

OsloMet – storbyuniversitetet
 Fakultet for teknologi, kunst og design
 Institutt for maskin, elektronikk og kjemi
 Postboks 4 St. Olavs plass, 0130 Oslo
 Telefon: 67 23 50 00

PROSJEKT NR. 9
TILGJENGELIGHET Åpen

BACHELOROPPGAVE

BACHELOROPPGAVENS TITTEL Utvikling av kompetitive immunoassay for deteksjon av tyroksin	DATO 23.05.2019
	ANTALL SIDER / BILAG 42/1
FORFATTERE Bendik Aasen Frosta og Sivert J.G. Klæbo	INTERN VEILEDER Hanne Thomassen

UTFØRT I SAMMARBEID MED Thermo Fisher Scientific	EKSTERN VEILEDER Ingrid Manger
---	---------------------------------------

<p>SAMMENDRAG</p> <p>I denne oppgaven ble et kompetitivt immunoassay utviklet for deteksjon av fritt tyroksin ved bruk av små magnetiske kuler (Dynabeads). Det kompetitive immunoassayet ble optimalisert med hensyn på sterkere signal og sensitivitet. Kulene ble koblet til fritt tyroksin og tyroksin konjugert til bovine serum albumin. Det ble sett på koblingsparametre som ligandkonsentrasjon, saltkonsentrasjon og pH og hvordan dette påvirket kulene i det kompetitive assayet. Assayprosedyren ble kulekonsentrasjonen og deteksjonsantistoffkonsentrasjonen optimalisert.</p> <p>En prosedyre for kobling av M-270 karboksylsyrekuler til fritt tyroksin ble utviklet. Kulene hadde høyest sensitivitet for deteksjon av tyroksin i et kompetitivt assay med antistoffet antityroksinklon 1H1, kulekonsentrasjonen på 0,05 mg/mL og deteksjonsantistoffkonsentrasjon på 0,0125 µg/mL.</p>

3 STIKKORD Dynabeads™
 Tyroksin
 Kompetitiv immunoassay

Innhold

1. Innledning	4
2. Teori	5
2.1. Antistoff og antigen	5
2.2. Dynabeads™	6
2.2.1. Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1	6
2.2.2. Dynabeads™ M-270 Epoksy og Dynabeads™ MyOne™ Epoksy	6
2.2.3. Dynabeads™ M-270 karboksylsyre og Dynabeads™ MyOne™ karboksylsyre	6
2.2.4. Dynabeads™ M-270 Amin	6
2.2.5. Dynabeads™ M-280 tosylaktivert og Dynabeads™ MyOne™ tosylaktivert	7
2.3. Immunoassay	7
2.4. Optimalisering	7
2.5. MODDE	8
2.6. Bicinchoninic acid assay	9
3. Materialer og metoder	10
3.1. materialer	10
3.1.1. utstyr	10
3.1.2. Programmer	10
3.1.3. Kjemikalier	10
3.2. Metode	11
3.2.1. Kobling av T4-BSA til Epoksy, Tosyl og Karboksylsyrekuler	11
3.2.2. Optimalisering av kobling med T4-BSA til MyOne Epoksy og M-280 Tosyl	14
3.2.3. Sonikering av aggregerte MyOne epoksy	15
3.2.4. Optimalisering av kulekonsentrasjonen i kompetitiv assay	15
3.2.5. Direktekobling til karboksylsyre-, epoksy- og aminkuler	15
3.2.6. Utvelgelse av deteksjonsantistoffklon for direktekoblede M-270 karboksylsyre	17
3.2.7. Optimalisering av direktekoblingsprosedyre	17
3.2.8. Optimalisering av kompetitiv assay for direktekoblede M-270 karboksylsyre	17
3.2.9. Undersøke optimal konsentrasjon for deteksjonsantistoff	17
4. Resultater og diskusjon	18
4.1. Utvikling av kompetitiv assay med T4-BSA	18
4.1.1. Kobling av T4-BSA til Epoksy-, Tosyl- og Karboksylsyrekuler	18
4.1.2. Optimalisering av kobling med T4-BSA til MyOne Epoksy og M-280 Tosyl	20

4.1.3.	Videre optimalisering av koblingsprosedyre for MyOne epoksy.....	25
4.1.4.	Sonikering av aggregerte MyOne epoksy	26
4.1.5.	Optimalisering av kulekonsentrasjon i kompetitiv assay.....	28
4.2.	Direktekobling av tyroksin til kuleoverflater	30
4.2.1.	Direktekobling av fritt tyroksin til karboksylsyre-, epoksy- og aminkuler	30
4.2.2.	Utvelgelse av deteksjonsantistoffklon for M-270 karboksylsyre.....	31
4.2.3.	Optimalisering av direktekoblingsprosedyre	33
4.2.4.	Optimalisering av kompetitiv assay med M-270 karboksylsyre	36
4.2.5.	Undersøke optimal konsentrasjon for deteksjonsantistoff i kompetitivt assay.....	38
5.	Konklusjon	40
6.	Referanseliste.....	41
Bilag A	43

Forord

Denne oppgaven ble utført hos Thermo Fisher Scientific som avsluttende bacheloroppgave ved Fakultet for teknologi, kunst og design, OsloMet – storbyuniversitetet. Det praktiske arbeidet for oppgaven ble startet i januar 2019 og avsluttet i april 2019.

En stor takk til ekstern veileder Ingrid Manger for god veiledning, opplæring og høy tilgjengelighet under hele oppgaven. Vi vil også takke Janne K. Eidem, Ausra Kaleckiene, Elisabeth Breivold og Axl A. Neurauter, samt alle som har vært tilstede og svart på spørsmål hos Thermo Fisher Scientific.

Til slutt en takk til vår interne veileder og førsteamanuensis ved OsloMet, Hanne Thomassen for oppklaring og oppfølging under skriveprosessen.

Sammendrag

Målet med oppgaven var å utvikle og optimalisere et kompetitivt immunoassay med Dynabeads™ for deteksjon av tyroksin. Tyroksin er et hormon som blir produsert i skjoldbruskkjertelen. For liten eller stor produksjon av tyroksin kan føre til forskjellige symptomer og sykdommer. Oppgaven var todelt og fokuserte først på kobling av tyroksin konjugert med bovine serum albumin (BSA) til en kuleoverflate, hvor det er BSA som mest sannsynlig kobles til kuleoverflaten. Del to fokuserte på kobling av fritt tyroksin. Tyroksin er et lite molekyl og krever derfor en annen koblingsprosedyre enn tyroksin-BSA.

