin vähentämään, siitä olisi myös taloudellista hyötyä.

8.2.1 PerkinElmerin leima

Tässä testissä tutkittiin PerkinElmerin leiman pitoisuuden vaikutusta immunomäärittäykseen (vaiheet 2–4) (kuva 6 ja liite 2, kuva 49). Kuvan 4 mukaan herkkyyttä voidaan parantaa vähentämällä leiman pitoisuutta, sillä signaali/tausta-suhde kasvoi erityisesti matalilla leiman pitoisuuksilla, mutta variaatiokerroin ei juurikaan muuttunut. Tulosten mukaan leiman pitoisuuden kannattaa kuitenkin olla vähintään 0,063

ng/ μ l. Tätä pienemmällä leiman pitoisuudella (0,031 ng/ μ l) herkkyys ei enää parane. Lisäksi hyvin pienet pitoisuudet ovat herkempiä taustasignaalin vaikutukselle ja erilaisille virheille esimerkiksi pipetoinnissa. Määrityksen herkkyyttä verrattiin alkuperäisellä leiman pitoisuudella 0,50 ng/ μ l ja pitoisuudella 0,063 ng/ μ l. Tulosten perusteella voidaan laskea, että leiman pitoisuudella 0,063 ng/ μ l pystytään mittaamaan biotinylointisaantoja, jotka ovat korkeintaan 98,2 % (signaali/tausta-suhde on 5). Alkuperäisellä leiman pitoisuudella vastaavasti voitaisiin mitata parhaimmillaan 97,8 %:n biotinylointisaantoja (signaali/tausta-suhde on 5). Vaikka muutos korkeimmassa mitattavassa biotinylointisaannossa oli hyvin vähäinen, jatkotutkimuksissa päädyttiin käyttämään leimaa pitoisuudessa 0,063 ng/ μ l.



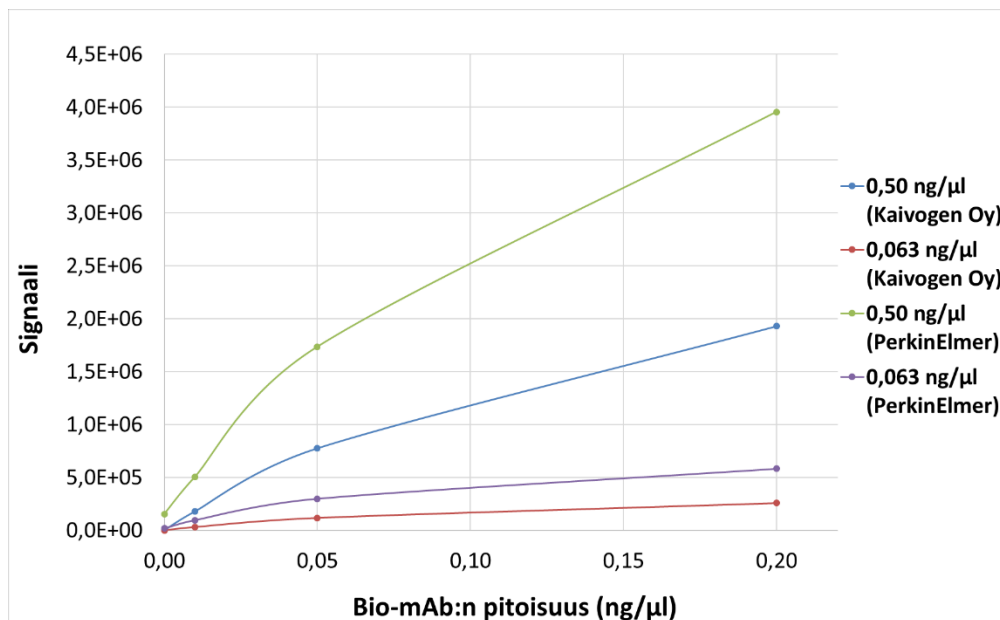
Kuva 6. Bio-mAb-pitoisuuden (KE7370) vaikutus mitattuun signaali/tausta-suhteeseen eri leimapitoisuuksilla (PerkinElmer).

Testeissä huomattiin myös, että PerkinElmerin leiman taustasignaali oli epätavallisen korkea, minkä arveltiin johtuvan siitä, että tuotteen valmistusprosessissa tehtävä puhdistus vapaan kelaatin poistamiseksi ei ole riittävä. Näin ollen päädyttiin testaamaan toisen valmistajan (Kaivogen Oy) vastaava leima, jota verrattiin PerkinElmerin leimaan.

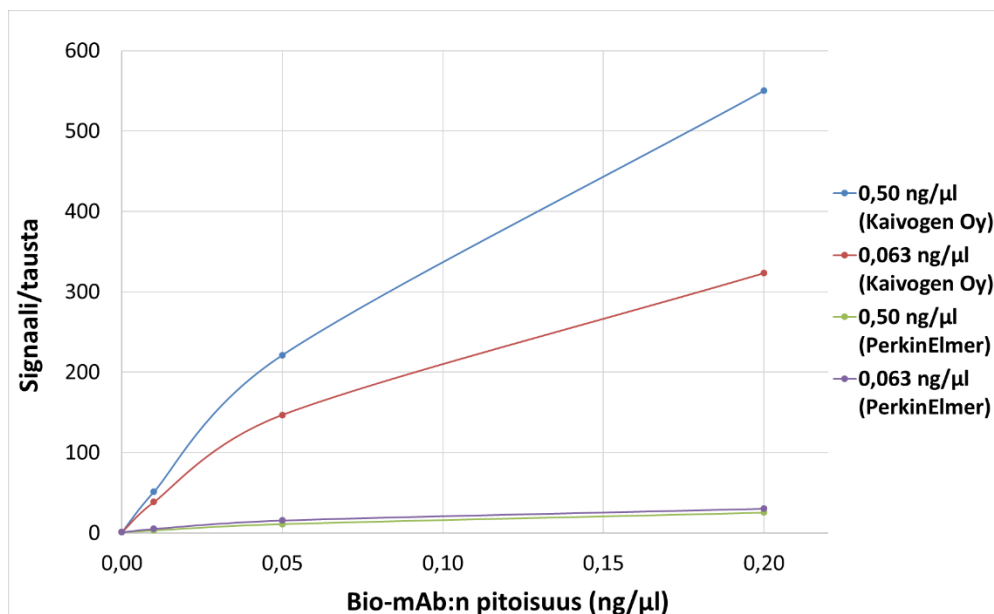
8.2.2 Kaivogen Oy:n leima

Toisen valmistajan leimaa testattiin, koska haluttiin selvittää, saavutettaisiinko sen avulla parempi herkkyys immunomäärityksessä, jolloin voitaisiin mitata korkeampia

biotinylointisaantoja tarkemmin. Kaivogen Oy:n leimaa tutkittiin PerkinElmerin leiman rinnalla mittaamalla Bio-mAb:sta KE7370 valmistetuille standardeille signaalit kahdella eri leiman pitoisuudella (kuva 7 ja 8). Tuloksista voitiin todeta, että PerkinElmerin leimaa käyttäen saadut signaalit standardin pitoisuudella 0 ng/μl ovat huomattavasti korkeammat kuin Kaivogen Oy:n leimalla saadut. Kun käytettiin PerkinElmerin leimaa, taustasignaali oli jopa 20 kertaa suurempi leiman pitoisuudella 0,063 ng/μl ja 40 kertaa suurempi pitoisuudella 0,50 ng/μl (kuva 7). Lisäksi signaali/tausta-suhteet olivat huomattavasti suuremmat Kaivogen Oy:n leimalla kuin PerkinElmerin (kuva 8), mikä parantaa immunomäärityksen herkkyyttä. Täten jatkotutkimuksissa päädyttiin käyttämään Kaivogen Oy:n leimaa.

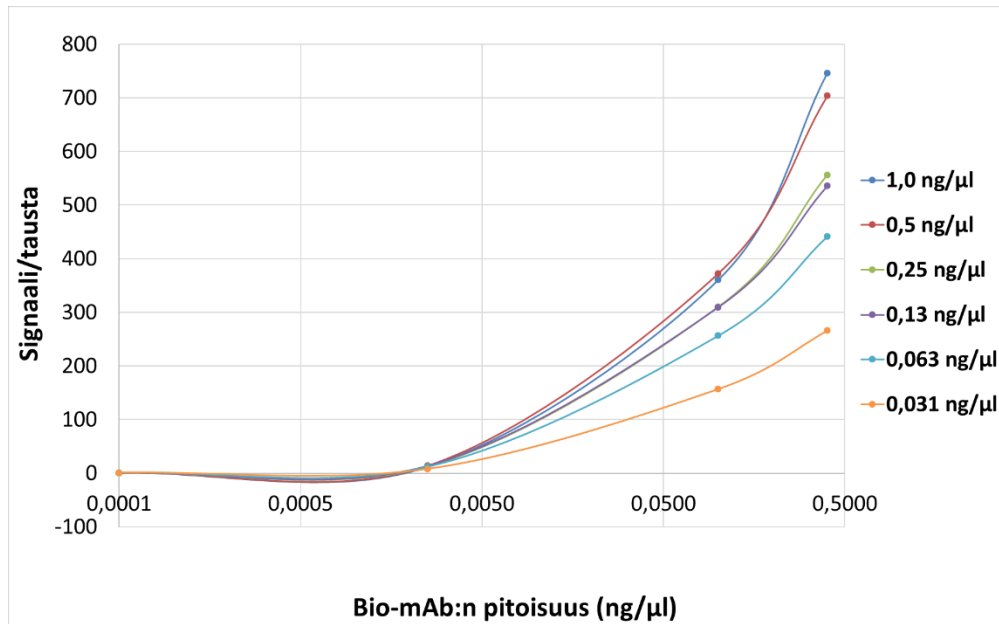


Kuva 7. Kahden eri valmistajan leimojen vertailu kahdessa eri leimapitoisuudessa.

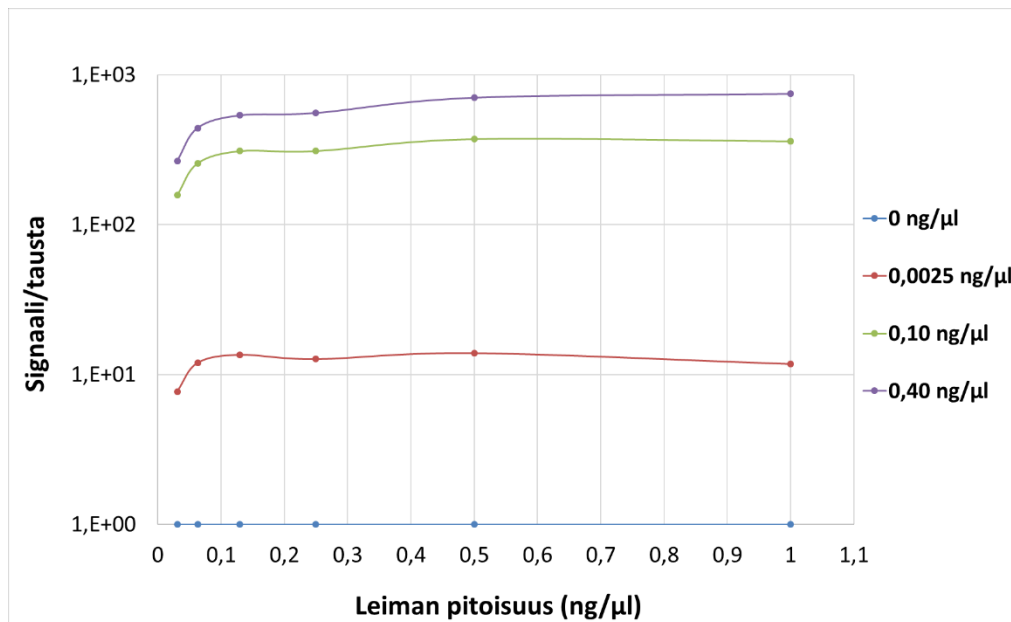


Kuva 8. Kahden eri valmistajan leimojen vertailu kahdessa eri leimapitoisuudessa.

Myös Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus optimoitiin. Mitattu signaali ja signaali/tausta-suhde Bio-mAb:n ja leiman funktiona on esitetty kuvissa 9 ja 10 sekä liitteen 2 kuvissa 50 ja 51. Oletettavasti immunomäärityksen dynaaminen alue kasvaa suurilla pitoisuuksilla, mutta kuitenkin jo pitoisuus 0,13 ng/μl riitti hyvään signaali/tausta-suhteeseen, joten taloudellisista syistä leiman pitoisuutta voitaisiin pienentää (kuva 9). Lisäksi kuvan 10 perusteella voidaan todeta, että immunomäärityksellä on paras herkkyys leiman pitoisuudella 0,13 ng/μl, sillä signaali/tausta-suhde on silloin suurimmillaan Bio-mAb:n pitoisuudella 0,0025 ng/μl. Pitoisuutta 0,0025 ng/μl suuremmilla Bio-mAb:n pitoisuuksilla signaali/tausta-suhde kasvaa hieman, kun leiman pitoisuutta kasvatetaan. Työssä oli kuitenkin tärkeämpää saavuttaa hyvä herkkyys immunomäärityksessä kuin laaja dynaaminen alue, jotta voidaan mitata mahdollisimman tarkasti pieniä pitoisuuksia biotinyloitumaton Bio-mAb:a. Täten leiman pitoisuus päädyttiin pienentämään pitoisuuteen 0,13 ng/μl. Vastaavalla tavalla kuin kappaleessa 8.2.1 voidaan laskea, että Kaivogen Oy:n leiman pitoisuudella 0,13 ng/μl pystytään mittaamaan biotinylointisaantoja, jotka ovat korkeimmillaan 99,9 % (signaali/tausta-suhde on 5).



Kuva 9. Bio-mAb-pitoisuuden (KE7370) vaikutus mitattuun signaali/tausta-suhteeseen eri leiman pitoisuuksilla (Kaivogen Oy).



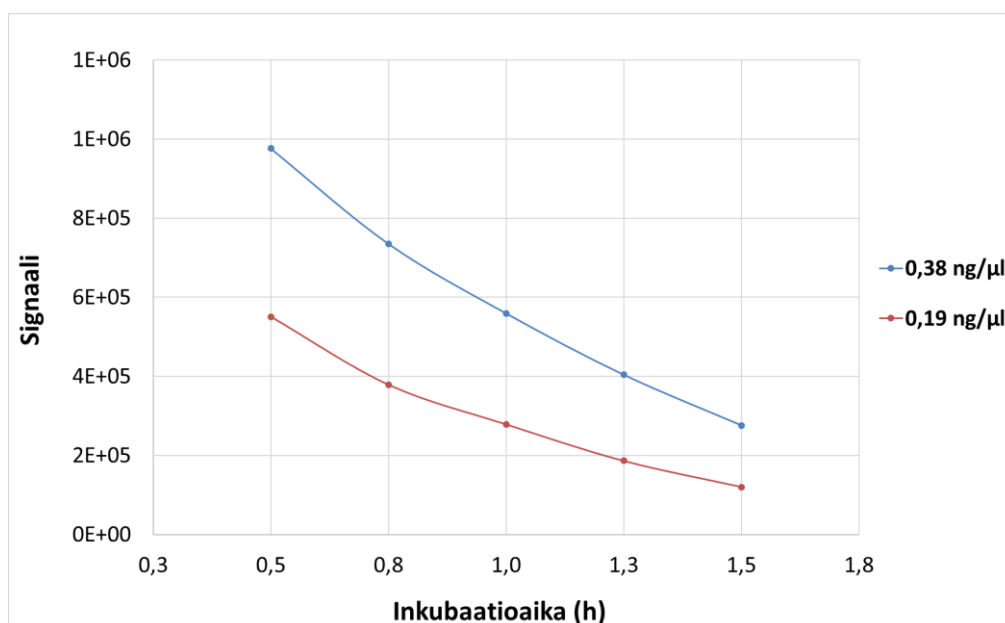
Kuva 10. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuuden vaikutus mitattuun signaali/tausta-suhteeseen eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370).

8.3 REAKTIOKINETIIKAN TESTAUS

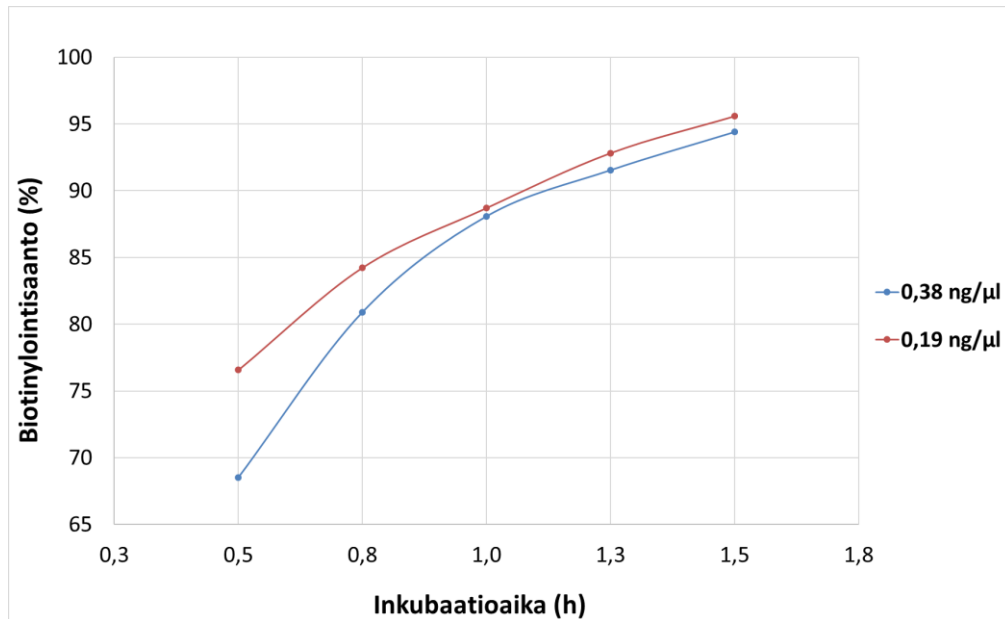
Tässä luvussa esitellään eri vaiheissa tehtyjen kinetiikkatestien tuloksia.