Optimalisering startet med en sammenlikning av kuler med ulike overflater som ble koblet til fritt tyroksin eller tyroksin-BSA i et kompetitivt assay, for deretter en optimalisering av kobling- og kompetitiv assay prosedyren for å øke signalet og sensitiviteten, som er i hvor stor grad signalet synker ved tilsetning av en høyere konsentrasjoner av tyroksin. Optimaliseringen ble utført ved hjelp av et program som bruker statistikk (MODDE) for design av eksperimenter og modellering. Under optimaliseringen ble parametere som pH, konsentrasjon av reagenser, inkuberingstemperatur og inkuberingstider undersøkt.

Ved sammenlikning av ulike kule typer koblet til tyroksin-BSA ble det funnet at M-280 tosyl og MyOne epoksy hadde et tilstrekkelig signal med lav varians og den høyeste sensitiviteten for 1,0 og 2,8 µm kulestørrelsene. Det ble laget statistiske modeller for å bestemme bidraget fra ligandkonsentrasjonen, saltkonsentrasjonen og pH i koblingsprotokollen hvor responser som ble sett på var signal for null-prøven (B0), proteinbindingsgrad og målt mengde protein påkoblet kulen. For M-280 tosyl viste resultatene kun en signifikant sammenheng mellom en økt pH og større B0. For MyOne epoksy var det en signifikant positiv sammenheng mellom økt ligandkonsentrasjon og ammoniumsulfat under koblingen med proteinmengden påkoblet til kulene, men også en redusert sensitivitet og en lavere B0. MyOne epoksy ble valgt for videre forsøk da den hadde flere muligheter for optimalisering av sensitiviteten. Det ble funnet at en reversering av aggregering for MyOne epoksy kuler ved sonikering med probe hadde en signifikant, men svak økning av B0 uten å påvirke sensitiviteten.

For kompetitiv assay med MyOne epoksy med tyroksin-BSA førte en redusert kulekonsentrasjon til høyere B0 fra 0-400 pg tyroksin/mL og en økt sensitivitet for kompetitiv assayet ved alle tyroksinkonsentrasjonene som ble testet fra 0-3200 pg/mL. Kulekonsentrasjonen varierte fra 0,2-0,025 mg/mL. 0,05 mg/mL var den laveste konsentrasjonen før variansen ble stor.

For direktekobling av fritt tyroksin, uten konjugert BSA, til kuleoverflater ble flere kuleoverflater forsøkt koblet og testet for deteksjon med tre antityroksin klon: 1H1, XM212 og T4YCH. M-270 karboksylsyre fikk en tilstrekkelig B0 for kvantifisering og den høyeste sensitiviteten med klon 1H1. Koblingsprosedyren ble optimalisert med hensyn på ligandkonsentrasjon, inkuberingstid og konsentrasjonen av NHS og EDC, for aktivering av karboksylsyregruppene. Kun ligandkonsentrasjonen hadde en signifikant påvirkning og førte til et lavere signal, men høyere sensitivitet for assayet.

For kompetitiv assayet med M-270 karboksylsyre koblet til fritt tyroksin ble kulekonsentrasjonen og deteksjonsantistoffkonsentrasjonen i protokollen optimalisert for å få høyere sensitivitet. Kulekonsentrasjonen varierte fra 0,025-0,075 mg/mL og antistoffkonsentrasjonen fra 0,025-0,075 µg/mL. Resultatene indikerte at en redusert konsentrasjon av deteksjonsantistoff økte sensitiviteten til immunoassayet, men reduserte B0. Høyere kulekonsentrasjon hadde en positiv effekt på B0, men var ikke-signifikant for sensitiviteten.

Ved kobling av Tyroksin-BSA ble det funnet at MyOne epoksy hadde den høyeste sensitiviteten for deteksjon av tyroksin ved en ligandkonsentrasjon på 5 µg ligand/mg kuler, ammoniumsulfat konsentrasjon på 1,5 M og inkubert i en fosfatbuffer med pH 8. Kompetitiv assayet med MyOne epoksy påkoblet tyroksin-BSA hadde en optimal kulekonsentrasjon på 0,05 mg/mL. For det kompetitive assayet med M-270 karboksylsyre koblet til fritt tyroksin fikk deteksjonsantistoffet antityroksin klon 1H1 med en konsentrasjon på 0,0125 µg/mL lav varians og høy sensitivitet.

1. Innledning

Thermo Fisher Scientific produserer små magnetiske kuler som heter Dynabeads. Dynabeads har mange bruksområder innen celleisolering, molekylære applikasjoner, blodprøver, immunoassay og mye mer. Derfor jobber ThermoFisher kontinuerlig med utvikling og forbedring av ulike relevante assayformater for modellsystemer, der de tester nye kuler, buffere, antistoffer og mer.

Antigenet tyroksin er et hormon som blir produsert i skjoldbruskkjertelen og er viktig for metabolismen, vekst og normal utvikling. For mye eller for lite produksjon av tyroksin kan føre til forskjellige symptomer og sykdommer (Berg, 2018).

Målet med denne oppgaven var å utvikle og optimalisere et kompetitiv immunoassay for deteksjon av antigenet tyroksin (T4). Fritt antigen og antigen koblet til Dynabeads vil konkurrere i et kompetitivt immunoassay. Antigenene konkurrerer om plassen på et enzym-merket antistoff. Antigene koblet til Dynabeads er enten fritt tyroksin eller tyroksin konjugert til bovint serum albumin (T4-BSA). Enzymet som ble benyttet var alkalisk fosfatase (AP). Dette enzymet reagerer når en tilsetter et substrat til prøven og danner kjemiluminescens. Lyssignalet avleses av en plateleser. En standardkurve lages med lyssignalet fra løsninger med kjente konsentrasjoner av tyroksin og konsentrasjonen av tyroksin i en ukjent prøve kan bestemmes.

Dynabeads har ulike reaktive kuleoverflater som gir dem ulike bruksområder og egenskaper. Streptavidinkuler er et eksempel, der proteinet streptavidin er på overflaten av kulen og kan påkobles biotinyleret antigen, som kan brukes til deteksjon av tyroksin. Problemet med streptavidinkuler er at de kan skape en uønsket interferens med biotin som kan føre til at en blodprøve blir falsk positiv eller falsk negativ (Gifford, Sadrzadeh & Naugler, 2018). I dette prosjektet var hensikten å utvikle et kompetitivt immunoassay for tyroksin der en sammenlignet mulighetene av alternative kuletyper. Det ble brukt et etablert immunoassay basert på streptavidinkuler som kontroll og utgangspunkt for assay med T4.

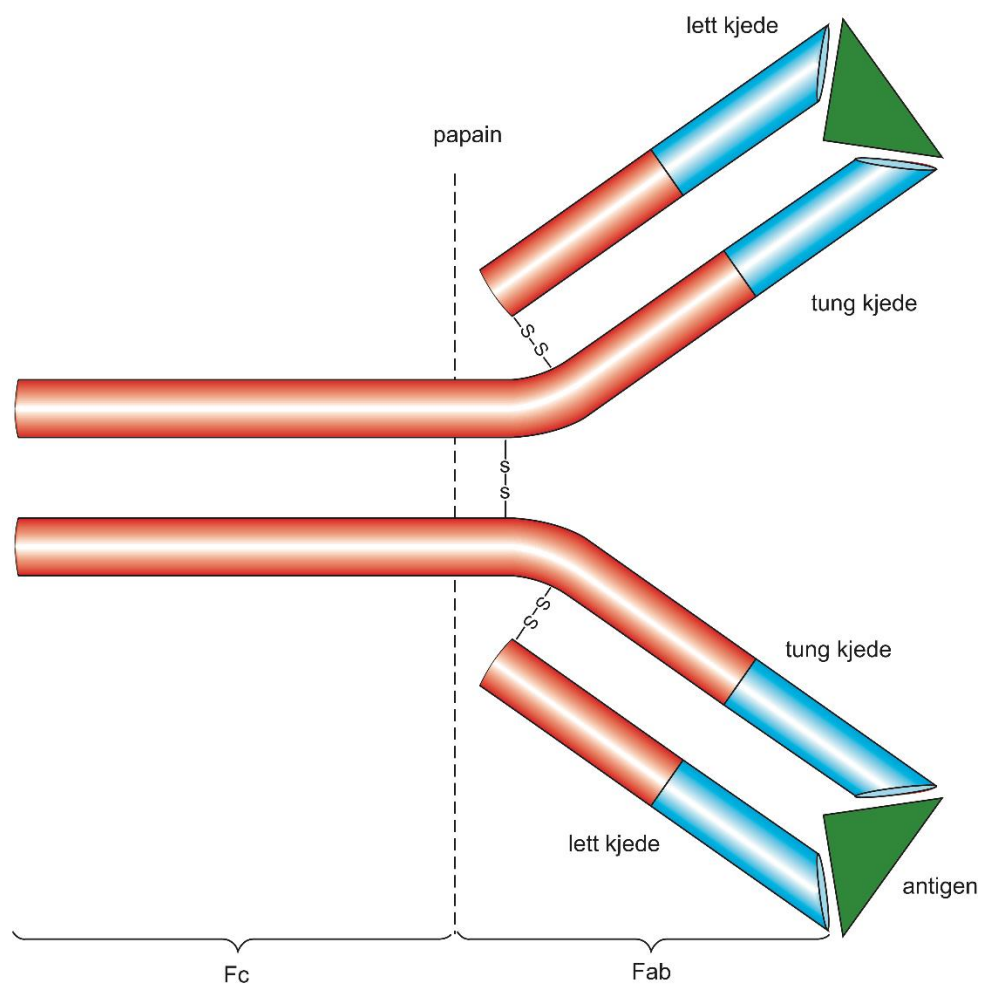
For å nå dette målet ble det først sammenlignet ulike kuletyper i et kompetitivt immunoassay. Deretter en optimalisering av kobling med tyroksin på kuler. For koblingene ble ulike parametere undersøkt som pH, konsentrasjon av ulike reagenser, inkuberingstemperatur og inkuberingstid. Etter en sammenligning og optimalisering av koblingsprosedyrer for ulike kuler var hensikten å utvikle et kompetitivt immunoassay der parameterne i prosedyren som ulike antistoffer, konsentrasjoner av reagenser, inkuberingstemperatur og inkuberingstid varieres for å finne optimale verdier med hensyn på økt sensitivitet for deteksjon av tyroksin.

2. Teori

2.1. Antistoff og antigen

Menneskekroppen har et immunforsvar som beskytter den mot bakterier og andre inntrengere. Antistoffer hjelper å beskytte mot disse inntrengerne. B-celler i kroppen lager antistoffer som fester seg spesifikt til antigen som er en del av overflaten til en bakterie eller et molekyl. Det interessante med antistoffer er bruksområdene under en rekke kjemiske analyser der de binder seg til et ønsket molekyl (Merck, u.å). Ved å bruke antistoffer som kan binde seg til et spesifikt antigen kan en bruke dette til immunoassay eller andre kjemiske analyser.

Det finnes flere forskjellige typer antistoffer, men den mest vanlige under kjemiske analyser er av typen immunglobulin G (IgG), som vist i Figur 1. IgG er bygget opp med to lette og to tunge kjeder som er bundet sammen med disulfidbroer. Antistoffet har to N-terminaler på hvert variabelt område (Merck u.å).



Figur 1. IgG struktur som består av to lette og to tunge kjeder som er koblet sammen med disulfidbroer. Antigen vil feste seg på det variable området på antigenet. Bilde er hentet fra: <https://sml.sn.no/immunglobulin>.

2.2. Dynabeads™

Dynabeads er små paramagnetiske kuler med lik størrelse, som enten er 1,0 µm (MyOne) eller 2,8 µm (M-270 og M-280). Dynabeads er mobile i løsning som øker interaksjonen mellom kulene og løsningen. Kulene er dekket med et reaktivt ytre lag som vil kunne binde seg til en rekke forskjellige forbindelser. Noen eksempler på ytre lag er epoksy, karboksylsyre, tosyl og amin. Dersom en utsetter løsningen for et magnetisk eller elektromagnetisk felt vil de paramagnetiske kulene samles på innsiden av beholderen og en kan lett fjerne supernatanten (ThermoFisherScientific, u.å.-g).