8.3.1 Biotinyloituneen vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka streptavidiinilevyille

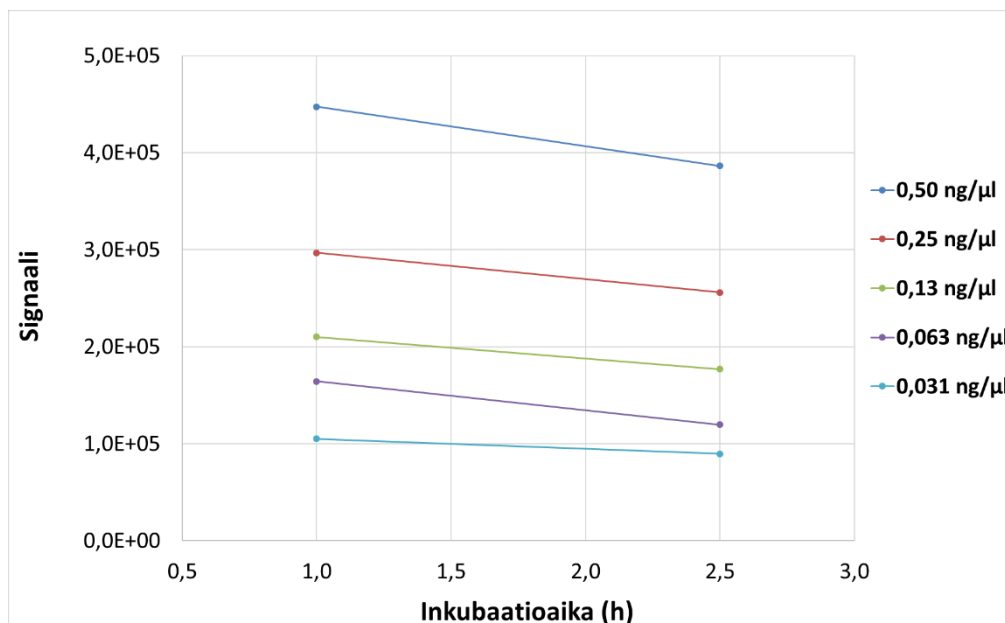
Vaiheessa 1 (kuva 3) SA-levylle sitoutuvan biotinyloituneen mAb:n kinetiikkaa tutkivassa testissä saatiin korkean biotinylointisaannon Bio-mAb-erälle KE7370 ja matalan biotinylointisaannon Bio-mAb-erälle KE7259 kuvien 11, 12, 13 ja 14 mukaiset tulokset. Kuvien 11 ja 13 perusteella voidaan todeta, että tunnin inkubaatio on liian lyhyt kummallakin Bio-mAb-erällä, sillä signaali laskee jyrkästi koko inkubaation ajan. Näin ollen reaktio ei ole vielä saavuttanut tasapainoa ja todellista biotinylointisaantoa ei voida myöskään määrittää (kuva 12 ja 14). Edellisten testien tulosten pohjalta tutkimusta jatkettiin testaamalla pidempiä inkubaatioaikoja samoilla Bio-mAb-erillä KE7073 ja KE7052. Tulokset on esitetty kuvissa 15, 16, 17 ja 18. Kuvien 15 ja 17 mukaan signaalit laskevat vielä kolmenkin tunnin inkubaation jälkeen ja täten reaktiotasapainoa ei ole saavutettu eikä tarkkaa biotinylointisaantoa voida määrittää (kuva 16 ja 18). 3 tuntia pidempi inkubaatio olisi kuitenkin määrittämisen kannalta epäkäytännöllinen, vaikka vaiheen 2 inkubaatio lyhennettäisiin 0,5 tuntiin. Signaaleissa voidaan myös havaita tapahtuvan jyrkkä lasku noin 2,5 tunnin jälkeen, eikä syytä tälle tiedetä.



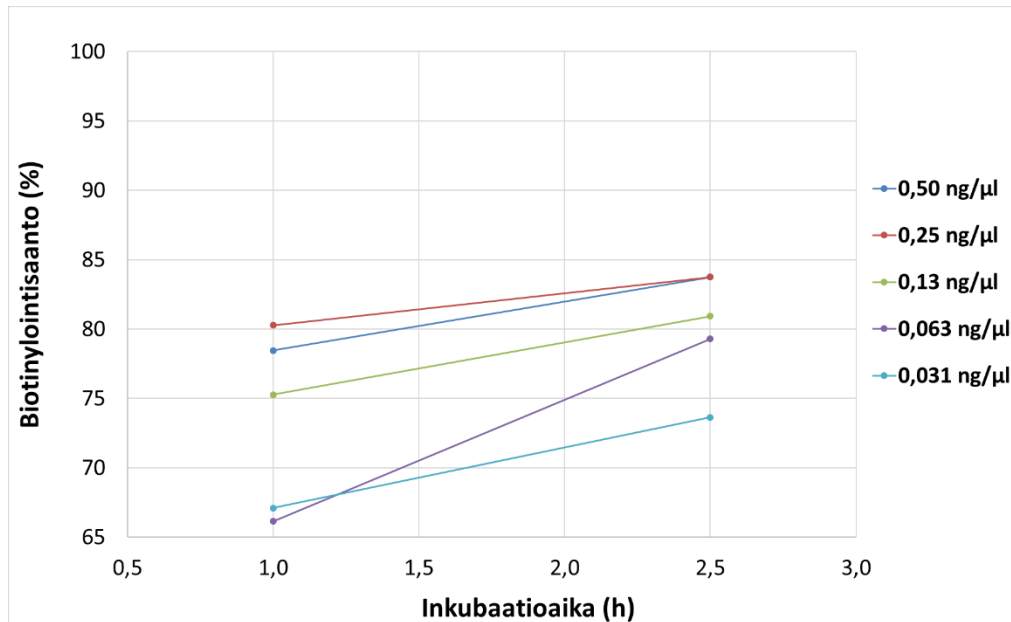
Kuva 11. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl.



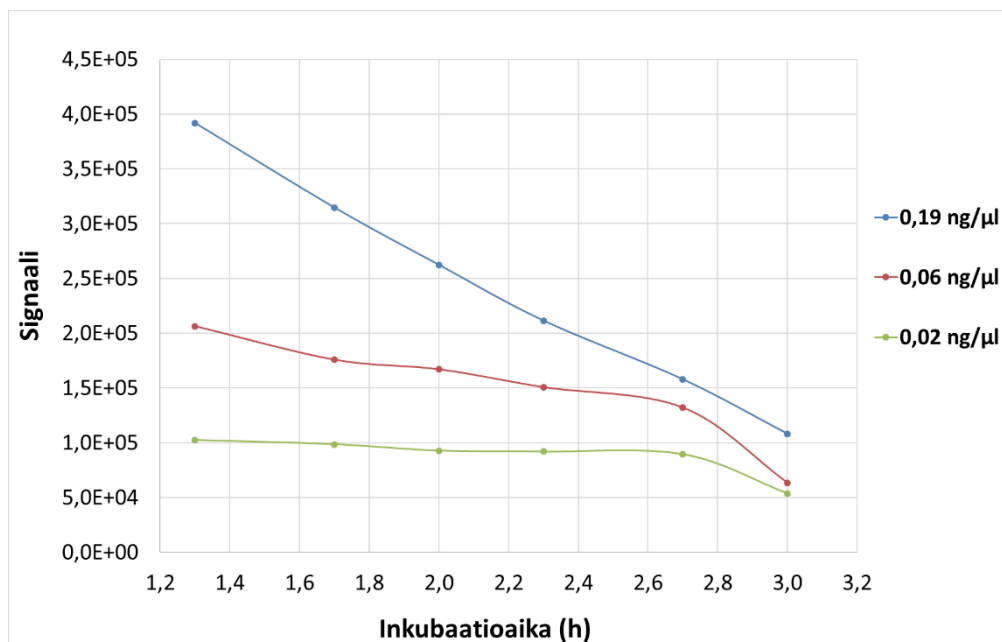
Kuva 12. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl.



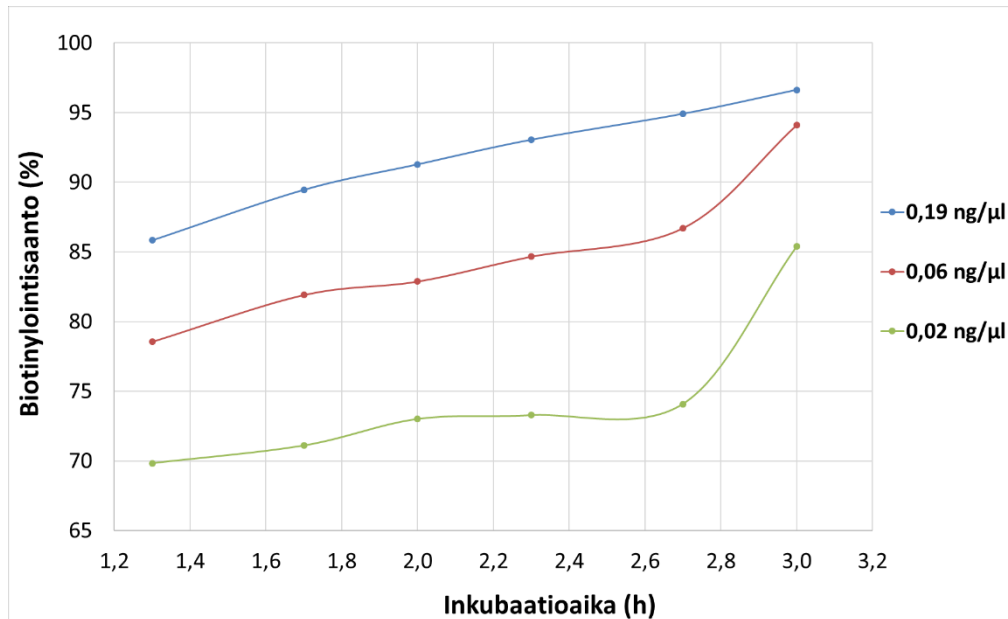
Kuva 13. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7259). PerkinElmerin leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl. Vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty tuntiin.



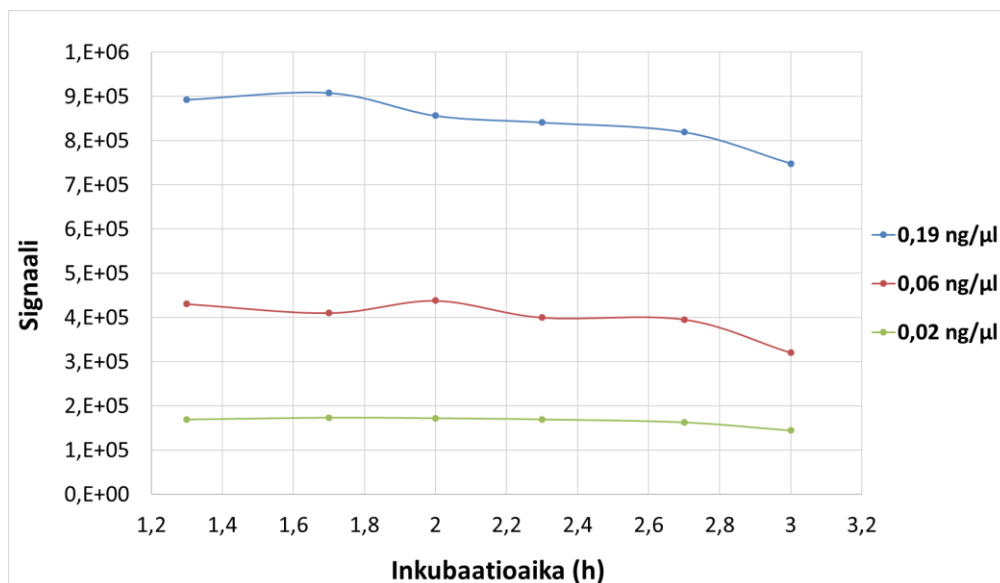
Kuva 14. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7259). Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. PerkinElmerin leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl. Vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty tuntiin.



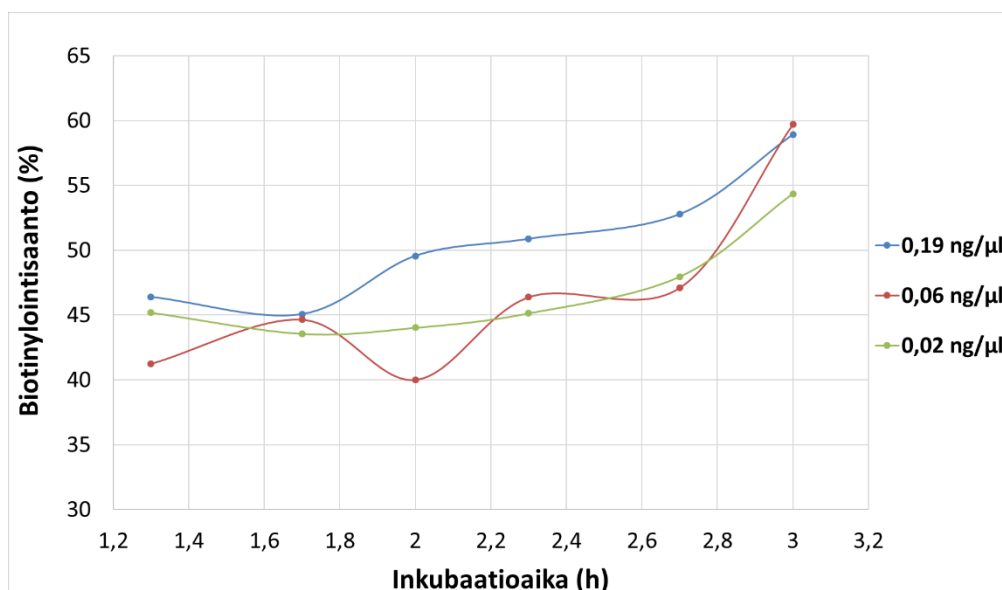
Kuva 15. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl. Vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.



Kuva 16. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.



Kuva 17. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7052). Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

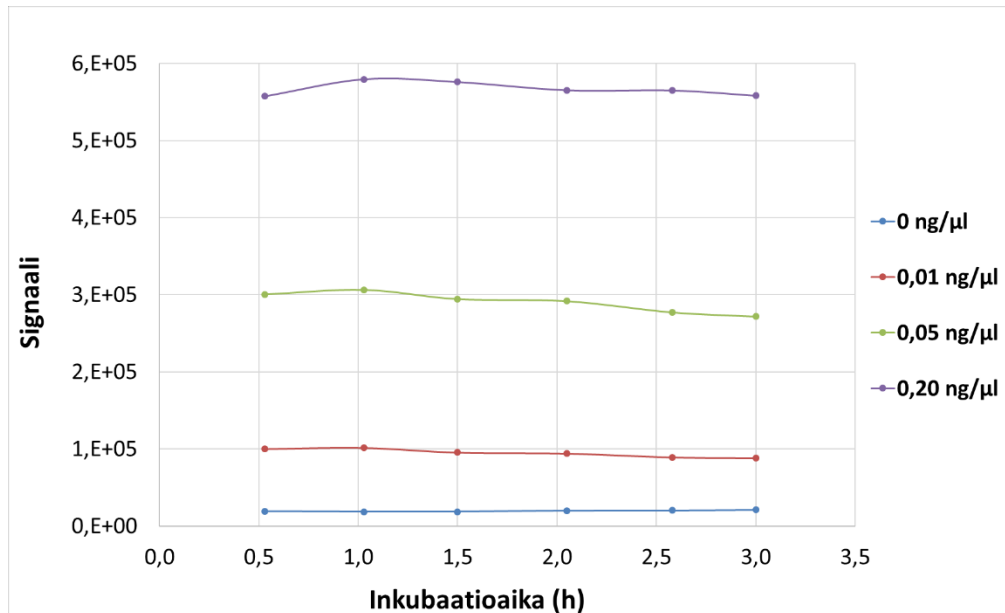


Kuva 18. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7052). Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

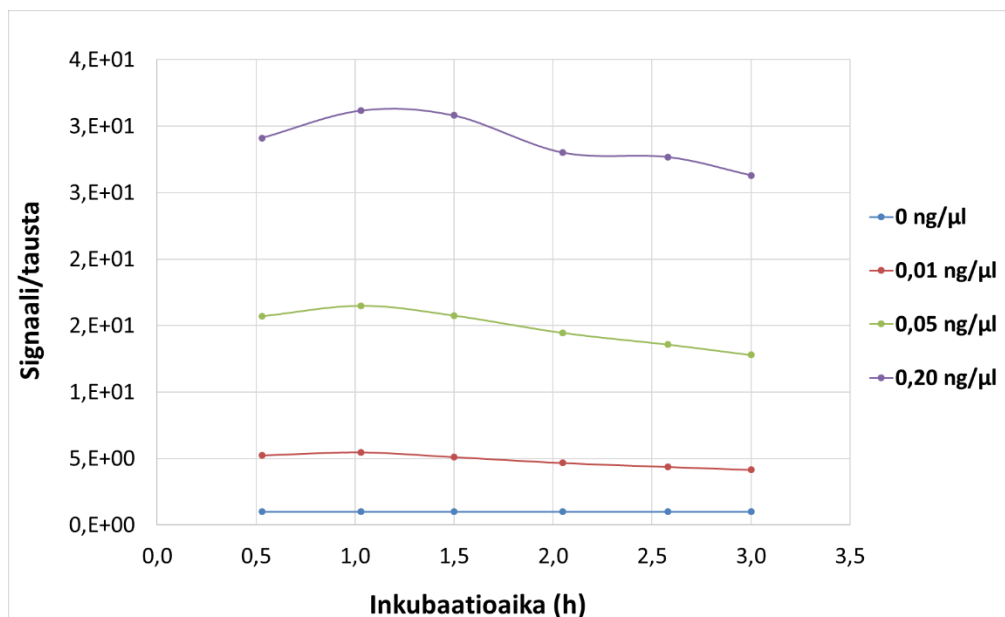
Reaktiotasapainon saavuttamista yritettiin nopeuttaa inkuboimalla SA-levyä lämpötilassa 35 °C, mutta se ei vaikuttanut juuri mitenkään reaktioon (liite 3, kuvat 52 ja 53). Täten inkubointi tehdään myös optimoidussa määrittelyssä huoneenlämmössä. Kaikkien tässä kappaleessa esitettyjen tulosten perusteella päädyttiin pidentämään vaiheen 1 inkubaatioaika 2,5 tuntiin.

8.3.2 Biotinyloitumattoman vasta-aineen sitoutumisen kinetiikka hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle

Tässä testissä tutkittiin vaiheessa 2 (kuva 3) biotinyloitumattoman mAb:n sitoutumista hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle ajan funktiona. Testin tarkoituksena oli optimoida inkubaatioaika, jotta saavutetaan mahdollisimman korkea signaali/taustasuhte ja siten mahdollisimman hyvä immunomäärityksen herkkyys. Mitatut signaalit ja signaali/taustasuhteet inkubaatioajan funktiona on esitetty kuvissa 19 ja 20. Kuvan 20 mukaan optimaalisin inkubaatioaika olisi lähempänä tuntia kuin alkuperäistä 2 tuntia, sillä tunnin inkubaation jälkeen signaali/taustasuhte oli suurimmillaan ja variaatiokerroin oli pieni. Inkubaatioaika päätettiin lyhentää 0,5 tuntiin, sillä jo 0,5 tunnin inkubaation jälkeen signaali/taustasuhte oli lähes yhtä korkea kuin tunnin inkubaation jälkeen.



Kuva 19. Vaiheen 2, jossa biotinyloitumaton mAb sitoutuu hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levyille, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). PerkinElmerin leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl.

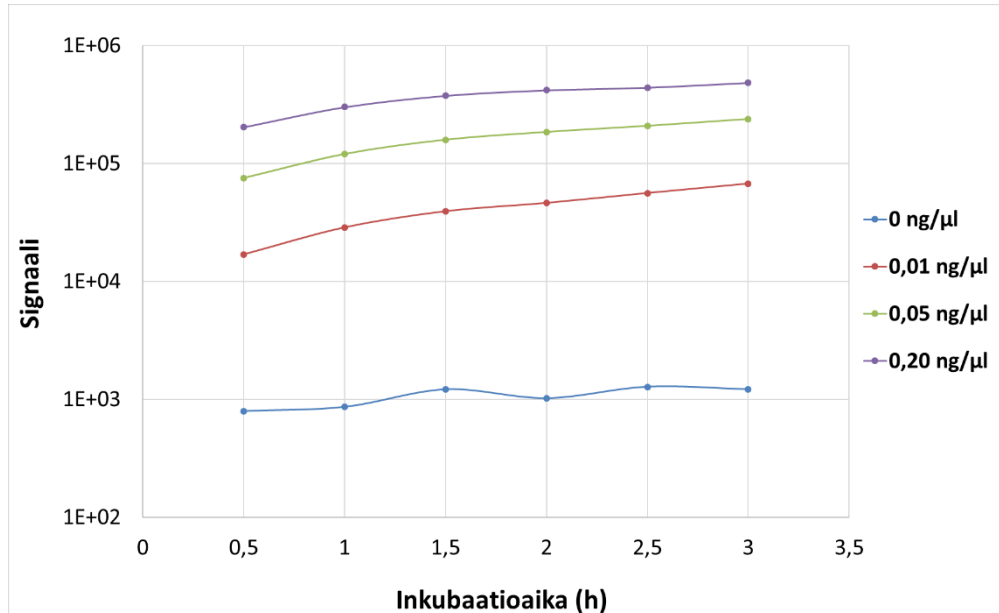


Kuva 20. Vaiheen 2, jossa biotinyloitumaton mAb sitoutuu hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levyille, inkubaatioajan vaikutus signaali/tausta-suhteeseen eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). PerkinElmerin leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl.