Det kan oppstå aggregering av Dynabeads, som vil si at kulene bindes til hverandre og vil samle seg som store klumper. Aggregering kan fjernes/reverseres med sonikering i et sonikeringsbad eller med en sonikeringsprobe.

2.2.1. Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1

MyOne™ Streptavidin er superparamagnetiske kuler. Et enkelt lag av proteinet streptavidin er koblet kovalent til overflategruppene på kulen som så blir blokkert med BSA for å hindre uspesifikk binding av antistoff. Streptavidin T1 kuler har en sterk affinitet for biotin og anbefales derfor for isolasjon av biotinylerede nukleinsyrer, antistoffer og andre biotinylerede analytter (ThermoFisherScientific, u.å.-f).

2.2.2. Dynabeads™ M-270 Epoksy og Dynabeads™ MyOne™ Epoksy

M-270 Epoksy og MyOne™ Epoksy er polystyrenkuler dekket med et krysslinter lag av hydrofil polyeter med epoksy-grupper langs overflaten. Epoksygruppene gjør at antistoffer eller andre proteiner kan binde seg kovalent til kulen gjennom primære amino- og tiolgrupper. Den lave ikke spesifikk bindingen kulen har til proteiner gjør at det ikke er nødvendig med blokkeringsprotein for koblingen. Kobling skjer ved nøytral pH, høy saltkonsentrasjon og kan foregå ved et stort spekter av temperaturer for bedre stabilitet av hva som kobles på. (ThermoFisherScientific, u.å.-d, u.å.-e).

2.2.3. Dynabeads™ M-270 karboksylsyre og Dynabeads™ MyOne™ karboksylsyre

M-270 karboksylsyre og MyOne™ karboksylsyre er hydrofile kuler dekket med propanolsyregrupper. Den hydrofile gruppen gir lite ikke-spesifikk binding til aminosyrer. Karboksylsyrekuler må først aktiveres med et karbodiimid, i dette forsøket EDC/NHS, for så å kunne binde seg kovalent til en ligand med primære amino- eller tiolgrupper. (ThermoFisherScientific, u.å.-b, u.å.-c).

2.2.4. Dynabeads™ M-270 Amin

M-270 Amine er kuler dekket med et hydrofilt lag av glycidyl med aminogrupper på overflaten. Ved reduktiv aminering av aldehyder kan det dannes kovalente bindinger av aminogruppene til karbohydrater, glykolipider og glykoproteiner. (ThermoFisherScientific, u.å.-a).

2.2.5. Dynabeads™ M-280 tosylaktivert og Dynabeads™ MyOne™ tosylaktivert

M-280 tosylaktivert og MyOne tosylaktivert er hydrofobe kuler som er dekket med p-toluensulfonyl (tosyl). Tosyl kuler kan danne en kovalent binding med primære amin- eller tiolgrupper. Tosyl kuler er bra for å koble antistoffer, peptider, intakte proteiner og funksjonelle enzymer (ThermoFisherScientific, u.å.-g, u.å.-h).

2.3. Immunoassay

Immunoassay er en metode for å kvantifisere og detektere ukjente konsentrasjoner av biologiske analytter ved bruk av antistoffer og antigen. Antigenet er ofte analytten en skal analysere. Det finnes flere forskjellige formater av immunoassay, som ELISA. ELISA har tre ulike metoder som er sandwich immunoassay, kompetitiv binding immunoassay og antigen down immunoassay (NCBI 2014).

Kompetitiv immunoassay med Dynabeads ble brukt under oppgaven. Fordeler med å bruke Dynabeads framfor ELISA plater er at de har en større overflate, mer interaksjon mellom antistoff/antigen og at det er lettere å automatisere.

Fritt antigen og antigen koblet til Dynabeads vil konkurrere i et kompetitivt immunoassay. Antigenene konkurrerer om plassen på et enzym merket antistoff. Antigen koblet til Dynabeads er enten fritt tyroksin eller tyroksin konjugert til bovint serum albumin. Enzymet som ble benyttet var alkalisk fosfatase. Dette enzymet reagerer når det tilsettes et substrat til prøven som fører til dannelse av kjemiluminescens. Lyssignalet avleses av en plateleser. En standardkurve lages med lyssignalet fra løsninger med kjente konsentrasjoner av tyroksin og konsentrasjonen av tyroksin i en ukjent prøve kan bestemmes.

Signalet som måles av plateleseren er Relative Light Units (RLU) som er et forholdstall for målt lys. Signalene som måles danner en hyperbolsk kurve siden fri tyroksin og tyroksin på kulene konkurrerer mot hverandre. Når konsentrasjonen av tyroksin øker, vil mindre tyroksin påkoblet til kuler kunne binde seg til antistoffet og signalresponsen minker (NCBI 2014).

2.4. Optimalisering

Optimalisering av et kompetitivt immunoassay er viktig for god robusthet og sensitivitet. Affiniteten mellom antigen og antistoff bestemmer ofte selektiviteten til assayet. Dette betyr at det er viktig å bestemme en optimal temperatur, salt og pH verdi for å få en høy affinitet. Siden kompetitive immunoassay har en hyperbolsk kurve er det ønskelig at den er brattest mulig. Kompetitive assay er også følsomme for endringer i matrisen der andre komponenter kan interferere med konkurransen

(NCBI 2014). For å kunne se sammenhengen mellom faktorer som temperatur, salt, inkubasjonstid og pH, kan en bruke statistiske eksperimentelle designverktøy, som for eksempel MODDE.

2.5. MODDE

MODDE er et statistisk eksperimentelt verktøy som hjelper til med forsøksplanlegging og analysering av data. Med MODDE kan en velge forskjellige designmetoder. Metoden som ble brukt under denne oppgaven var et fullfaktorisk design. MODDE vil også lage en matematisk og statistisk modell ut ifra resultatene og vil vise søyleverdier av R² (R-kvadrat), Q², modellgyldighet og reproduserbarhet. Disse søyleverdiene vil ha en verdi mellom 0 til 1 der 1 representerer en perfekt modell.

Full faktorisk design analyserer alle interaksjonene mellom faktorene og faktorene alene i et forsøk. Dersom faktorene øker vil antall prøver ha eksponentiell vekst. Dette kan uttrykkes som (2^k) , der k er antall faktorer. Dersom en har tre faktorer (2^3) behøver modellen åtte prøver pluss tre senterpunkter. Prøvene vil bli satt til høye og/eller lave verdier innenfor valgt parameterområde. Senterpunktene er tre like prøver som har verdier i sentrum av valgt parameterområde. Senterpunktene bestemmer reproduserbarheten for modellen.

R² er prosent av variasjonen til responsen forklart av modellen. R² er et mål på hvor bra data passer modellen. For en god modell er en høy verdi av R² nødvendig. En R² verdi over 0,7 regnes som en god modell. En kan få lav R² på grunn av dårlig reproduserbarhet, modellgyldighet eller for få frihetsgrader.

Q² er prosent variasjon av responsen forutsatt av modellen i henhold til kryssvalidering. Q² forteller hvor bra modeller forutsier ny data og en bra modell bør ha en stor Q², helst over 0,5. Q² vil være dårlig når eksperimentet har dårlig reproduserbarhet eller dårlig modellgyldighet. R² og Q² bør være like store for en god modell og de bør ikke ha variasjon større enn 0,3.

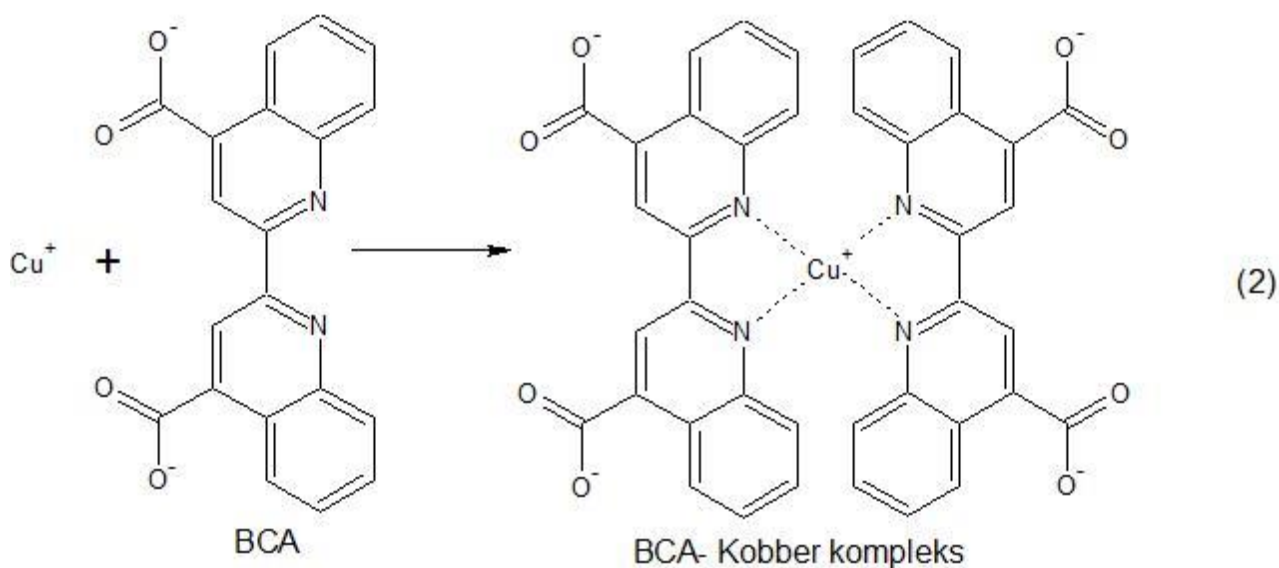
Modellgyldighet er et mål for gyldigheten til modellen. Når modellgyldigheten er større enn 0,25 er modellen innenfor den reelle feilen. Modellgyldighet på 1 representerer en perfekt modell. En verdi under 0,25 blir modell feil større en reelle feil (Nist, u.å).

Reproduserbarhet er variansen mellom responsen under de samme kondisjonene.

Reproduserbarheten blir regnet ut med variansen mellom tre senterpunkter på eksperimentet. Det er ønskelig med en reproduserbarhet nærmest 1,0. Med høyere variasjon vil modellen bli mer unøyaktig og kan føre til en dårlig modell.

2.6. Bicinchoninic acid assay

Bicinchoninic acid (BCA) assay kan benyttes for å bestemme proteininnhold i en prøve. Metoden baserer seg på to reaksjoner. Den første reaksjonen er mellom aminosyrer og peptidbindinger som reduserer Cu^{2+} til Cu^{1+} i en basisk løsning, se reaksjonsligning (1). Den andre reaksjonen danner et BCA-kobber-kompleks, se reaksjonsligning (2). Dette komplekset er vannløselig og danner en intens lilla farge som kan måles spektrofotometrisk ved 562 nm. Det blir laget en kurve fra målt intensitet som med en regresjon med fire parametre kan omgjøres til en standardkurve. Det er fire aminosyrer som bidrar til reduksjon av kobber som er cystein eller cystin, tyrosin og tryptofan (ThermoFisherScientific, u.å -i).



3. Materialer og metoder

3.1. materialer

3.1.1. utstyr

Ruller: Stuart, analogue tube roller, STR9,

Plate: Grimer-bio-one, 96 well, White U-shaped, Cat# 650207

Forseilingstape: Costar, Cler polyethylene non sterile, Cat# 6524

Risteinkubator på 37 °C: Heidolph incubator 1000, 1000 rpm

Risteinkubator på romtemperatur: Heidolph Triamax 100, 1000 rpm

Magnet: Life technologies, MPC 96S, Cat#120.27

Life technologies, DynaMag-15, Cat# 12301D

Dynal MPC

Invitrogen, Dynal

Plate avleser: BioTek Synergy 4

BioTek Synergy 2

Mikroskop: Leica microsystems, Leica DM1000 LED

Leica microsystems, Ltd CH9435 Heerbrugg

Sonikering bad: Elma, Ultrachall lärmschutzbox

Elma, Transsonic T 570

Sonikator probe: Dr Hielscher UP 100H ultraschallprozessor

Pierce BCA Protein Assay Kit: Thermo Scientific, ref# 23225, Lot: TF268086

3.1.2. Programmer

Gen5: BioTek, Gen5 Microplate Reader and Imager Software

MODDE: MKS instruments AB, MODDE versjon 12

3.1.3. Kjemikalier

Life technologies, Dynabeads™ MyOne Streptavidin T1 38,9 mg/mL, prod.nr: 434301

Life technologies, Dynabeads™ MyOne Epoxy: Thermofisher Scientific, Lot: 125966700 prod.nr: 34002D