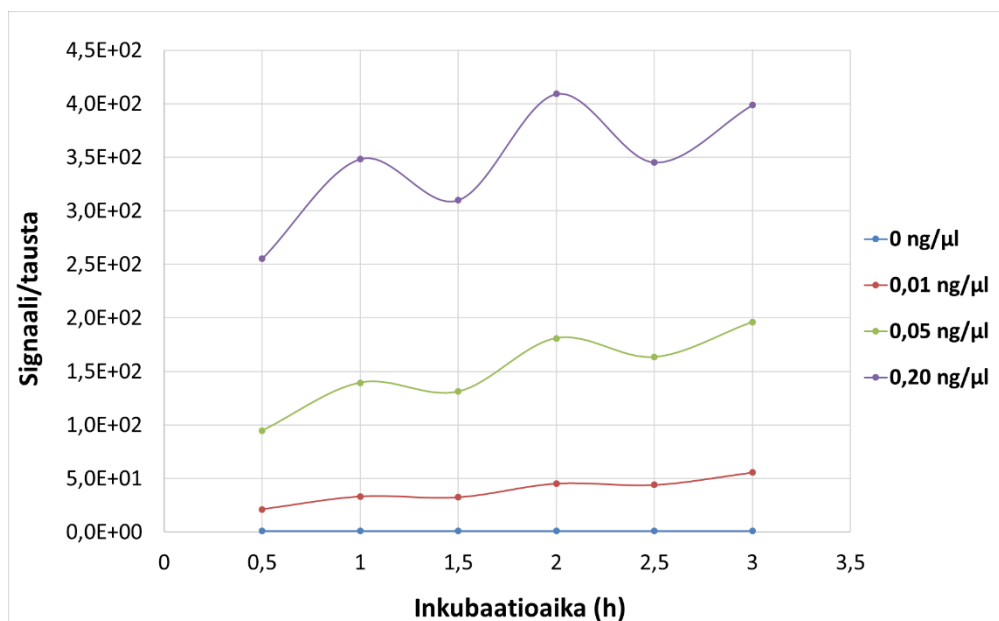
8.3.3 Leiman sitoutumisen kinetiikka biotinyloitumattomaan vasta-aineeseen

Signaali ajan funktiona leiman sitoutumisprosessille vaiheessa 3 (kuva 1) on esitetty kuvissa 21 ja 22. Kuvan 22 mukaan signaali/tausta-suhde on lähellä maksimia jo 2 tunnin

inkubaation jälkeen. Tätä pidempi inkubaatioaika pidentäisi testin kokonaiskestoa turhaan. Myöskään lyhyempi inkubaatioaika ei olisi suositeltava, sillä se taas huonontaisi signaali/tausta-suhdetta.

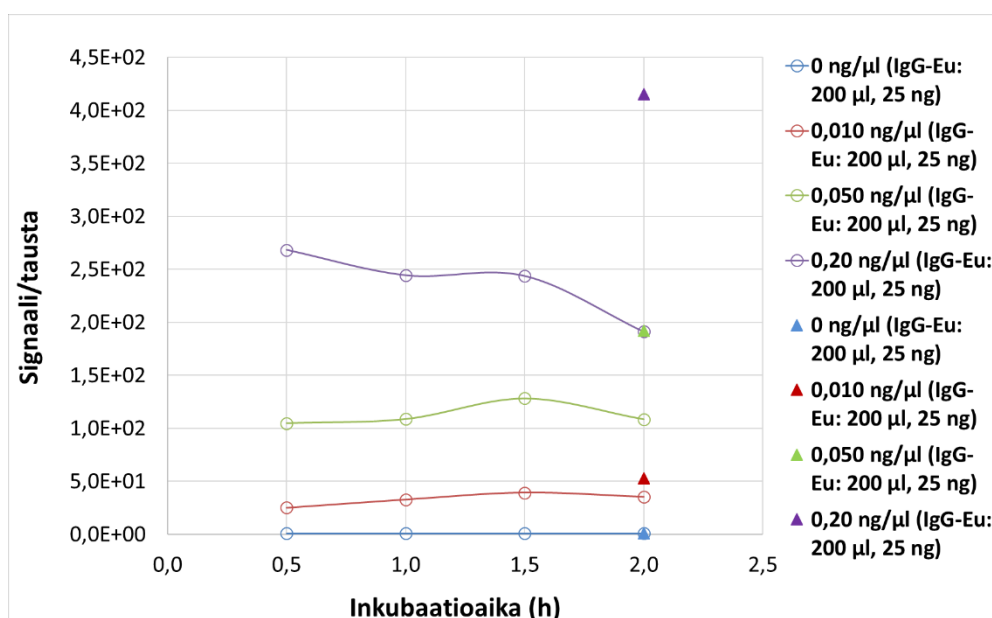


Kuva 21. Vaiheen 3, jossa leiman sitoutuu biotinyloitumattomaan mAb:iin, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.



Kuva 22. Vaiheen 3, jossa leiman sitoutuu biotinyloitumattomaan mAb:iin, inkubaatioajan vaikutus signaali/tausta-suhteeseen eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370). Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

Vaiheen 3 reaktiota kokeiltiin nopeuttaa lisäämällä leima pienemmässä tilavuudessa. 25 ng leimaa lisättiin 50 tai 200 μl tilavuudessa vastaten leiman pitoisuuksia 0,50 ja 0,13 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Tulokset on esitetty kuvassa 23 ja liitteen 3 kuvassa 54. Kuvan 23 mukaan 2 tunnin inkubaation jälkeen signaali/tausta-suhde on huomattavasti suurempi lisääessä leima 200 μl tilavuudessa 50 μl tilavuuteen verrattuna. Sen lisäksi eri inkubaatioajat eivät suuresti vaikuttaneet mitattuihin signaali/tausta-suhteisiin, kun näytteisiin lisättiin 50 μl leimaa pitoisuudessa 0,50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, joten määrittystä tullaan jatkamaan niin, että vaiheessa 3 inkuboidaan 2 tuntia ja kuoppiin lisätään 200 μl leimaa pitoisuudessa 0,13 $\text{ng}/\mu\text{l}$.



Kuva 23. Vaiheen 3, jossa leiman sitoutuu biotinyloitumattomaan mAb:iin, inkubaatioajan vaikutus signaali/tausta-suhteeseen eri Bio-mAb:n pitoisuuksilla (KE7370) ja leiman tilavuuksilla (Kaivogen Oy). Vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

8.4 NÄYTTEIDEN JA REAGENSIIEN TILAVUUKSIEN OPTIMOINTI

Tilavuustesteissä saadut tulokset on esitetty seuraavissa kappaleissa.

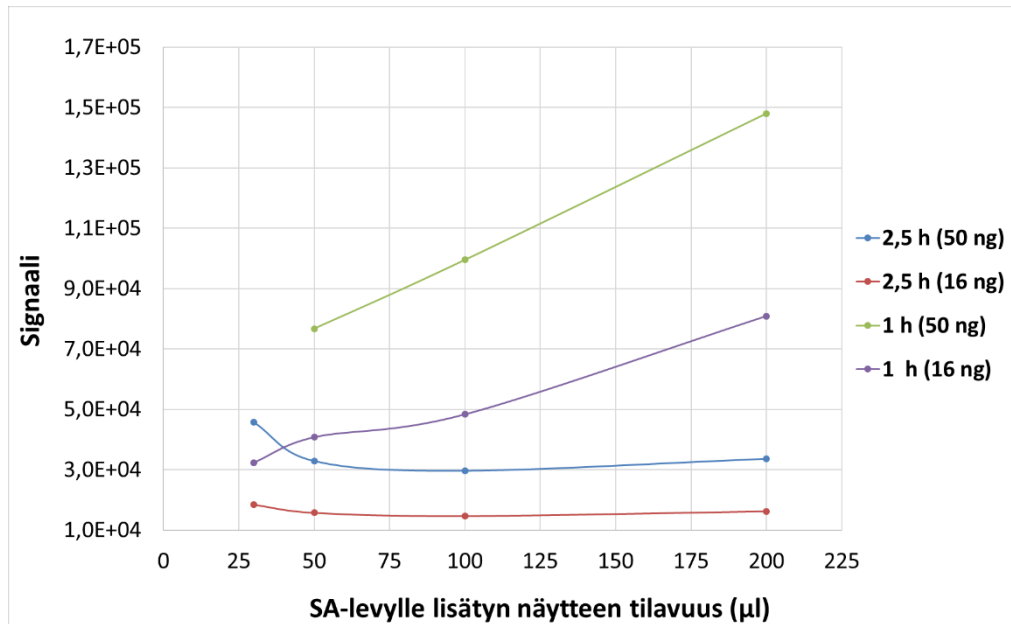
8.4.1 Streptavidinilevylle lisätyn näytteen tilavuus

Koska SA-levyllä tapahtuva reaktio on hyvin hidas eikä lämpötilan nostaminen nopeuttanut reaktiota, kokeiltiin lisätä näytettä pienemmässä tilavuudessa SA-levylle.

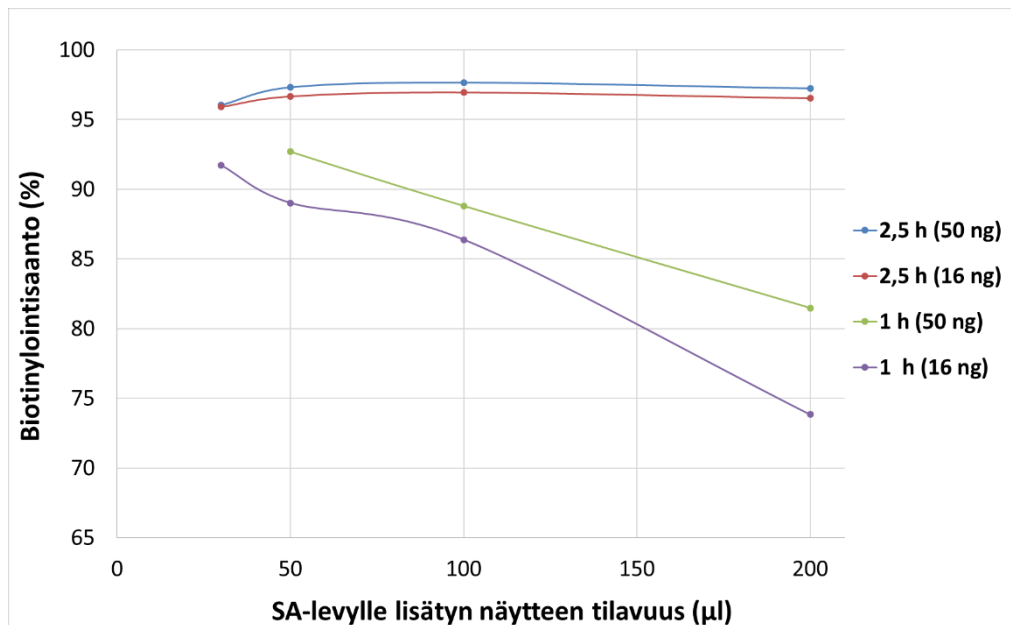
Reaktio tapahtuu nopeammin, kun analyytin pitoisuus näytteessä on korkea, mutta SA-kupin pinta tulee liian täyteen, jos analyyttiä on liikaa, joten näytteen pitoisuutta ei voi kasvattaa. Täten SA-kuppiin tulee laittaa sama massa analyyttiä, mutta pienemmässä tilavuudessa. Analyytin massa näissä näytteissä oli 16 tai 50 ng ja niitä inkuboitiin SA-levyllä 1 tai 2,5 h. Näytteitä pipetoitiin Taulukko 5 mukaisesti ja tulokset on esitetty kuvissa 24 ja 25. Kun analyytti lisättiin näytetilavuudessa 30 tai 50 μl , jo tunnin inkubaatio vaikutti riittävän, sillä mitattu signaali ja määritetty Bio-mAb-saanto eivät juurikaan eronneet toisistaan inkubaatioajoilla 1 ja 2,5 tuntia, eikä analyytin massa myöskään juuri vaikuttanut tulokseen. Erityisesti 30 μl näytetilavuus vaikutti lupaavalta.

Taulukko 5. SA-levylle lisättyjen näytteiden tilavuudet sekä analyyttien massat ja pitoisuudet.

Näyte	Näytteen tilavuus (μl)	Analyytin massa (ng)	Analyytin pitoisuus (ng/ μl)
1	200	50	0,25
2	200	16	0,080
3	100	50	0,50
4	100	16	0,16
5	50	50	1,0
6	50	16	0,32
7	30	50	1,7
8	30	16	0,53



Kuva 24. Vaiheessa 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, SA-levylle lisätyn näytteen tilavuuden vaikutus mitattuun signaaliin, kun näytettä (KE7370) inkuboitii 1 tai 2,5 tuntia ja analyytin massa näytteessä oli 16 tai 50 ng. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,12 ng/µl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

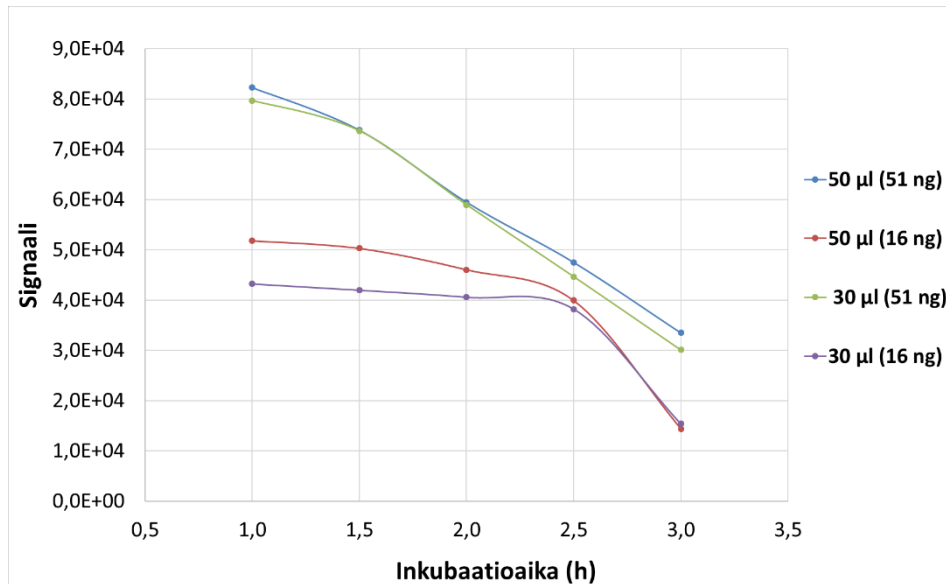


Kuva 25. Vaiheessa 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, SA-levylle lisätyn näytteen tilavuuden vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon, kun näytettä (KE7370) inkuboitii 1 tai 2,5 tuntia ja analyytin massa näytteessä oli 16 tai 50 ng. Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,12 ng/µl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

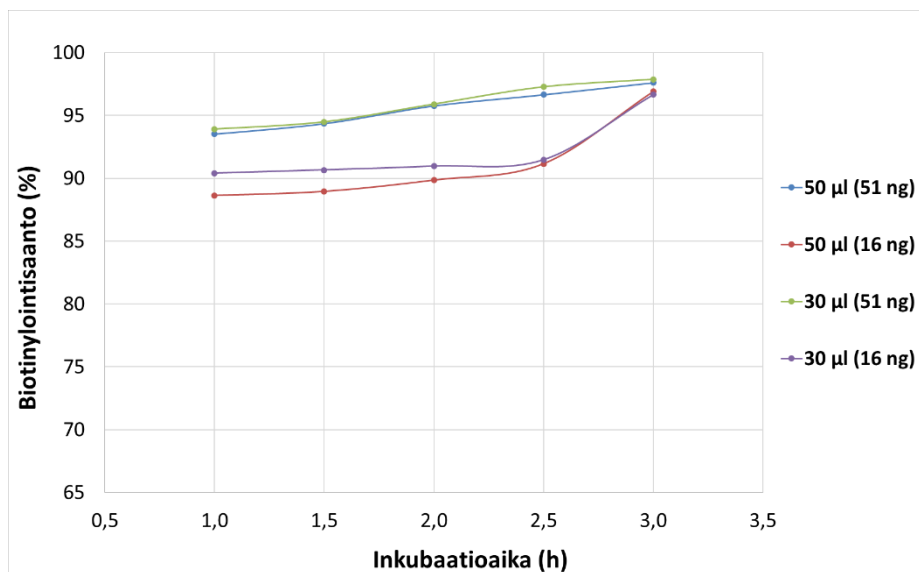
Tutkimusta jatkettiin testaamalla näytteen tilavuuden pienentämisen vaikutusta reaktiokinetiikkaan. Näytteet valmistettiin siten, että näytetilavuus oli 30 tai 50 μl ja analyytin massa oli 16 tai 51 ng (taulukko 6) ja niitä inkuboitiin 1–3 h puolen tunnin välein. Kuvasta 26 voidaan todeta, että, signaalit alkavat laskea jyrkästi 2,5 tunnin inkuboinnin jälkeen, kun analyytin massa oli 16 ng. Syytä tälle ei tiedetä, eikä näytteiden haihtuminen kaivoista vaikuta selitykseltä sillä näytteen haihtuessa signaalit nousivat (liite 4). Analyytin massalla 51 ng lasku oli tasaisempaa. Kuvan 27 perusteella voidaan taas todeta, että kummallakin analyytin massalla 16 ja 51 ng, signaalit olivat suhteellisen lähellä toisiaan näytteen tilavuudesta riippumatta. Lisäksi näytteillä, joissa analyytin massa oli sama, biotinylointisaannot olivat melkein samat kaikilla inkubaatioajoilla.

Taulukko 6. SA-levylle lisättyjen näytteiden tilavuudet sekä analyyttien massat ja pitoisuudet.

Näyte	Näytteen tilavuus (μl)	Analyytin massa (ng)	Analyytin pitoisuus (ng/ μl)
1	50	51	1,0
2	50	16	0,32
3	30	51	1,7
4	30	16	0,53



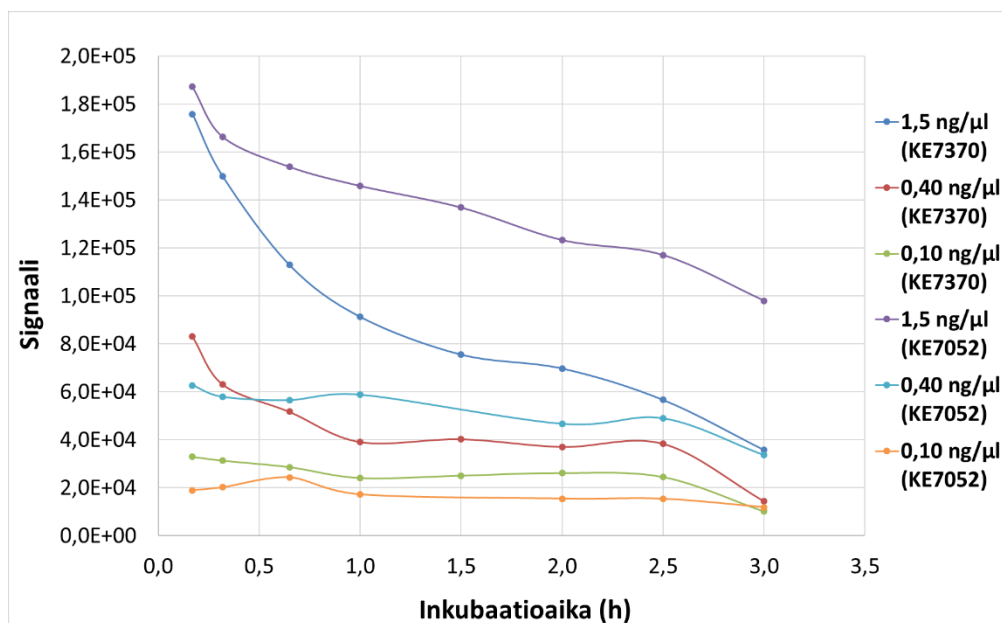
Kuva 26. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin, kun näytettä (KE7370) pipetoitiin SA-levylle 30 tai 50 µl ja Bio-mAb:n massa näytteessä oli 16 tai 51 ng. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/µl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.



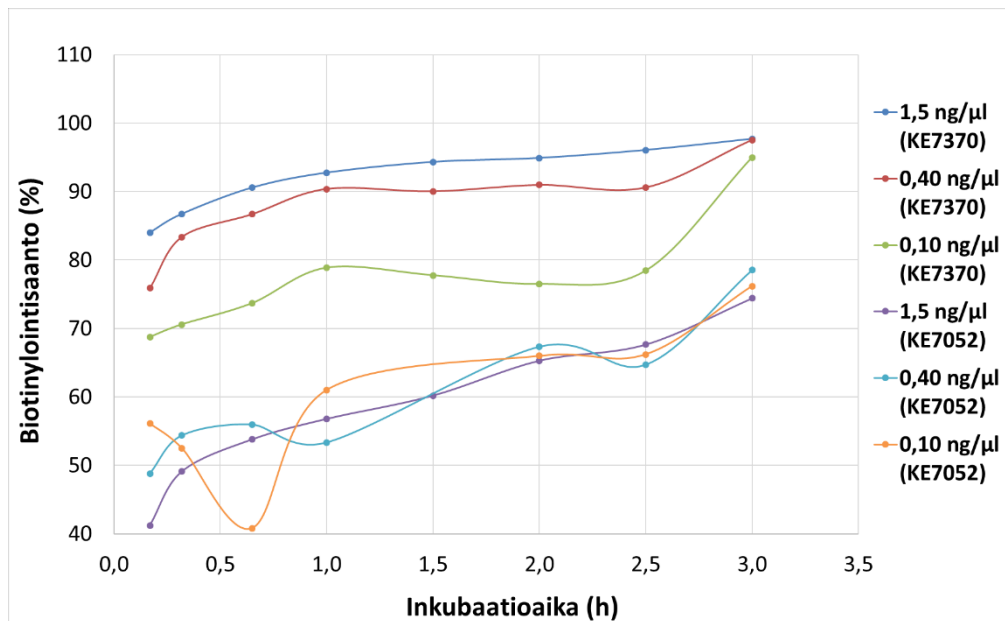
Kuva 27. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon, kun näytettä (KE7370) pipetoitiin SA-levylle 30 tai 50 µl ja Bio-mAb:n massa näytteessä oli 16 tai 51 ng. Biotinylointisaanto laskettiin lineaarisesta interpolaatiosta hyödyntäen. Leimana käytettiin Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/µl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

Näytetilavuuden 30 µl, testaamista jatkettiin näytteillä, joissa analyyttiä oli kolmessa eri pitoisuudessa: 0,10; 0,40 ja 1,5 ng/µl. Mittauksissa testattiin Bio-mAb-eriä KE7370 ja KE7052, mutta jälkimmäisen kohdalla vaiheessa 2 suoritettiin kappaleen

7.3.4.2 mukainen protokolla. Näytteitä inkuboitii SA-levyllä 0,17–3 tuntia ja tulokset on esitetty kuvissa 28 ja 29. Bio-mAb-erän KE7370 tapauksessa voidaan todeta, että matalimmilla pitoisuuksilla 0,10 ja 0,40 ng/μl, signaalissa tapahtuu selvää laskua aikavälillä 0,17–1,0 h, tämän jälkeen signaali on lähes vakio, kunnes signaaliin tulee jyrkkä lasku taas 2,5 h jälkeen (kuva 28). Suuremmalla pitoisuudella 1,5 ng/μl, signaali laskee koko inkubaation ajan. Sama ilmiö voidaan todeta Bio-mAb-erällä KE7052 tehdyissä mittauksissa. Kuvan 29 perusteella voidaan vielä todeta, että biotinylointisaannot noudattavat samaa kaavaa kuin signaalit, tosin sillä erolla, että biotinylointisaannot kasvavat, kun signaalit pienenevät ja päinvastoin.



Kuva 28. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin, kun näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl. Bio-mAb-erän KE7052 näytteiden kohdalla vaiheessa 2 hyödynnettiin kappaleen 7.3.4.2 mukaista protokollaa. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



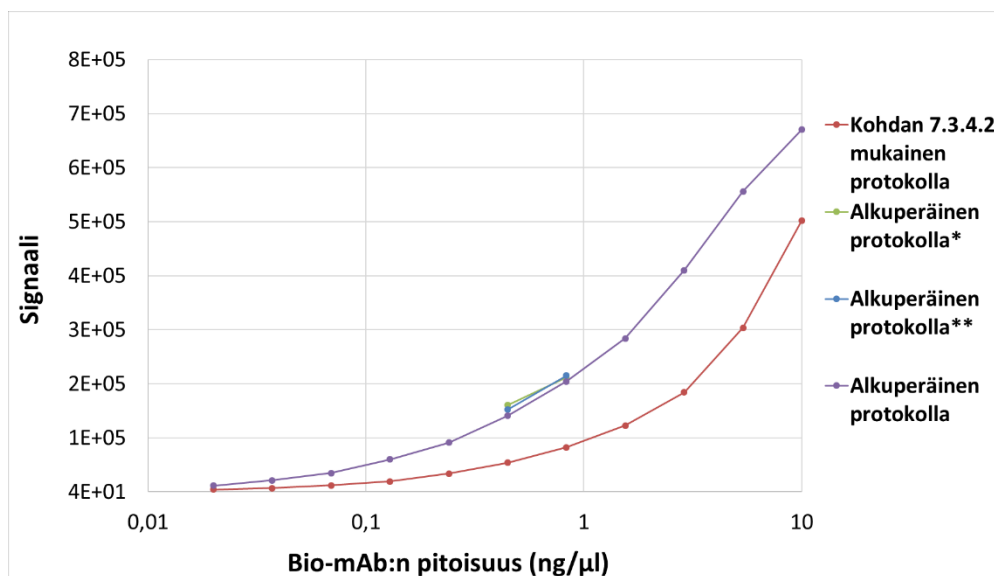
Kuva 29. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon, kun näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl. Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Bio-mAb-erän KE7052 näytteiden kohdalla vaiheessa 2 hyödynnettiin kappaleen 7.3.4.2 mukainen protokolla. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

Tulosten perusteella näytetilavuus päädyttiin pienentämään tilavuuteen 30 μl reaktion nopeuttamiseksi.

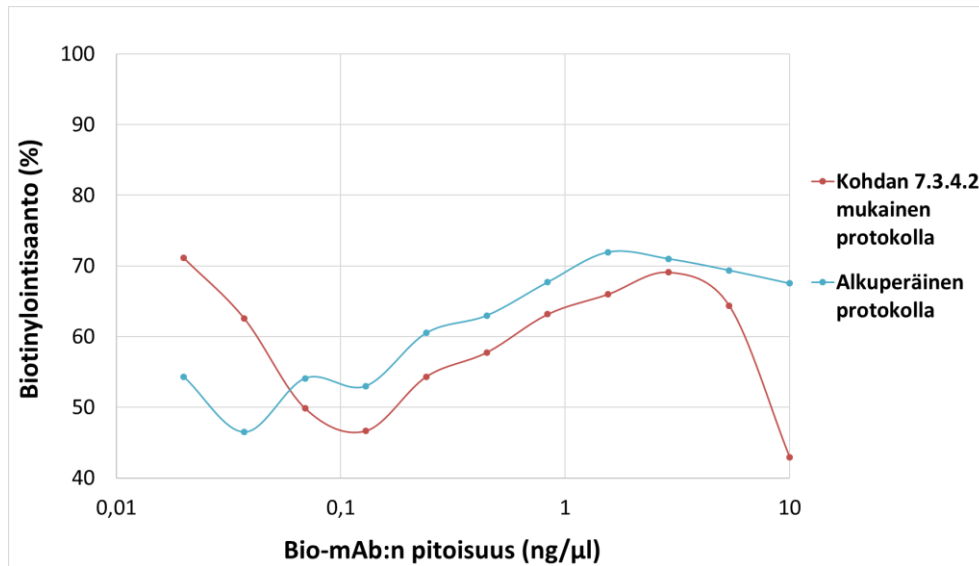
8.4.2 Streptavidiinilevyllä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levyllä siirretyn näytteen tilavuus

Tässä testissä testattiin vaiheessa 2 (kuva 3) kappaleen 7.3.4.2 mukaista protokollaa, jotta määrittäminen toimisi hyvin myös matalan biotinylointisaannon näytteillä (kuvat 30 ja 31). Jos Bio-mAb-erän biotinylointisaanto on matala, biotinyloitumaton mAb: a siirtyy paljon SA-levyltä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levyllä, jolloin näytteelle mitatut signaalit voivat olla niin suuria, että ne eivät välttämättä osu standardikäyrän dynaamiselle alueelle. Vaikka optimoinnissa prioriteettina olivatkin korkean biotinylointisaannon näytteet, tulisi määrittämisellä voida mitata myös matalan biotinylointisaannon näytteitä. Kuvan 30 perusteella voidaan todeta, että kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan hyödyntäminen pienentää signaaleja ja toimii siten hyvin optimoidussa määrittämisessä.

Optimoidussa menetelmässä kaikille näytteille suoritetaan määrittys siten, että vaiheessa 2 hyödynnetään sekä alkuperäistä että kappaleen 7.3.4.2 mukaista protokollaa. Jos näytteellä on korkea biotinylointisaanto (yli 75 %), biotinylointisaanto voidaan laskea vaiheessa 2 alkuperäisen ja kappaleen 7.3.4.2 mukaisesti käsiteltyjen näytteiden tulosten avulla ja näistä tuloksista voidaan laskea keskiarvo. Jos näytteellä on matala biotinylointisaanto (alle 75 %), niin silloin käytetään vain vaiheessa 2 kappaleen 7.3.4.2 mukaisesti määritettyjä signaaleja biotinylointisaannon laskemiseksi. Syynä tähän on se, että Bio-mAb-erällä KE7052 tehtyjen testien mukaan matalan biotinylointisaannon Bio-mAb-erällä vaiheessa 2 alkuperäisen ja kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan avulla määritetyt biotinylointisaannot eroavat selvästi toisistaan.



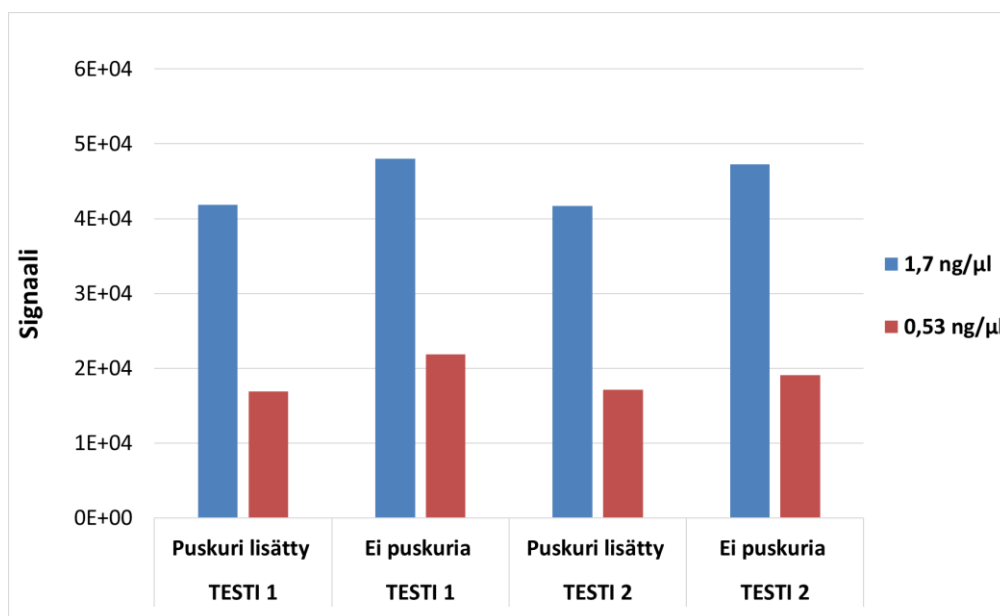
Kuva 30. Bio-mAb-erän KE7052 pitoisuuden vaikutus mitattuun signaaliin näytteillä, jotka oli vaiheessa 2 käsitelty alkuperäisen tai kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan mukaan. Kaikki alkuperäisellä protokollalla mitatut näytteet mitattiin samassa testissä (myös *- ja **-merkityt). Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleviin näytteisiin ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



Kuva 31. Bio-mAb-erän KE7052 pitoisuuden vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon näytteillä, jotka oli vaiheessa 2 käsitelty alkuperäisen tai kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan mukaan. Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleviin näytteisiin ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

8.4.3 Vaiheessa 2 lisätyn Bio-mAb-puskurin tilavuus

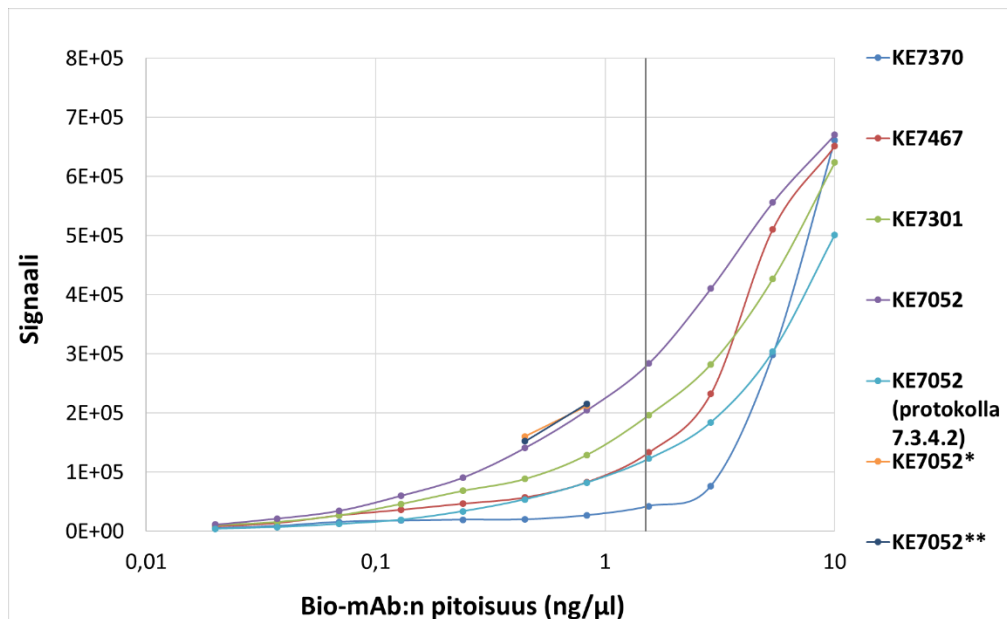
Tässä testissä testattiin, miten vaiheen 2 (kuva 3) Bio-mAb-puskurin lisäämättä jättäminen vaikuttaa määrittelyyn. Tulokset on esitetty kuvassa 32. Tuloksista voidaan todeta, että kun puskuria ei lisätä, mitatut signaalit ovat hieman korkeammat. Täten puskurilisäys ei ole välttämätön määrittelyksen toimivuuden kannalta ja se voidaan jättää pois optimoidusta määrittelyksestä.



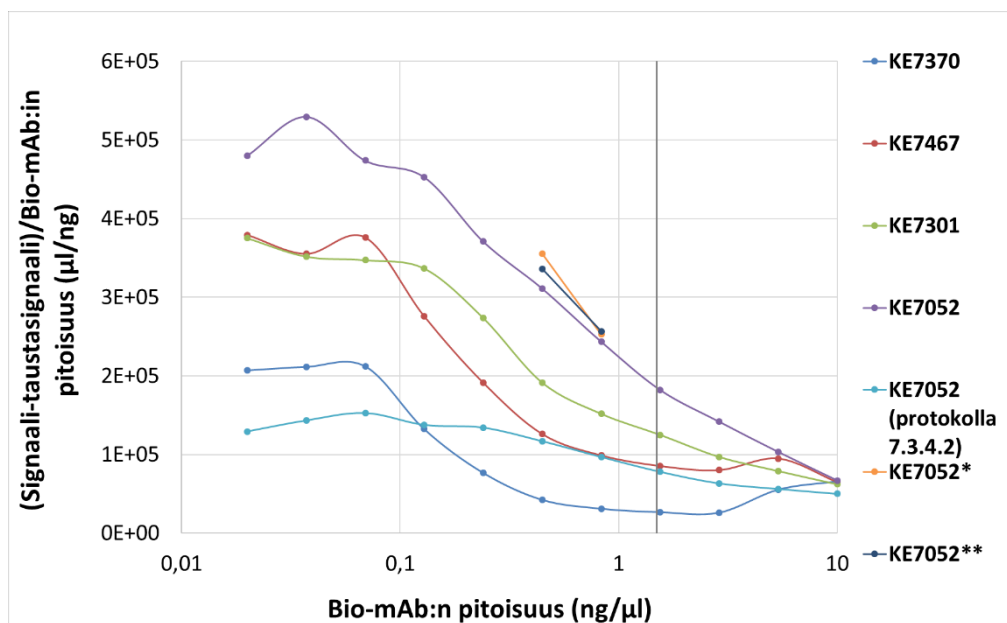
Kuva 32. Vaiheen 2 (kuva 1) puskurilisäyksen vaikutus mitattuihin signaaleihin. Signaalit mitattiin Bio-mAb-erän KE7370 näytteille kahdessa analyytin pitoisuudessa. TESTI 1 ja 2 suoritettiin samassa kokeessa. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h.