Life technologies, Dynabeads™ M-270 Epoxy: Thermofisher Scientific, Lot: 1962592 prod.nr: 14301

Life technologies, Dynabeads™ MyOne Tosyl: Thermofisher Scientific, prod.nr: 65501

Life technologies, Dynabeads™ M-280 Tosyl: Thermofisher Scientific, 30 mg/mL Lot: 00669651, prod.nr: 14203

Life technologies, Dynabeads™ MyOne Carboxylic Acid: Thermofisher Scientific, 10 mg/mL Lot:

1834525, prod nr: 65011

Life technologies, Dynabeads™ M-270 Carboxylic Acid: Thermofisher Scientific, 100mg/mL Lot:

K4582 (AMI-270/152), prod.nr: 14305D

Life technologies, Dynabeads™ M-270 Amine, ~30 mg/mL, prod nr: 14307D

RO vann

L-tyroxin natrium salt pentahydrat: Merck, 888,93 g/mol Lot; BCBV2999

Tyroxin, 3200 pg/mL fortynnet med 0,1M boratbuffer.

Anti-tyroxin monoclonal, Hytest, prod.nr: 2T6, klon 1H1 merket med AP, 4 µg/mL

Substrat: Life Technology DynaLight Substrate med RapidGlow: Cat#4475410 1xTBST pH 7,4 med 42

mM Tris HCl, 8 mM trizma base, 140 mM NaCl, 3 mM NaN₃ og 0,9 mM Tween 20

Boratbuffer 0,1 M pH 9,5, Borax 381,37 g/mol

Fosfatbuffer 0,1 M pH 7,4 med NaH₂PO₄*H₂O 137,99 g/mol og Na₂HPO₄*2H₂O 177,99 g/mol

T4-BSA, 1mg/mL, ICP 1327, Lot: 122013

PBS pH 7,4 med 1,9 mM NaH₂PO₄*H₂O 137,99 g/mol, 16,2 mM Na₂HPO₄*2H₂O og 150 mM NaCl

1 M Tris HCl: med 563 mM Tris HCl 157,60 g/mol og 437,5 mM Tris base 121,14 g/mol 99,9%

Ammoniumsulfat 3M, (NH₄)₂SO₄ 132,14 g/mol

EDC: Merck, Lot: BCBQ3618V

NHS: Merck, 115,09 g/mol, Lot: BCBD1270, 97%

DSMO: Merck, 78,13 g/mol, Lot: STBH3571, 99,9%

MES 15 mM pH 5,9: BS3: Merck, 572,43 g/mol, Lot: #JA117779

2,2'-(etylendioksy)dietylamin 50%: Fluka

3.2. Metode

3.2.1. Kobling av T4-BSA til Epoksy, Tosyl og Karboksylsyrekuler

3.2.1.1. *Protokoll for kobling av MyOne Streptavidin T1*

Protokollen beskriver hvordan tyroksin-BSA koblet til MyOne Streptavidin T1 ble laget. Prosedyren ble brukt for å lage en positiv kontroll for kompetitiv immunoassay.

1. Pipetter 5 mg MyOne Streptavidin T1 i et rør
2. Sett på magnet og fjern supernatanten
3. Vask med 2.5 mL PBS pH 7,4
4. Resuspender i 2,4 mL PBS og bland med whilmixer
5. Tilsett 100 µL Biotinylert T4-BSA og bland med whirlmixer

6. Sett røret på rulle i 30 min
7. Fjern supernatanten
8. Vask to ganger med 2,5 mL PBS 7,4
9. Vask med 2,5 mL TBST
10. Resuspender kulene i 2,5 mL TBST 2 mg/mL

3.2.1.2. Protokoll for kobling av tyroksin-BSA til MyOne Epoksy og M-270 Epoksy

Protokollen beskriver hvordan koblingen av tyroksin-BSA til MyOne Epoksy og M-270 Epoksy ble laget.

1. Vei inn 5 mg Dynabeads™ MyOne Epoksy eller M-270 Epoksy i en tube
2. Tilsett 500 µL fosfatbuffer pH 7,4, bland på whirlmixer i 10-30 sekunder og soniker i et sonikeringsbad i 2x3 min
3. sett på magnet i 1-2 min og fjern supernatanten
4. Repeter trinn 2 og 3
5. Tilsett fosfatbuffer pH 7,4: 85 µL til MyOne og 100 µL til M-280
6. Soniker for 2x3 min
7. Tilsett 40 µL T4-BSA til MyOne og 25 µL antistoff til M-280
8. Bland på whirlmixer
9. Tilsett 125 µL 3M ammoniumsulfat i fosfatbuffer pH 7,4
10. Bland på whirlmixer og inkuber på rulle over natten på 37 °C
11. Vask kulene tre ganger i 500 µL TBST
12. Resuspender kulene med TBST til 4 mg/mL

3.2.1.3. Protokoll for kobling av tyroksin-BSA til MyOne Tosyl og M-280 Tosyl.

Protokollen beskriver hvordan koblingen av tyroksin-BSA til MyOne tosyl og M-280 tosyl ble laget.

1. Tilsett 5 mg Dynabeads™ MyOne Tosyl eller M-280 Tosyl i en tube
2. Tilsett 500 µL fosfatbuffer pH 7,4, bland på whirlmixer i 10-30 sekunder og soniker i et sonikeringsbad i 2x3 min
3. sett på magnet i 1-2 min og fjern supernatanten
4. Repeter trinn 2 og 3
5. Tilsett fosfatbuffer pH 7,4: 125 µL til MyOne og 140 µL til M-280
6. Soniker for 2x3 min
7. Tilsett tyroksin-BSA: 40 µL til MyOne og 25 µL for M-280

8. Bland på whirlmixer
9. Tilsett 85 µL 3M ammoniumsulfat i fosfatbuffer pH 7,4
10. Bland på whirlmixer og inkuber på rulle over natten på 37 °C
11. Vask kulene tre ganger i 500 µL TBST
12. Resuspander kulene i TBST til 4 mg/mL

3.2.1.4. Protokoll for kobling av tyroksin-BSA til MyOne karboksylsyre og M-270 karboksylsyre

Protokollen beskriver hvordan koblingen av tyroksin-BSA til MyOne karboksylsyre og M-270 karboksylsyre ble laget. I trinn 4 ble inkuberingen satt til 33 min etter andre vask.