8.5 BIOTINYLOIDUN VASTA-AINEEN NÄYTEPITOISUUDEN OPTIMOINTI

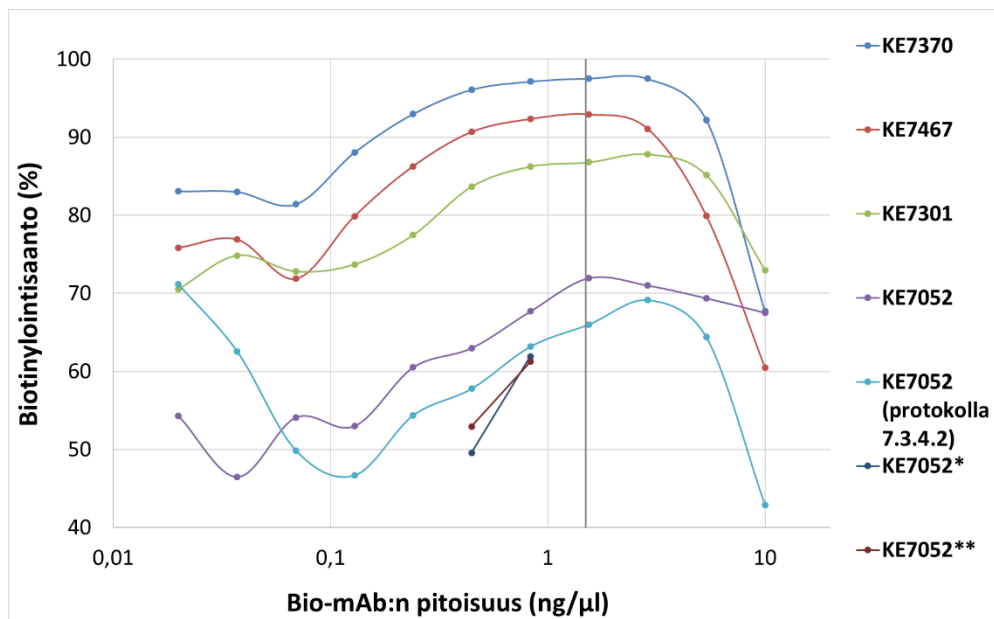
Näissä testeissä pyrittiin määrittämään SA-levylle lisätyn Bio-mAb-näytteen pitoisuus, jolla voidaan mitata mahdollisimman monenlaisia Bio-mAb-eriä, mutta toimivuus korkean biotinylointisaannon Bio-mAb-erillä oli prioriteettina. Tulokset on esitetty kuvissa 33, 34 ja 35. Korkean biotinylointisaannon Bio-mAb-erien KE7370, KE7467 ja KE7301 sekä vaiheessa 2 kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan käsitellyillä Bio-mAb-erän KE7052 (protokolla 7.3.4.2) näytteillä voidaan huomata sama ilmiö. Kun Bio-mAb:n pitoisuus on välillä 0,4–3 $\text{ng}/\mu\text{l}$, signaalin, josta on vähennetty taustasignaali, kulmakerroin Bio-mAb:n pitoisuuden funktiona on melkein vakio (kuva 34). Tällöin myös määritetty biotinylointisaanto on lähes vakio (kuva 35). Matalan biotinylointisaannon näytteelle KE7052 ei löydetty vastaavaa aluetta. Koska näytteen biotinylointisaantoa ei voida etukäteen tietää, jotta määritys olisi universaali, tulisi optimoida näytteen pitoisuus siten, että kulmakerroin olisi mahdollisimman vakio kaikilla Bio-mab:eilla. Bio-mAb:in pitoisuus 1,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ täytti hyvin tämän kriteerin, joten päätettiin, että optimoidussa määrittäksessä mitataan näytteitä, joissa Bio-mAb:n pitoisuus on 1,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (optimipitoisuus).



Kuva 33. Bio-mAb:n pitoisuuden vaikutus mitattuun signaaliin. Vaiheessa 2 KE7052 (protokolla 7.3.4.2) käsiteltiin kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan, muut taas alkuperäisen protokollan mukaan. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



Kuva 34. Bio-mAb:n pitoisuuden vaikutus signaalin kulmakertoimeen ((signaali-taustasignaali)/Bio-mAb:n pitoisuus). Vaiheessa 2 KE7052 (protokolla 7.3.4.2) käsiteltiin kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan, muut taas alkuperäisen protokollan mukaan. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



Kuva 35. Bio-mAb:n pitoisuuden vaikutus määritettyihin biotinylointisaantoihin. Biotinylointisaanto laskettiin lineaarista interpolaatiota hyödyntäen. Vaiheessa 2 KE7052 (protokolla 7.3.4.2) käsiteltiin kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan, muut taas alkuperäisen protokollan mukaan. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

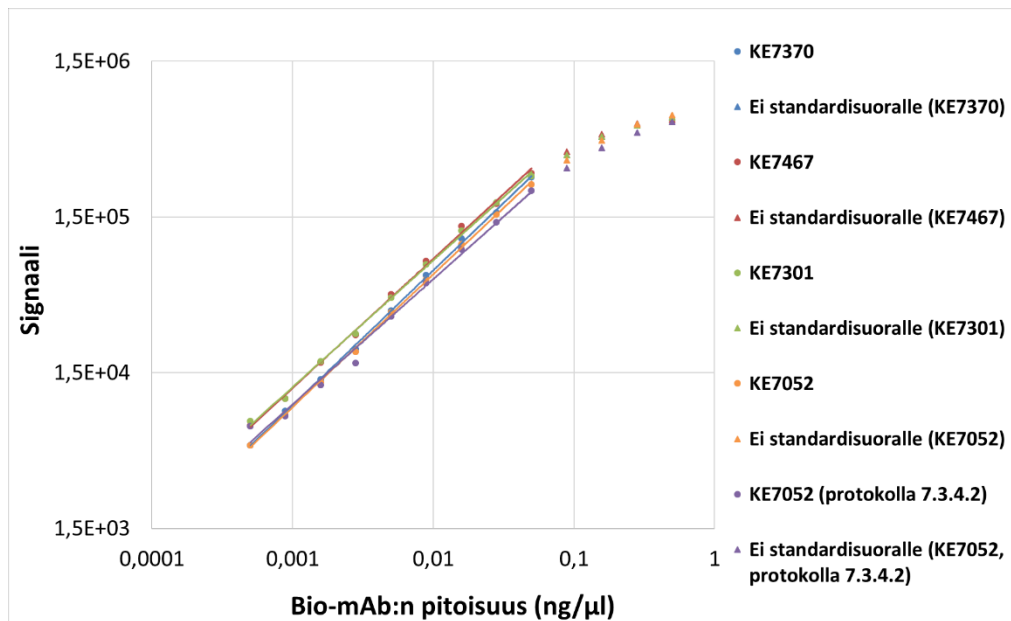
8.6 TULOSTEN ANALYSOINTI BIOTINYLOINTISAANNON LASKEMISEKSI

Määrityksen toimivuuden parantamiseksi haluttiin määrittää standardikäyrä ja pitoisuusalue, jolla standardien datapisteet osuvat mahdollisimman hyvin käyrälle. Sen lisäksi selvitettiin tarvittavien replikoiden määrä näytteille.

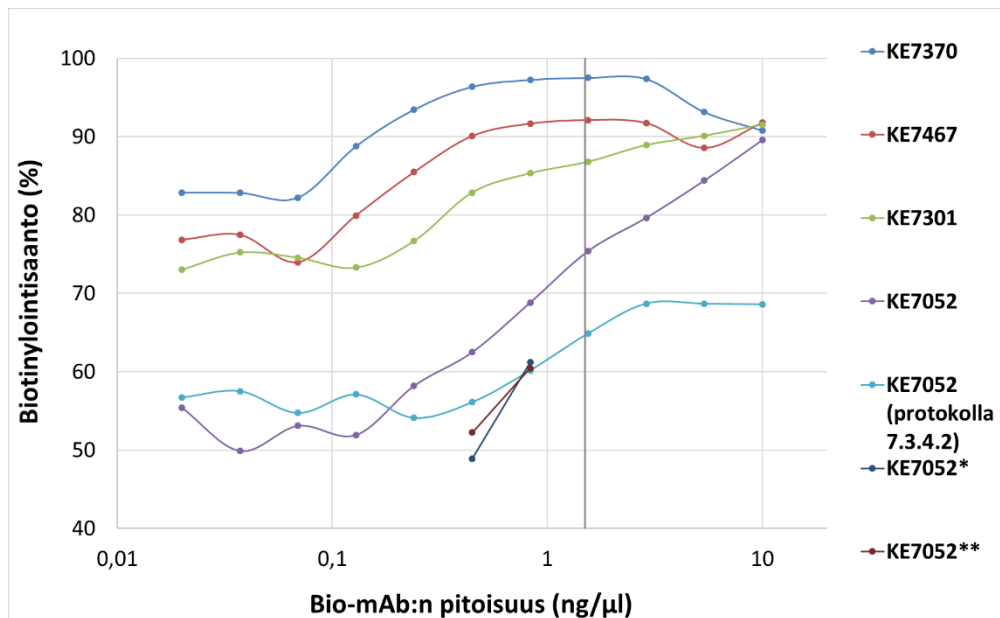
8.6.1 Standardikäyrä ja standardien pitoisuudet

Yksi optimoinnin tavoitteista oli määrittää standardikäyrä, joka toimisi hyvin erilaisilla Bio-mAb-erillä, sillä alkuperäisessä määrittämisessä käytetty toisen asteen yhtälö ei kuvannut standardisuoraa tarpeeksi hyvin. Sen takia tämän työn aikana käytettiin lineaarista interpolaatiota, jolla kyllä saatiin määritettyä Bio-mAb:n biotinylointisaanto, mutta joka ei ollut lopullisen määrittämisestä kannalta optimaalisin vaihtoehto. Linearisessa interpolaatiossa standardikuvaaja muodostetaan kahden vierekkäisen pisteen avulla, joten se on hyvin virhealtis. Täten tulisi löytää funktio, joka vastaisi mahdollisimman hyvin lineaarista interpolaatiota. Tätä varten määritettiin standardit neljälle eri

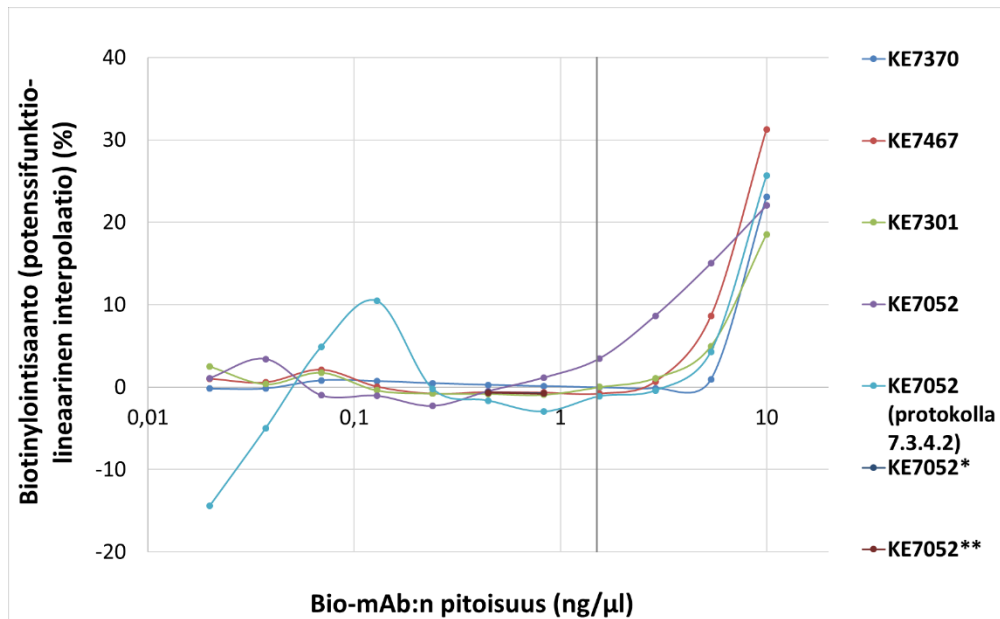
biotinylointiasteen Bio-mAb-erälle. Tulokset on esitetty kuvassa 36 ja niiden perusteella todettiin, että kun standardien pitoisuudet ovat välillä 0,00050–0,050 ng/μl, signaalin ja Bio-mAb:n pitoisuuden logaritmien välinen riippuvuus on lineaarinen. Tällä pitoisuusalueella voitaisiin hyödyntää potenssifunktion logaritminmuunnoskaavaa $\ln(\text{signaali})=a*\ln(\text{pitoisuus (ng/}\mu\text{l)})+b$. Kuvassa 37 on esitetty kappaleessa 8.6 mitatuille näytteille määritetyt biotinylointisaannot potenssifunktion logaritminmuunnoskaavaa hyödyntäen. Kuvassa 38 taas on esitetty, että miten potenssifunktion logaritminmuunnoskaavaa ja lineaarista funktiota käyttäen määritetyt biotinylointisaannot eroavat toisistaan. Tuloksista voidaan todeta, että kummallakin tavalla määritetyt biotinylointisaannot ovat hyvin lähellä toisiaan, varsinkin kun mitataan optimoidulla pitoisuudella 1,5 ng/μl. Tosin tällä näytepitoisuudella mitattaessa matalan biotinylointisaannon Bio-mAb-erälle KE7052 vaiheessa 2 kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan käsiteltyjen näytteiden (protokolla 7.3.4.2) biotinylointisaanto on lähempänä lineaarisella interpolaatiolla määritettyä biotinylointisaantoa kuin vaiheessa 2 alkuperäisellä protokollalla käsiteltyjen näytteiden. Määrittelyssä eri laskutavoilla laskettuja biotinylointisaantoja, kun SA-levylle lisätyn Bio-mAb:n pitoisuus on 1,5 ng/μl, on verrattu taulukossa 7. Lopulliselle standardisuoralle valittiin pitoisuuksiksi 0 ng/μl ja seitsemän pitoisuutta väliltä 0,00050–0,050 ng/μl: 0,00050; 0,0010; 0,0020; 0,0050; 0,010; 0,020 ja 0,050 ng/μl.



Kuva 36. Eri Bio-mAb-erille mitatut standardisuorat ja standardisuorien ulkopuolelle jätetyt pisteet (ei standardisuoralle). Vaiheessa 2 näytteet käsiteltiin sekä alkuperäisen että kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan mukaan (protokolla 7.3.4.2). Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



Kuva 37. Bio-mAb:n pitoisuuden vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon. Standardisuoran sovituksessa hyödynnettiin potenssifunktion logaritminmuunnoskaavaa. Vaiheessa 2 KE7052 (protokolla 7.3.4.2) käsiteltiin kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan, muut taas alkuperäisen protokollan mukaan. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



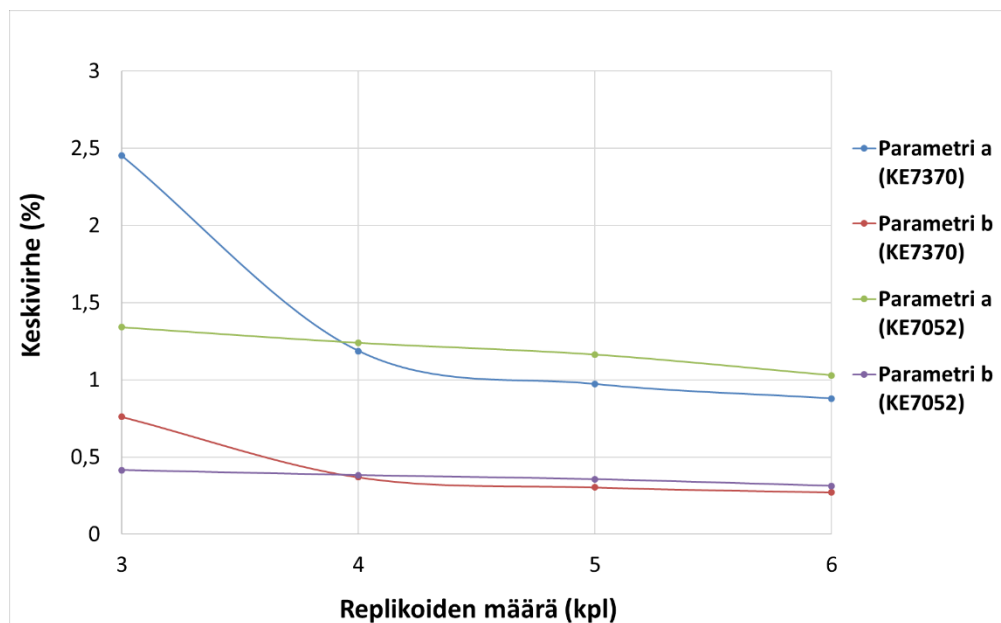
Kuva 38. Määritettyjen biotinylointisaantojen vertailu, kun biotinylointisaannot laskettiin potenssifunktion logaritminmuunnoskaavan tai lineaarisen interpolaation avulla. Vaiheessa 2 KE7052 (protokolla 7.3.4.2) käsiteltiin kappaleen 7.3.4.2 protokollan mukaan, muut taas alkuperäisen protokollan mukaan. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

Taulukko 7. Eri tavoilla määritetyt biotinylointisaannot eri Bio-mAb-erille, kun SA-levylle lisätyn Bio-mAb:n pitoisuus oli 1,5 ng/μl.

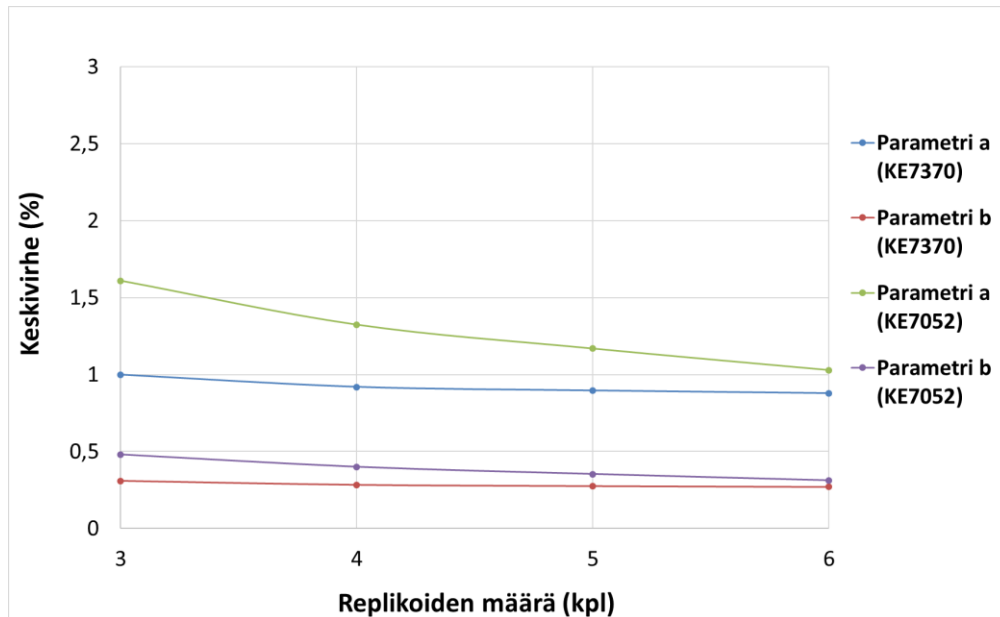
	Biotinylointisaanto (%)		
	Alkuperäinen	Lineaarinen interpolaatio	Potenssifunktion logaritminmuunnos
KE7370	95	98	98
KE7467	88	93	92
KE7301	75	88	87
KE7052	65	72	75
KE7052 (protokolla 7.3.4.2)	65	66	65

8.6.2 Replikoiden määrä

Tämä koe suoritettiin, jotta voitaisiin päättää määrittäessä tarvittavien replikoiden määrä. Potenssifunktion logaritmuunnoskaavassa $\ln(\text{signaali}) = a * \ln(\text{pitoisuus (ng/}\mu\text{l)}) + b$ esiintyville parametreille a ja b määritettiin keskivirhe eri standardireplikoiden määrällä. Lisäksi määritettiin variaatiokerroin eri määrällä näyttereplikoita. Tulokset on esitetty kuvissa 39 ja 40 ja liitteessä 5. Kuvien 39 ja 40 tulosten perusteella voidaan todeta, että mitä vähemmän replikoita mitataan, sitä suurempi on keskivirhe. Kuitenkin jo neljällä replikalla keskivirhe on lähes yhtä matala kuin viidellä tai kuudella replikalla, joten neljäkin replikaa olisi tarpeeksi. Neljä replikaa olisi myös hyvä määrä, koska silloin yhdelle riville voidaan pipetoida tasan kolme näytettä. Näiden tulosten perusteella näyttereplikoita tullaan mittaamaan 4 per näyte, mutta standardien replikoiden määrä päädyttiin pitämään entisellään eli kolme replikaa per standardi.



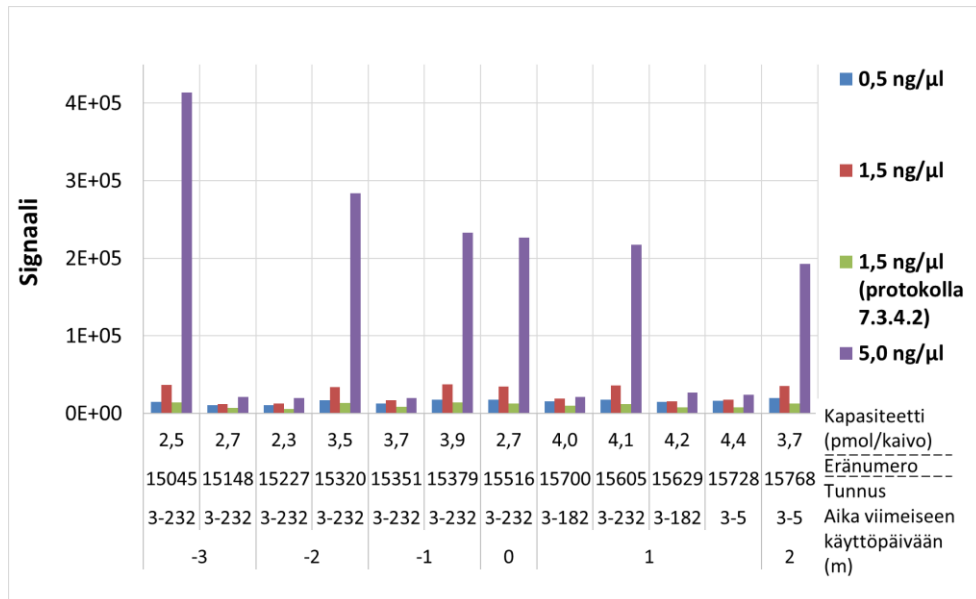
Kuva 39. Määrittäksen keskivirhe eri määrällä standardireplikoita, kun viimeisimpinä mitatut replikat jätettiin pois laskuista, kun replikoiden määrää vähennettiin. Leimana käytettiin Kaivogen Oy:n valmistetta pitoisuudessa 0,13 ng/μl. Vaiheen 2 inkubaatioaika oli 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



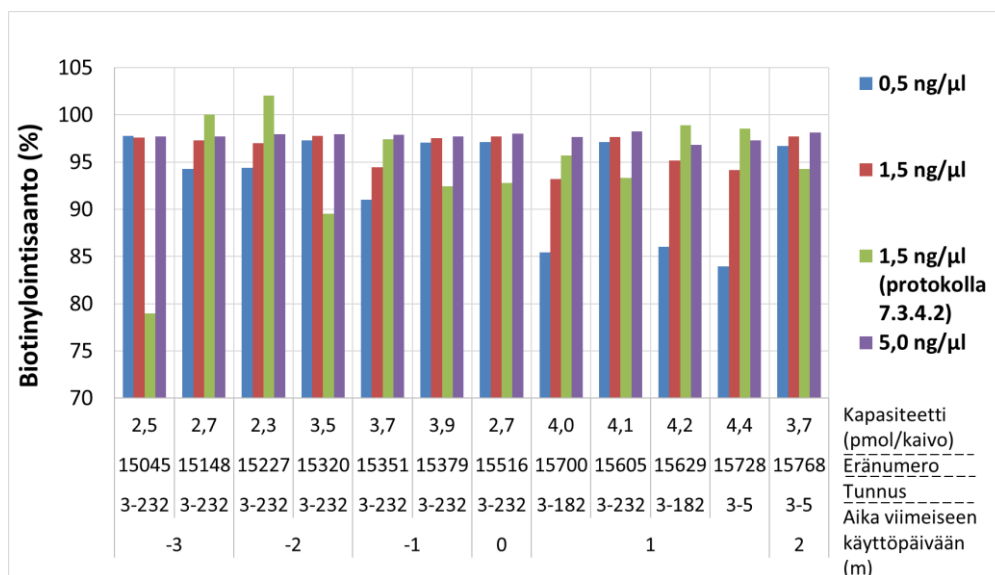
Kuva 40. Määrittämisen keskivirhe eri määrällä standardireplikoita, kun ensimmäisinä mitatut replikat jätettiin pois laskuista, kun replikoiden määrää vähennettiin. Leimana käytettiin Kaivogen Oy:n valmistetta pitoisuudessa 0,13 ng/μl. Vaiheen 2 inkubaatioaika oli 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

8.7 STREPTAVIDIINILEVYERIEN VERTAILU JA STREPTAVIDIINIIN VAIKUTUS MÄÄRITYKSEEN

Tässä testissä tutkittiin, vaikuttaako käytetty SA-levyväri määrittämiseen. Tätä varten testattiin optimoidulla protokollalla Bio-mAb-erästä KE7370 laimennetuilla näytteillä erilaisia SA-levyjä. Tulokset on esitetty kuvissa 41 ja 42. Tulosten perusteella voidaan päätellä, että aika viimeiseen käyttöpäivään ei ilmeisesti vaikuta mitattuihin signaaleihin ja määritettyihin biotinylointisaantoihin. Edes SA-levyn viimeisen käyttöpäivän ylittyminen ei näytä vaikuttavan määrittämiseen. Myöskään SA-levyn biotiininsitomiskapasiteetilla ei vaikuttanut olevan mitään vaikutusta määrittämiseen. Lukuun ottamatta pitoisuutta 5,0 ng/μl eri SA-levyillä mitattujen näytteiden välillä ei myöskään ollut suurta eroa. On mahdollista, että koska pitoisuus 5,0 ng/μl on korkea, SA-levyn kapasiteetti ylittyy, mikä vääristää tuloksia. Kuitenkin kun analyytin pitoisuus oli 1,5 ng/μl, sekä vaiheessa 2 alkuperäisen että kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan mukaan käsitellyillä näytteillä, eri SA-levyillä mitatut signaalit ja vastaavasti määritetyt biotinylointisaannot olivat hyvin lähellä toisiaan, sillä niiden keskihajonta oli vain noin 4 %. Näin ollen voidaan todeta, että käytetty SA-levyväri ei vaikuta optimoidulla määrittämiskäytännöllä tehtyihin testeihin.



Kuva 41. Mitattu signaali eri erien SA-levyillä, kun näytteinä oli kolme Bio-mAb-erästä KE7370 laimennettua pitoisuutta: 0,5; 1,5 ja 5,0 ng/μl. Näytteet, joissa analyyyttiä oli 1,5 ng/μl, käsiteltiin vaiheessa 2 sekä alkuperäisen että kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan mukaan (protokolla 7.3.4.2). Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



Kuva 42. Määritetty biotinylointisaanto eri erien SA-levyillä, kun näytteinä oli kolme Bio-mAb-erästä KE7370 laimennettua pitoisuutta: 0,5; 1,5 ja 5,0 ng/μl. Biotinylointisaannot määritettiin lineaarisen interpolaation avulla. Näytteet, joissa analyyyttiä oli 1,5 ng/μl, käsiteltiin vaiheessa 2 sekä alkuperäisen että kappaleen 7.3.4.2 mukaisen protokollan mukaan (protokolla 7.3.4.2). Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

Lisäksi testattiin, että vaikuttaako SA-levyltä mahdollisesti irtoava SA määrittelyyn. Tätä varten suoritettiin immunomääritys (vaiheet 2–4) standardeille ja datapisteistä piirrettiin standardikäyrät siten, että toisiin standardeihin lisättiin SA:a molaarisesti 100-kertainen määrä Bio-mAb:iin (KE7370) verrattuna. Tulokset on esitetty liitteessä 6. Tulosten perusteella voidaan todeta, että SA:n lisääminen näytteisiin ei juurikaan vaikuta signaaleihin, eikä siten myöskään määrittelyyn.

8.8 OPTIMOITU MÄÄRITYS

Lopullisen optimoidun määrityksen vaiheet olivat seuraavat (kuva 43):

Vaihe 1: SA:lla päällystetty 96-mikrotiitterilevy pestiin 2 kertaa pesuliuksella DELFIA-mikrotiitterilevypesurilla (ADIL Instruments, Strasbourg Schiltigheim, Ranska). Neljään kuoppaan pipetoitiin 30 µl 1,5 ng/µl Bio-mAb:a Bio-mAb-puskurissa. Levyn annettiin inkuboitua kevyessä ravistelussa Wallac-levyravistelijassa (Wallac Oy, Suomi/Heidolph, Länsi-Saksa) huoneenlämmössä (RT) 2,5 tunnin ajan.

Vaihe 2: Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava levy pestiin kerran pesuliuksella. Inkuboinnin päätyttyä SA-levyllä oleviin kuoppiin lisättiin 170 µl Bio-mAb-puskuria, ravisteltiin hetki kevyesti ja ravistelun jälkeen 100 µl näytettä siirrettiin jokaisesta SA-levyn kuopasta hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavan levyn vastaavaan kuoppaan. SA-levyltä otettiin myös toiset näytteet siten, että pipetoitiin 30 µl näytettä SA-levyltä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavan levyn kuoppaan, johon oli pipetoitu valmiiksi 70 µl Bio-mAb-puskuria. Lisäksi pipetoitiin jokaista standardilaimennosta (0; 0,00050; 0,0010; 0,0020; 0,0050; 0,010; 0,020 ja 0,050 ng/µl) kolmeen tyhjään kuoppaan 100 µl. Lopuksi levyn annettiin inkuboitua kevyessä ravistelussa RT:ssä 0,5 tuntia.

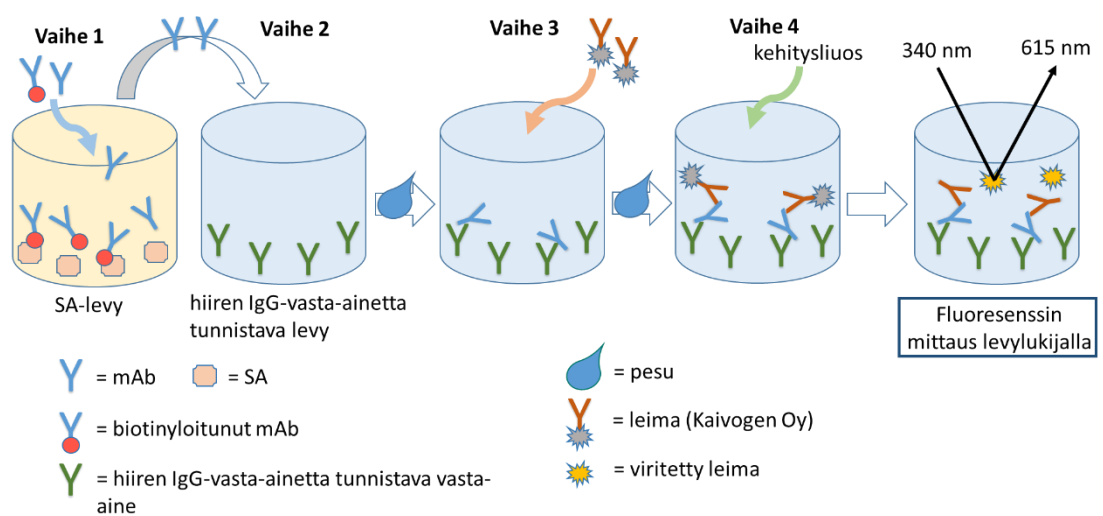
Vaihe 3: Inkuboinnin päätyttyä hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistava levy pestiin kaksi kertaa pesuliuksella ja jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 200 µl leimaa, jonka pitoisuus oli 0,13 ng/µl. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin kaksi tuntia ravistelussa RT:ssä.

Vaihe 4: Inkuboinnin päätyttyä stripsit pestiin kuusi kertaa pesuliuksella ja niihin annosteltiin 200 µl kehitysluosta 1296-041 DELFIA® Plate Dispense -annostelijalla (Wallac Oy, Turku, Suomi). Pesun jälkeen inkuboitiin vielä 5 min ravistelussa RT:ssä ja tulokset mitattiin Victor™ X4 -levylukijalla (PerkinElmer, Singapore) Europium 1 s -protokollalla (taulukko 4, kappale 7.3.1).

Taulukkoon 8 on vielä selvennetty alkuperäiseen määrittelykseen tehdyt muutokset ja kuvassa 43 on esitetty optimoidun määrittelyksen protokolla.

Taulukko 8. Työssä tehdyt optimoinnit.

Vaihe	Optimoinnin kohde	Alkuperäinen	Optimoitu
1	Analyytin pitoisuus näytteessä (ng/μl)	0,25 tai 0,50	1,5
	Näytteen tilavuus (μl)	200	30
	Inkubaatioaika (h)	1	2,5
2	Näytteen tilavuus (μl)	100	30 tai 100
	Puskurin lisäys (μl)	100	Ei puskuria
	Inkubaatioaika	2	0,5
3	Leiman valmistaja	PerkinElmer	Kaivogen Oy
	Leiman pitoisuus (ng/μl)	0,50	0,13
	Inkubaatioaika	2	2



Kuva 43. Optimoidun määrittelyksen protokolla.

9 LOPPUPÄÄTELMÄT

Työn tarkoituksena oli parantaa määrittelyn luotettavuutta ja tarkkuutta sekä parantaa immunomäärittelyn herkkyyttä. Sitä varten pyrittiin optimoimaan parametrit juuri käyttötarpeisiin sopiviksi. Kaiken kaikkiaan työn tavoitteet saavutettiin hyvin.

Leiman pitoisuutta pienentämällä ja vaihtamalla PerkinElmerin leima Kaivogen Oy:n leimaan saatiin immunomäärittelyn herkkyyttä parannettua. Inkubaatioaikojen testaaminen oli optimoinnin kannalta lopulta hyvin tärkeää, sillä silloin huomattiin, että vaiheessa 1 tunnin inkuboinnin aikana biotinyloituneen mAb:n sitoutuminen SA-levylle ei ehtinyt tapahtua loppuun, mikä vääristi tuloksia. Inkubaatioaikaa pidentämällä reaktiolla oli enemmän aikaa tapahtua ja suurempi pitoisuus analyyyttiä pienemmässä näytetilavuudessa nopeutti reaktiota entisestään. Näytteen lisääminen kahdessa eri tilavuudessa hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle mahdollisti myös pienen biotinylointisaannon näytteen biotinylointisaannon mittaamisen ja lisäksi tarjoaa mahdollisuuden varmistaa korkean biotinylointiasteen Bio-mAb:n biotinylointisaannon oikeellisuuden. Myös potenssifunktion logaritmuunnoskaavaa hyödyntävän standardikäyrän käyttäminen paransi määrittelyä. Lisäksi näytteelle saatiin valittua pitoisuus, jolla saadaan mahdollisimman oikeellisia tuloksia erilaisilla Bio-mAb-erillä. Myös replikoiden määrä saatiin optimoitua niin, että keskivirheet ovat tarpeeksi pienet, mutta määrittely on silti käytännöllistä suorittaa. Edelleen voidaan todeta, ettei SA-levylerä tai mahdollisesti SA-levyltä irtoava SA vaikuta optimoituun määrittelyyn.

Työn päämääränä oli lisäksi määrittelyn käyttäjystävällisyyden parantaminen ja mahdollisesti myös testin yksinkertaistaminen, mutta määrittelyn toimivuuden takaamiseksi tätä tavoitetta ei saavutettu. Vaikka määrittelystä saatiinkin poistettua turha Bio-mAb-puskurin lisäys vaiheessa 2, niin samaan vaiheeseen lisättiin ylimääräinen työvaihe, kun SA-levyltä siirretään näytteet kahdessa eri tilavuudessa hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalle levylle. Myöskään testin kokonaiskestoa ei saatu lyhennettyä, sillä vaikka vaiheen 2 inkubaatioaika lyheni, niin vastaavasti vaiheen 1 piteni.

Kaiken kaikkiaan tämä työ osoittaa, että Bio-mAb:in biotinylointisaannon määrittelymenetelmää käytettäessä on hyvä tarkistaa erilaisten parametrien vaikutus määrittelyyn, jotta voidaan mitata mahdollisimman oikeellisia biotinylointisaantoja.

Kirjallisessa osiossa käsiteltiin biotinylointiasteen määrittelymenetelmiä, koska biotinylointisaannon määrittelymenetelmistä ei löytynyt tutkimusartikkeleita.

Biotinylointiastetta mittaavia määrityksiä taas oli useita ja niiden tavoitteena oli varmistaa, että biotinyloitu proteiini biotinyloittuu hyvin ja toimii määrityksessä. Radiometer Turku Oy:n biotinylointisaannon määrittäminen taas suoritettiin, jotta tuotannossa tapahtuva hukka pystyttäisiin arvioimaan ja minimoimaan. Tämä on hyvä esimerkki siitä miten toisinaan akateemiset ja kaupalliset tai teolliset intressit eroavat toisistaan. Tästäkin huolimatta erilaisia biotinylointiasteen määrittämenetelmiä voitaisiin varmasti soveltaen hyödyntää myös biotinylointisaannon määrittämisessä.

VIITTEET

- (1) Strachan, E.; Mallia, A. K.; Cox, J. M.; Antharavally, B.; Desai, S.; Sykaluk, L.; O'Sullivan, V.; Bell, P. A. Solid-Phase Biotinylation of Antibodies. *J. Mol. Recognit.* **2004**, *17* (3), 268–276.
- (2) Batchelor, R. H.; Sarkez, A.; Cox, W. G.; Johnson, I. Fluorometric Assay for Quantitation of Biotin Covalently Attached to Proteins and Nucleic Acids. *Biotechniques* **2007**, *43* (4), 503–507.
- (3) Hofstetter, H.; Morpurgo, M.; Hofstetter, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. A Labeling, Detection, and Purification System Based on 4-Hydroxyazobenzene-2-Carboxylic Acid: An Extension of the Avidin-Biotin System. *Anal. Biochem.* **2000**, *284* (2), 354–366.
- (4) Rao, S. V.; Anderson, K. W.; Bachas, L. G. Determination of the Extent of Protein Biotinylation by Fluorescence Binding Assay. *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8* (1), 94–98.
- (5) Lu, J.; Zenobi, R. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Identifying the Composition of Labeled Proteins. *Anal. Biochem.* **1999**, *269* (2), 312–316.
- (6) Gan, Z.; Marquardt, R. R. Colorimetric Competitive Inhibition Method for the Quantitation of Avidin, Streptavidin and Biotin. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1998**, *39* (1–2), 1–6.
- (7) Hemmilä, I. *Applications of Fluorescence in Immunoassays*, 1st ed.; Winefordner, J., Kolthoff, I., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 1991.
- (8) Wilchek, B. M.; Bayer, E. A. Biotin-Containing Reagents. **1990**, *184* (1980), 123–138.
- (9) Shah, D.; Salbilla, V.; Russell, R.; Brown III, W. Determination of Biotin in Biotin-Conjugated Protein by Measuring Fluorescence Polarization. *Clin. Chem.* **1992**, *40* (11), 2112–2113.
- (10) Kanagy, B. An Accurate and Simple Spectrophotometric Assay System for Quantitation of Biotin: The Quant*Tag™ Biotin Kit. *Biotechniques* **2013**, *55* (4),

210–211.