1. Tilsett 5 mg Dynabeads™ MyOne karboksylsyre eller M-270 karboksylsyre i en tube
2. Tilsett 1000 µL MES 15 mM pH 6.0, bland på whirlmixer i 10-30 sekunder og inkuber på rulle i 10 min.
3. sett på magnet i 1-2 min og fjern supernatanten
4. Repeter trinn 2 og 3 to ganger
5. Tilsett MES 15 mM pH 6.0: 197 µL for MyOne og 212 µL for M-270
6. Tilsett tyroksin-BSA: 40 µL for MyOne og 25 µL for M-270
7. Bland på whirlmixer og inkuber på rulle 30 min i romtemperatur
8. tilsett 13 µL EDC løsning, forbered i nytt kaldt vann
9. Bland på whirlmixer og inkuber på rulle 2 timer i romtemperatur
10. Vask kulene tre ganger i 1000 µL TBST og inkuber i 10 min hver gang
11. Resuspander kulene i TBST til 4 mg/mL

3.2.1.5. Protokoll for immunoassay

Protokollen beskriver hvordan kulene med påkoblet tyroksin-BSA ble testet. Streptavidin kuler ble brukt som kontroll. I trin 7 ble inkuberingen satt til 22 min. Protokollen er basert på MyOne streptavidin T1 kuler koblet med tyroksin-BSA.

1. Fordel 50 µL tyroksin fra 1600 – 400 – 100 pg/mL og 0-buffer til prøve brønnene
2. Tilsett 50 µL 1H1 0,05 µg/mL til prøvebrønnene
3. Forsegl platen med forseglingssteip
4. Inkuber på en rister ved 37 °C i 20 minutter
5. Tilsett 100 µL Dynabeads 0,1 mg/mL til prøvebrønnene
6. Forsegl platen med forseglingssteip
7. Inkuber på en rister ved 37 °C i 15 minutter

8. Under inkubering ta substratet ut av kjøleskapet og varm til romtemperatur. Skru på Synergy 2 instrumentet og forbered kjøring av assay
9. Plasser mikroplaten på magnet i 2 minutter
10. Fjern supernatanten, og ta platen av magneten
11. Vask kulene tre ganger ved resuspending i 250 μL vaskebuffer (TBST). Resuspensjon skjer ved å skylle kule pelletene ved tilsetning av vaskebuffer. Plasser platen på en magnet i 2 minutter
12. Fjern supernatanten
13. Resuspender kulene i 20 μL TBST, sett på en rister. Sørg for at kulene er fullstendig i suspensjon
14. Tilsett substrat på Synergy 2 instrumentet og kjør avlesning

3.2.2. Optimalisering av kobling med T4-BSA til MyOne Epoksy og M-280 Tosyl

Protokoll som ble brukt til testing av MyOne Epoksy og M-280 tosyl er beskrevet i 3.2.1.5.

3.2.2.1. Protokoll for BCA assay

Protokollen beskriver hvordan en testet mengde tyrosin-BSA påkoblet til epoksy, tosyl og karboksyl kulene. Negative kontroller 4 mg kuler/mL ble laget ved å pipetere 67 μL av M-280 tosyl 30 mg/mL og 200 μL epoksy 10 mg/mL i hvert sitt rør. Supernatanten ble fjernet og kulene ble resuspendert til 4 mg/mL.

1. Forbered 2 mg/mL antistoff løsning fra Ab stock løsning
2. Tilsett 2 mg/mL Ab løsning til 8 forskjellige rør som vist it Tabell 1

Tabell 1. Volum av PBS, Ab og sluttkonsentrasjon for tillaging av standardkurve for BCA assay.

Vial	PBS (μL)	Ab volume (μL)	Final Ab conc. ($\mu\text{g/mL}$)
A	300	300 of stock	1000
B	250	150 of stock	750
C	300	300 of A	500
D	300	300 of C	250
E	300	300 of D	125
F	450	300 of E	50
G	300	300 of F	25
H	400	0	0

3. Lag BCA arbeidsløsning (WR) med reagens A og B, som har forhold 50:1. Pipetter 50 mL av reagens A i en beholder og 1 mL av reagens B i samme beholder.
note, WR er stabil for flere dager når den blir lagret i en lokket beholder i romtemperatur.
4. Pipetter 25 μL av hver standard og kule type til Greiner bio-one 96 brønnplate.
5. Tilsett 200 μL av WR til hver brønn.

6. Set på deknings teip på platen og inkuber på 37°C i 60 min. Avkjøl til romtemperatur.
7. Put platen på magnet i 2 min og overfør 100 µL av supernatanten til en ny 96-plate (Fluoronunc).
8. Mål absorbansen ved 562 nm på Synergy 4.

3.2.3. Sonikering av aggregerte MyOne epoksy

Protokoll som ble brukt til testing av MyOne epoksy er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble valgt to aggregerte MyOne epoksy kuler, som ble brukt til mikroskopering og immunoassay før og etter sonikering. Kulene ble sonikert med en sonikeringsprobe. Kulene ble sett under et mikroskop før og etter sonikering, der konsentrasjonen av kuler under mikroskopet ble satt til 2 mg/mL.

3.2.4. Optimalisering av kulekonsentrasjonen i kompetitiv assay

Protokoll som ble brukt til testing av M-280 tosyl og M-270 epoksy er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble brukt en standardkurve av tyroksin fra 800 – 400 – 200 – 100 – 50 pg/mL og 0-buffer. I trinn 6 i protokollen ble det tilsatt både 0,1 mg/mL og 0,2 mg/mL i forskjellige prøvebrønner.

Videre ble det undersøkt hvordan en lavere kulekonsentrasjon innvirket på kompetitiv assayet. Protokollen som ble brukt til testing av MyOne epoksy er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble brukt en standardkurve av tyroksin fra 3200 – 1600 – 800 – 400 – 200 – 100 – 50 pg/mL og 0-buffer. I trinn 6 i protokollen ble det tilsatt 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL og 0,025 mg/mL til forskjellige prøvebrønner.

3.2.5. Direktekobling til karboksylsyre-, epoksy- og aminkuler

Det ble koblet fri tyroksin til forskjellige kuletyper og størrelse som karboksylsyre, epoksy og amin kuler. Aminkulene har bare en størrelse.