- (11) Bennett, K. L.; Smith, S. V.; Lambrecht, R. M.; Truscott, R. J. W.; Shell, M. M. Rapid Characterization of Chemically-Modified Proteins by Electrospray Mass Spectrometry. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (1), 16–22.
- (12) Rispens, T.; Ooijevaar-de Heer, P. Quantification of the Degree of Biotinylation of Proteins Using Proteinase K Digestion and Competition ELISA. *J. Immunol. Methods* **2016**, *430*, 61–63.
- (13) Bayer, E. A.; Wilchek, M. Protein Biotinylation. *Methodology* **1990**, *184* (1976), 138–160.
- (14) Wild, D. The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Elsevier Science 2013.
- (15) Darwish, I. A. Immunoassay Methods and Their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2* (3), 217–235.
- (16) Berson, B. S. A.; Yalow, R. S.; Bauman, A.; Rothschild, A.; Newerly, K. Insulin-I¹³ Metabolism in Human Subjects: Demonstration of Insulin Binding Globulin in the Circulation of Insulin Treated Subjects. *J. Clin. Invest.* **1955**, 170–190.
- (17) Weiler, R. J.; Hofstra, D.; Szentivanyi, A.; Blaisdell, R.; Talmage, D. W. The Inhibition of Labeled Antigen Precipitation as a Measure of Serum γ -Globulin. *J. Immunol.* **1959**, *85* (2), 130–137.
- (18) Introduction to Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006; pp 1–26.
- (19) Hemmilä, I. Photoluminescence Immunoassays. In *Immunochemistry I a practical approach*; Johnstone, A., Turner, M., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 1997; pp 193–214.
- (20) Hemmilä, I. Luminescent Lanthanide Chelates-a Way to More Sensitive Diagnostic Methods. *J. Alloys Compd.* **1995**, *225* (1–2), 480–485.
- (21) Smith, J.; Miller, B.; Knock, S.; Kurosky, A. Biotinylated Peptides / Proteins of Stoichiometry of Derivatization. *Anal. Biochem.* **1991**, *197* (1), 247–253.
- (22) PierceTM Biotin Quantitation Kit
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/28005#/28005> (viitattu

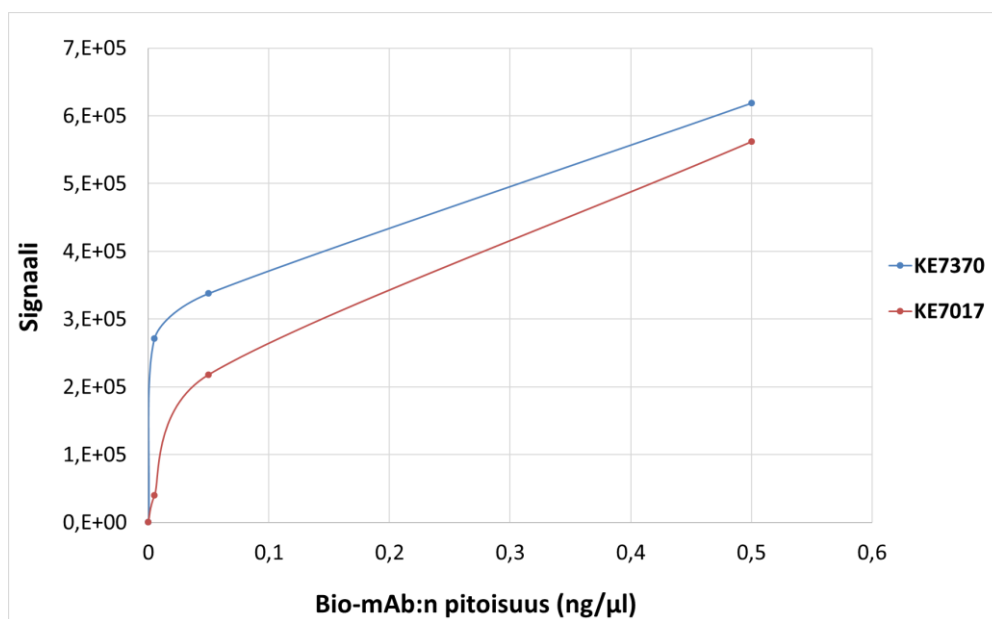
07.01.2020).

- (23) Biotin Assay Kit (Colorimetric) (ab185441) <https://www.abcam.com/biotin-assay-kit-colorimetric-ab185441-protocols.html#top-624> (viitattu 08.012020).
- (24) FluoReporter™ Biotin Quantitation Assay Kit, for biotinylated proteins <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F30751#/F30751> (viitattu 07.012020).
- (25) Green, N. M. [74] Spectrophotometric Determination of Avidin and Biotin. In *Vitamins and Coenzymes*; McCormick, D. B., Lemuel, W. D., Eds.; Academic Press, 1970; Vol. 18, pp 418–424.
- (26) Ebeling, W.; Hennrich, N.; Klockow, M.; Metz, H.; Orth, H. D.; Lang, H. Proteinase K from *Tritirachium Album* Limber. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47* (1), 91–97.
- (27) Waner, M. J.; Mascotti, D. P. A Simple Spectrophotometric Streptavidin-Biotin Binding Assay Utilizing Biotin-4-Fluorescein. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70* (6), 873–877.
- (28) Pierce™ Fluorescence Biotin Quantitation Kit <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/46610#/46610> (viitattu 07.01.2020).
- (29) Sensolyte® HABA Biotin Quantification Kit <https://www.anaspec.com/products/product.asp?id=44839> (viitattu 08.01.2020).
- (30) Colorimetric Biotin Assay Kit <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak171?lang=fi®ion=FI> (viitattu 08.01.2020).
- (31) Amplite™ Colorimetric Biotin Quantitation Kit <https://www.aatbio.com/products/amplite-colorimetric-biotin-quantitation-kit> (viitattu 08.01.2020).
- (32) Dotsikas, Y.; Loukas, Y. L. Application of Avidin-Biotin Technology for the Characterization of a Model Hapten - Protein Conjugate. *J. Immunoass. Immunochem.* **2005**, *26* (4), 285–293.
- (33) Green, N. M. A Spectrophotometric Assay for Avidin and Biotin Based on Binding of Dyes by Avidin. *Biochem. J.* **1965**, *94*, 23–24.

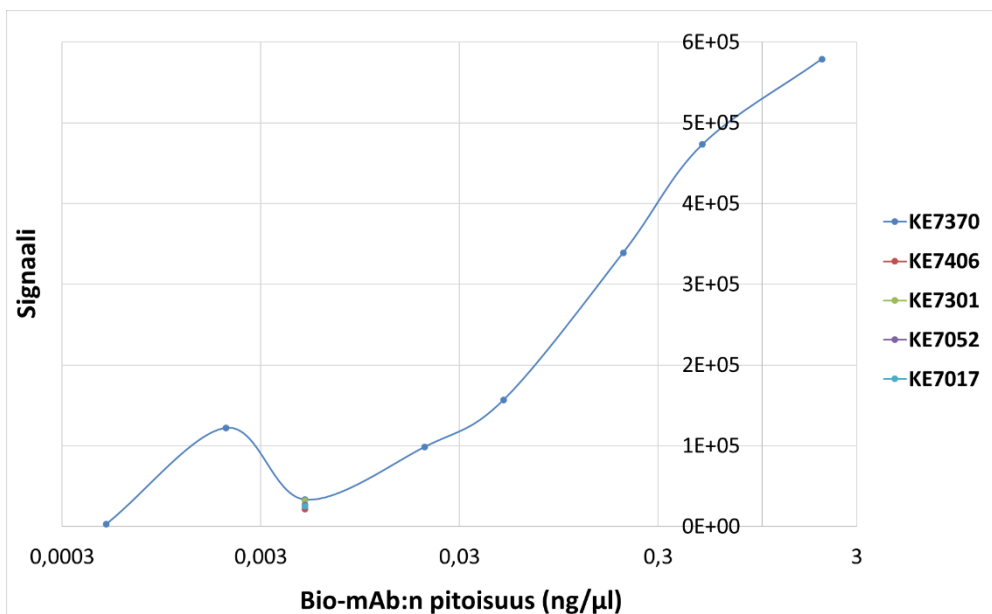
- (34) Blazer, L. L.; Boyle, M. D. P. Use of Protein Chip Mass Spectrometry to Monitor Biotinylation Reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74* (3), 717–722.
- (35) Barbarakis, M. S.; Daunert, S.; Bachas, L. G. Effect of Different Binding Proteins on the Detection Limits and Sensitivity of Assays Based on Biotinylated Adenosine Deaminase. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3* (3), 225–229.
- (36) Barbarakis, M. S.; Qaisi, W. G.; Daunert, S.; Bachas, L. G. Observation of “Hook Effects” in the Inhibition and Dose-Response Curves of Biotin Assays Based on the Interaction of Biotinylated Glucose Oxidase with (Strept)Avidin. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (4), 457–460.
- (37) Barbarakis, M. S.; Smith-Palmer, T.; Bachas, L. G.; Chen, S. Y.; Van Der Meer, B. W. Enhancement of the Emission Intensity of Fluorophore-Labeled Avidin by Biotin and Biotin Derivatives. Evaluation of Different Fluorophores for Improved Sensitivity. *Talanta* **1993**, *40* (7), 1139–1145.
- (38) Miller, B. T.; Collins, T. J.; Nagle, G. T.; Kurosky, A. The Occurrence of O-Acylation during Biotinylation of Gonadotropin- Releasing Hormone and Analogs. Evidence for a Reactive Serine. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (8), 5060–5069.
- (39) Adamczyk, M.; Gebler, J. C.; Mattingly, P. G. Characterization of Protein-Hapten Conjugates. 2. Electrospray Mass Spectrometry of Bovine Serum Albumin-Hapten Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (4), 475–481.
- (40) Cull, M. G.; Schatz, P. J. Biotinylation of Proteins in Vivo and in Vitro Using Small Peptide Tags. **2000**, *326* (1996), 430–440.
- (41) Der-Balian, G. P.; Gomez, B.; Masino, R. S.; Parce, J. W. A Fluorometric Method for Determining the Degree of Biotinylation of Proteins. *J. Immunol. Methods* **1990**, *126* (2), 281–285.
- (42) Mei, G.; Pugliese, L.; Rosato, N.; Toma, L.; Bolognesi, M.; Finazzi-Aggro, A. Biotin and Biotin Analogues Specifically Modify the Fluorescence Decay of Avidin. *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 559–565.
- (43) Theissen, G.; Richter, A.; Lukacs, N. Degree of Biotinylation in Nucleic Acids Estimated by a Gel Retardation Assay. *Anal. Biochem.* **1989**, *179* (1), 98–105.
- (44) Dakshinamurti, K.; Constable, R. J. Isotope Dilution Assay for Biotin. *Anal. Biochem.* **1974**, *61* (1), 225–235.

LIITTEET

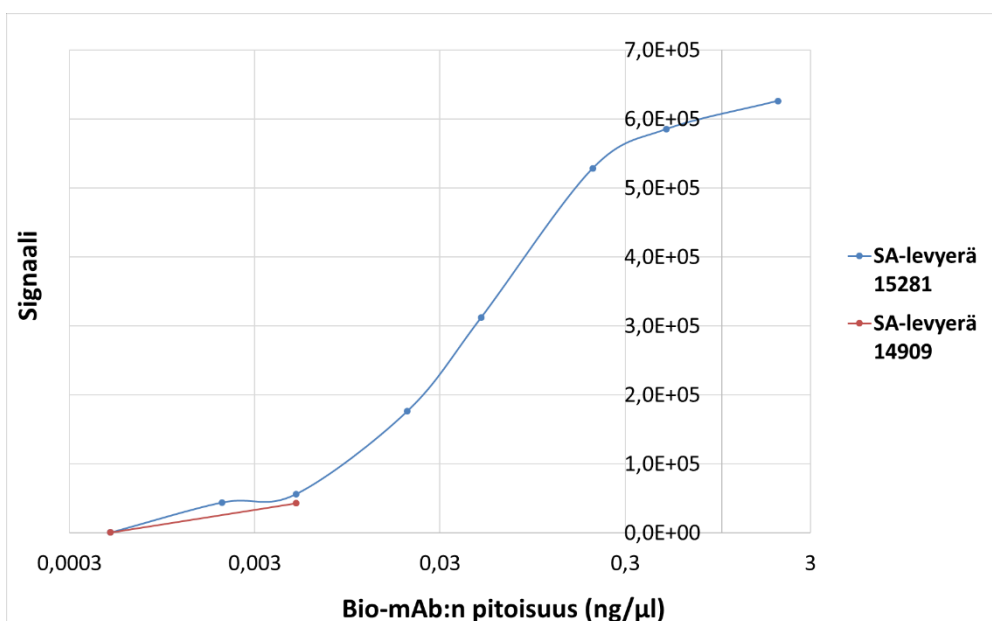
Liite 1. Kokonaan SA-levyllä tehdyt testit (ei immunomääritysvaihetta).



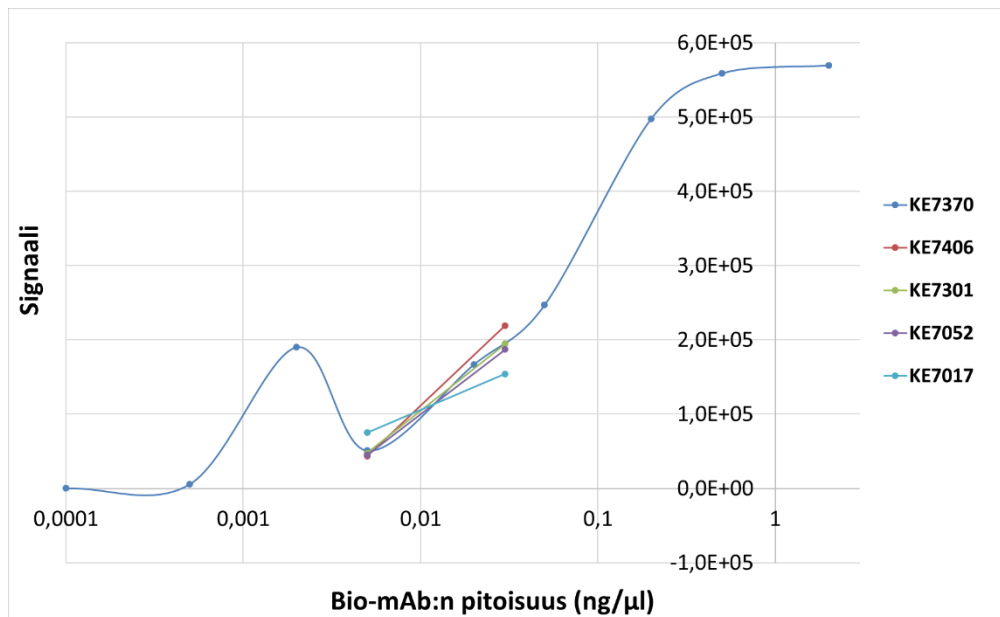
Kuva 44. Bio-mAb-eristä KE7370 JA KE7017 laimennetuille näytteille mitatut signaalit, kun testi tehtiin kokonaan SA-levyllä ilman immunomääritysvaihetta. Käytetyn leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl (PerkinElmer).



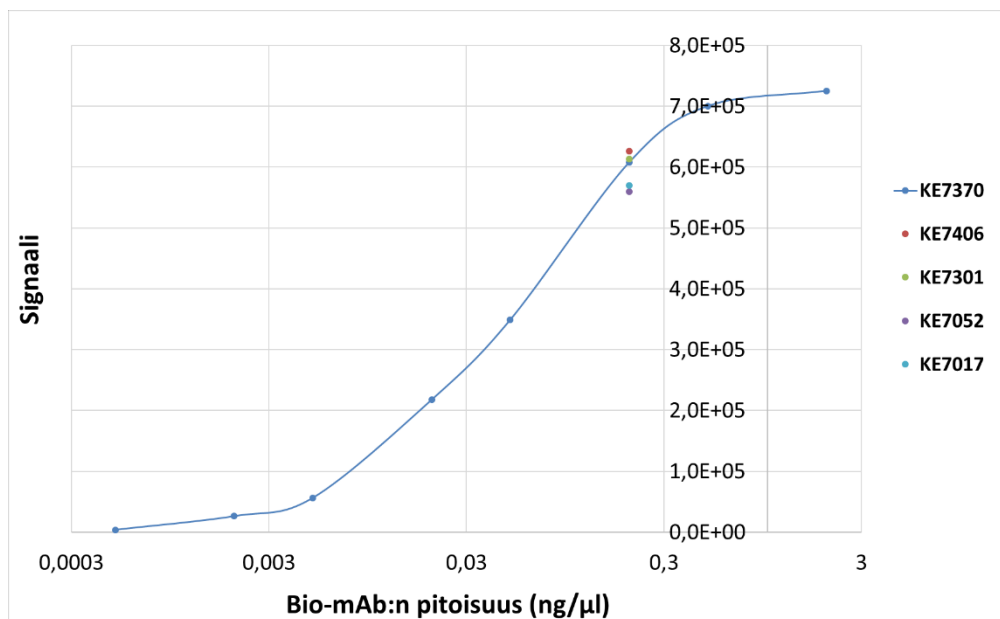
Kuva 45. Bio-mAb-erälle KE7370 mitattu standardikäyrä ja Bio-mAb-erille KE7406, KE7301, KE7052 ja KE7017 mitatut signaalit näytepitoisuudella 0,005 ng/μl, kun testi tehtiin kokonaan SA-levyllä ilman immunomääritysvaihetta. Käytetyn leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl (PerkinElmer).



Kuva 46. Standardikäyrä Bio-mAb-erälle KE7370 SA-levyerällä 15281 ja saman Bio-mAb-erän signaalit näytepitoisuuksilla 0 ja 0,005 ng/μl SA-levyerällä 14909, kun testi tehtiin kokonaan SA-levyllä ilman immunomääritysvaihetta. Käytetyn leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl (PerkinElmer).

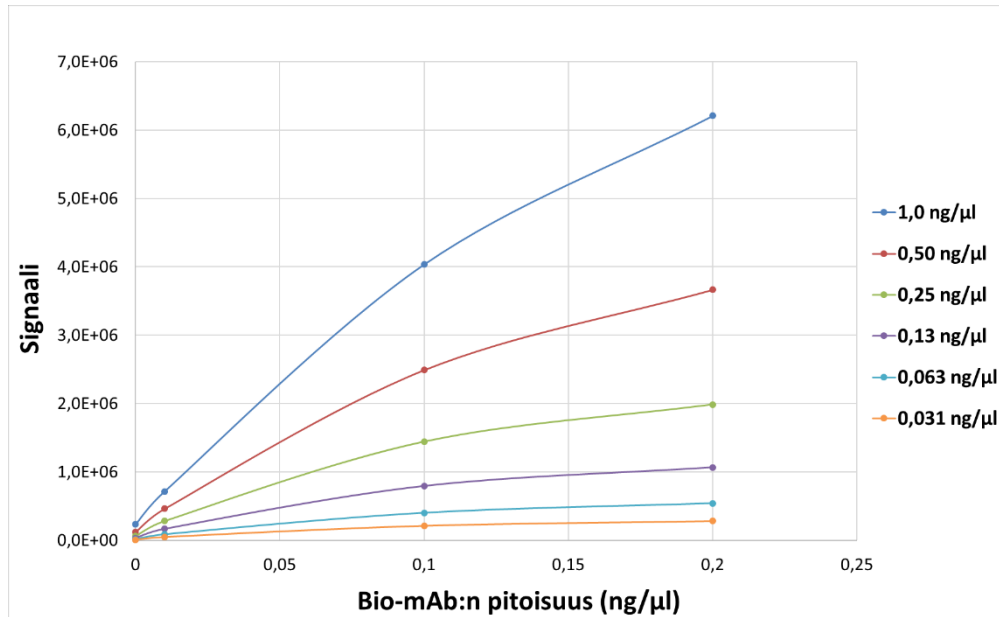


Kuva 47. Bio-mAb-erälle KE7370 mitattu standardikäyrä ja Bio-mAb-erille KE7406, KE7301, KE7052 ja KE7017 mitatut signaalit näytepitoisuuksilla 0,005 ja 0,03 ng/μl, kun testi tehtiin kokonaan SA-levyllä ilman immunomääritysvaihetta. Käytetyn leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl (PerkinElmer).

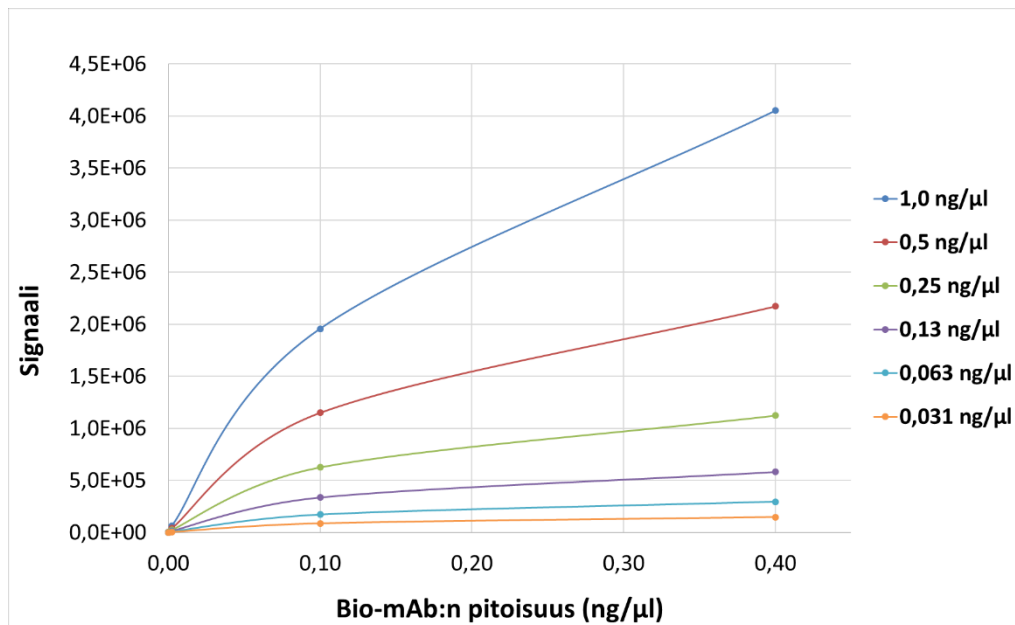


Kuva 48. Bio-mAb-erälle KE7370 mitattu standardikäyrä ja Bio-mAb-erille KE7406, KE7301, KE7052 ja KE7017 mitatut signaalit näytepitoisuudella 0,20 ng/μl, kun testi tehtiin kokonaan SA-levyllä ilman immunomääritysvaihetta. Käytetyn leiman pitoisuus oli 0,063 ng/μl (PerkinElmer).

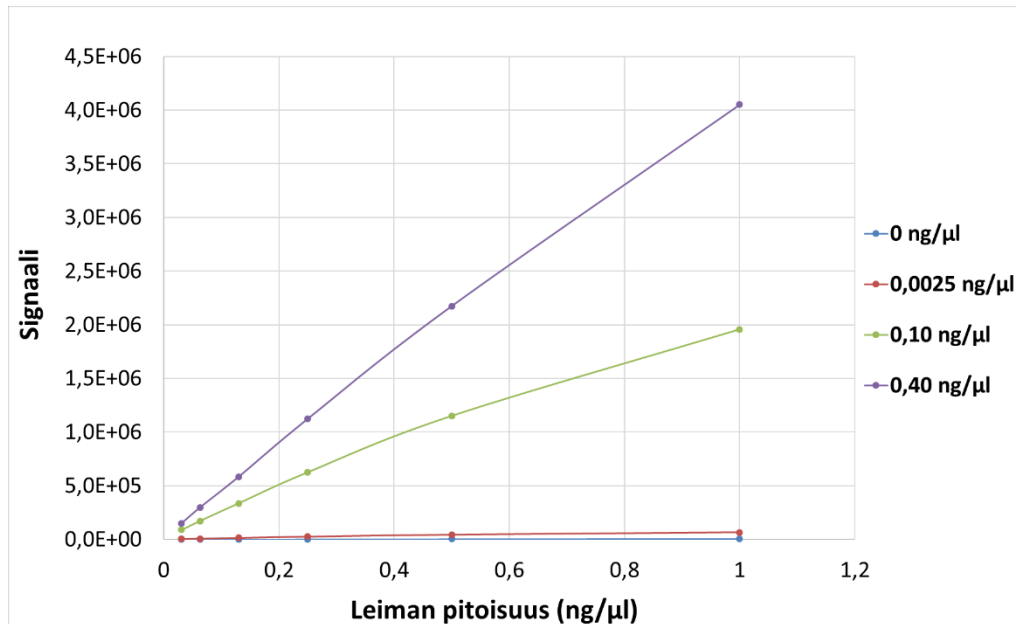
Liite 2. Leima ja sen pitoisuuden optimointi.



Kuva 49. Bio-mAb-pitoisuuden (KE7370) vaikutus mitattuun signaaliin eri leimapitoisuuksilla (PerkinElmer).

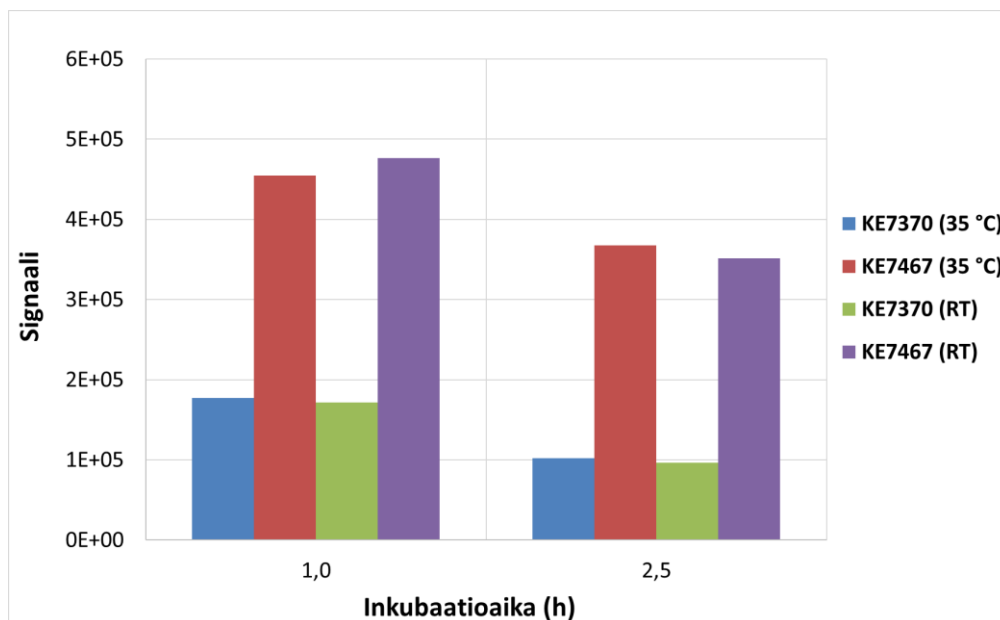


Kuva 50. Bio-mAb-pitoisuuden (KE7370) vaikutus mitattuun signaaliin eri leimapitoisuuksilla (Kaivogen Oy).

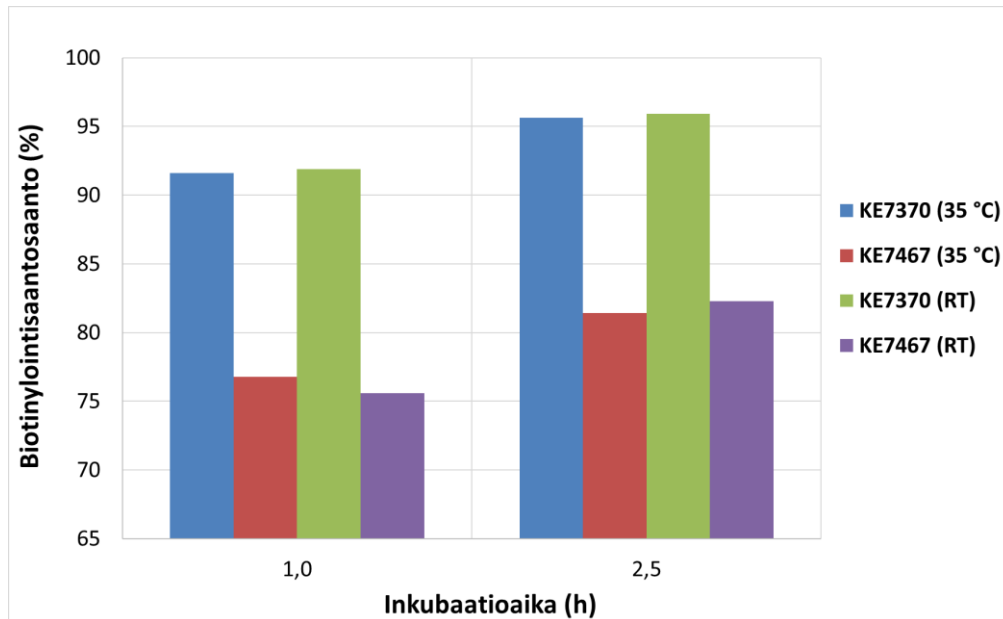


Kuva 51. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuuden vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb-pitoisuuksilla (KE7370).

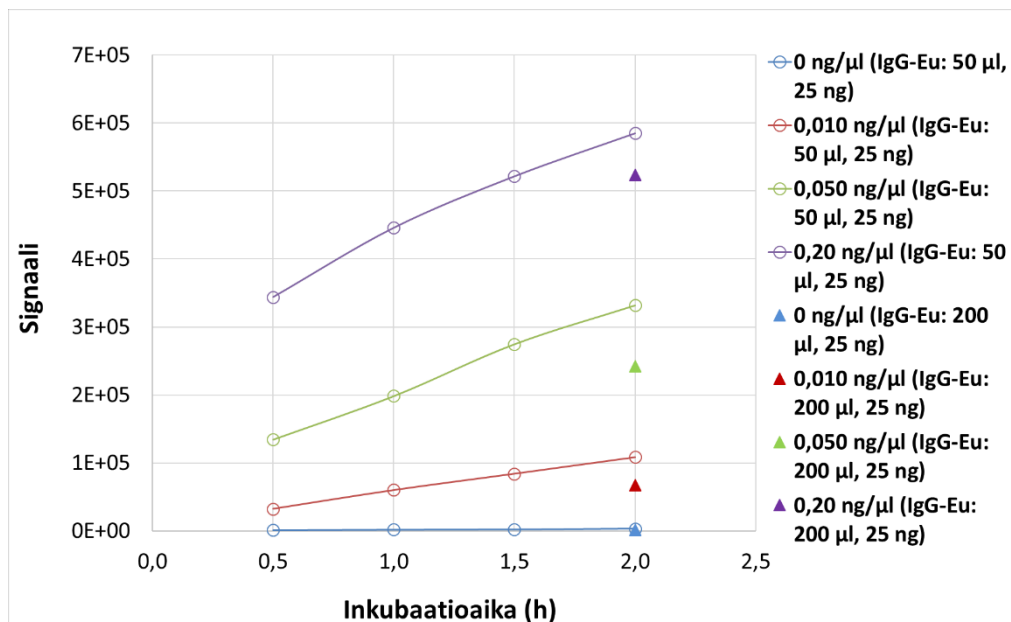
Liite 3. Reaktiokinetiikan testaus.



Kuva 52. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin, kun Bio-mAb-eriä KE7370 ja KE7467 inkuboitin kahdessa eri lämpötilassa ja analyytin pitoisuus näytteessä oli 0,19 ng/μl. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin. RT: huoneenlämpö.

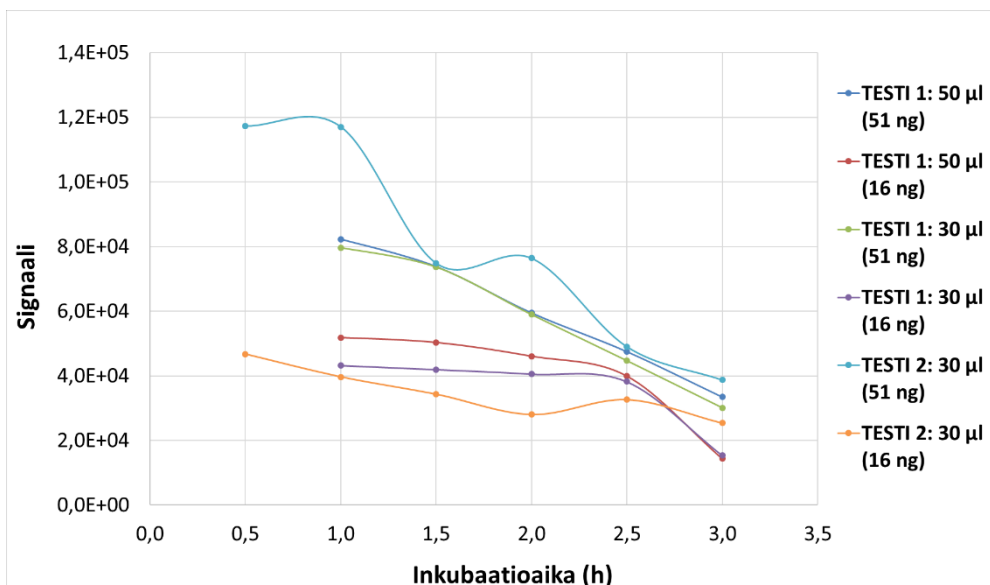


Kuva 53. Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus määritettyyn biotinylointisaantoon, kun Bio-mAb-eriä KE7370 ja KE7467 inkuboitii kahdessa eri lämpötilassa ja analyytin pitoisuus näytteessä oli 0,19 ng/μl. Standardisuoran sovituksessa hyödynnettiin lineaarista interpolaatiota. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,50 ng/μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin. RT: huoneenlämpö.

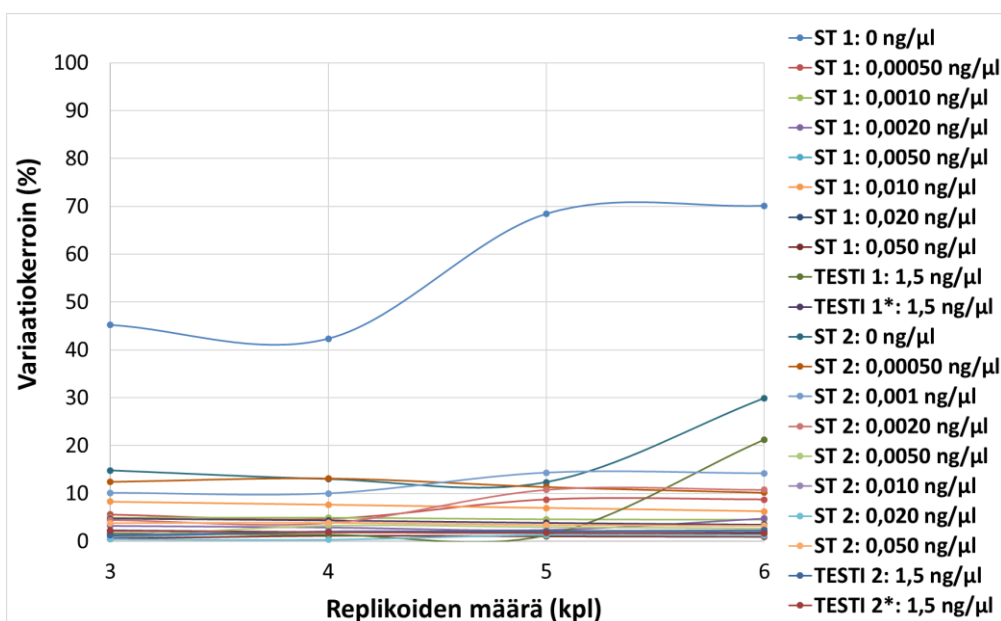


Kuva 54. Leiman biotinyloitumattomaan mAb:iin sitoutumisen (vaihe 3) inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin eri Bio-mAb:n pitoisuuksilla (KE7370) ja leiman tilavuuksilla (Kaivogen Oy). Vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.

Liite 4 Vaiheen 1, jossa biotinyloitunut mAb sitoutuu SA-levylle, inkubaatioajan vaikutus mitattuun signaaliin, kun näytettä (KE7370) pipetoitiin SA-levylle 30 tai 50 μl ja Bio-mAb:n massa näytteessä oli 16 tai 51 ng. TESTI 1: SA-levyllä mahdollisesti tapahtuvaa haihtumista ei yritetty estää. TESTI 2: SA-levyllä mahdollisesti tapahtuvaa haihtumista pyrittiin vähentämään. Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/ μl ja vaiheen 2 inkubaatioaika oli lyhennetty 0,5 tuntiin.



Liite 5. Variaatiokertoimet eri määrällä näytoreplikoita, kun viimeisinä mitatut näytoreplikat jätettiin pois laskuista, kun replikoiden määrää vähennettiin. Näytteet, joiden pitoisuus oli 1,5 ng/ μl , käsiteltiin vaiheessa 2 alkuperäisen ja kappaleen 7.3.4.2 (merkitty *:llä) mukaisen protokollan avulla. Näytettä pipetoitiin SA-levylle 30 μl ja leimana käytettiin Kaivogen Oy:n valmistetta pitoisuudessa 0,13 ng/ μl . Vaiheen 1 inkubaatioaika oli 2,5 h ja vaiheen 2 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä oleville näytteille ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.



Liite 6. Standardikuvaajat, kun standardit mitattiin optimoidulla menetelmällä niin, että toisiin standardeihin lisättiin SA:a molaarisesti 100-kertainen määrä Bio-mAb:iin (KE7370) verrattuna (Standardit+SA). Kaivogen Oy:n leiman pitoisuus oli 0,13 ng/μl. Vaiheen 2 inkubaatioaika oli 0,5 h. Hiiren IgG-vasta-ainetta tunnistavalla levyllä standardeihin ei lisätty 100 μl Bio-mAb-puskuria.