3.2.5.1. Protokoll for kobling av MyOne og M-270 Karboksylsyrekuler

1. Løs tyroksin i DMSO til 2,5 mg/mL.
2. Aktiver MyOne og M-270 med 2 ekvivalenter EDC og 2,2 ekvivalenter NHS i MES-buffer pH 7. En ekvivalent tilsvarer 0,2 mmol/g MyOne kuler og 0,6 mmol/g M-270 kuler.
3. Inkuber ved romtemperatur i 30 minutter på en ruller.
4. Fjern supernatanten.
5. Tilsett tyroksin løst i DMSO. 500 µL for MyOne kuler. 188 µL for M-270.
6. Inkuber ved romtemperatur i 1 time på en ruller.
7. Vask med hhv. 500 µL DMSO, 500 µL DMSO:10 mM Tris (1:1) og 500 µL TBST.

3.2.5.2. *Protokoll for kobling av MyOne og M-270 Epoksykuler*

1. Løs tyroksin i DMSO til 2,5 mg/mL.
2. Vask kulene over til 500 µL DMSO. Først DMSO:Vann (1:1), så 3x med red DMSO.
3. Tilsett en løsning med 167 µL 50% 2,2'-(ethylenedioxy)diethylamine, Fluka# 03739 i DMSO.
4. Inkuber over natt ved 37 °C.
5. Vask med 500 µL DMSO.
6. Tilsett BS3 i DMSO (0,1 µmol/mg kuler).
7. Inkuber ved romtemperatur i 30 minutter på en ruller.
8. Fjern supernatanten og vask med 500 µL DMSO.
9. Tilsett tyroksin løst i DMSO (2,5 mg/mL). 500 µL for MyOne og 188 µL for M-270.
10. Inkuber ved romtemperatur i 30 minutter på en ruller.
11. Vask med hhv. 500 µL DMSO, 500 µL DMSO:10 mM Tris (1:1) og TBST.

3.2.5.3. *Protokoll for kobling av M-270 Aminkuler*

1. Løs tyroksin i DMSO til 2,5 mg/mL
2. Vask kulene over til 500 µL DMSO. Først 500 µL DMSO :Vann (1:1), så 3x med 500 µL DMSO.
3. Tilsett BS3 i DMSO (0,1 µmol/mg kuler).
4. Inkuber ved romtemperatur i 30 minutter på en ruller.
5. Fjern supernatanten og vask med 500 µL DMSO.
6. Tilsett 188 µL tyroksin løst i DMSO (2,5 mg/mL).
7. Vask med hhv. 500 µL DMSO, 500 µL DMSO:10 mM Tris (1:1) og TBST.

Protokoll som ble brukt til testing av M-280 tosyl og M-270 epoksy er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble tilsatt boratbuffer uten tyroksin i trinn 1. i trinn 2 ble det tilsatt tre forskjellige merkede antistoffer som var 1H1, XM212 og T4YCH 0,5 µg /mL og 0,1 µg/mL.

Negative kontroller ble laget for å teste uspesifikk binding av antigenene. Det ble laget negative kontroller (NK) for MyOne Epoksy, MyOne karboksylsyre, M-270 karboksylsyre og M-270 amin. NK MyOne epoksy ble laget ved å pipettere 50 µL fra en ukoblet MyOne epoksy løsning 4 mg/mL, supernatanten ble fjernet og resuspendert til 0,1 mg/mL. NK MyOne karboksylsyre ble laget ved å pipettere 20µL av MyOne karboksylsyre 10 mg/mL, supernatanten ble fjernet og resuspendert til 0,1 mg/mL. NK M-270 karboksylsyre ble laget ved å pipettere 2 µL av 100 mg/mL M-270 karboksylsyre og ble fortynnet til 0,1 mg/mL. NK M-270 amin ble laget ved pipettere 8 µL av 30 mg/mL M.270 amin, supernatanten ble fjernet og resuspendert til 0,1 mg/mL.

3.2.6. Utvelgelse av deteksjonsantistoffklon for direktekoblede M-270 karboksylsyre

Protokoll som ble brukt til testing av MyOne epoksy er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble brukt en standardkurve av tyroksin fra 3200 – 1600 – 800 – 400 – 200 – 100 – 50 pg/mL og 0-buffer. Det ble brukt antityroksin klon 1H1, XM212 og T4YCH med konsentrasjoner på 0,5 µg/mL og 0,1 µg/mL.

3.2.7. Optimalisering av direktekoblingsprosedyre

Protokoll som ble brukt til kobling av M-270 karboksylsyre er beskrevet i 3.2.5.1. Det ble laget et MODDE oppsett for direktekobling av M-270 karboksylsyre hvor parameterne som inkuberingstid, tyroksinkonsentrasjon og ekvivalentene EDC og NHS ble variert. Inkuberingstiden ble variert fra 15-120 min. tyroksinkonsentrasjonen ble variert til 10 µg/mg kuler og 150 µg/mg kuler. EDC og NHS ekvivalentene ble variert til 1/1,1 EDC/NHS og 3/3,3 EDC/NHS, Senterpunktene ble satt til 67,5 min inkubering, 80 µg tyroksin/mg kuler og 2/2,2 EDC/NHS ekvivalenter.

Tyroksin 2,5 mg/mL ble laget ved å veie 10,8 mg l-tyroksin i 4,32 mL DMSO.

Tyroksin 1,6 mg/mL ble laget ved å overføre 640 µL av 2,5 mg/mL tyroksin og fortynne med 560 µL DMSO.

Tyroksin 0,1786 mg/mL ble laget ved å overføre 20 µL av 2,5 mg/mL tyroksin og fortynne med 1500 µL DMSO.

11,4 mg EDC ble løst i 2,85 mL MES

9,3 mg NHS ble løst opp i 1,86 mL MES

Protokoll som ble brukt til testing av M-270 karboksylsyre er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble brukt en standardkurve av tyroksin fra 3200 – 1600 – 800 – 400 – 200 – 100 – 50 pg/mL og 0-buffer.

3.2.8. Optimalisering av kompetitiv assay for direktekoblede M-270 karboksylsyre

Protokoll som ble brukt til testing av M-270 karboksylsyre er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble brukt en standardkurve av tyroksin fra 1600 – 400 – 100 pg/mL og 0-buffer.

3.2.9. Undersøke optimal konsentrasjon for deteksjonsantistoff

Protokoll som ble brukt til testing av M-270 karboksylsyre er beskrevet i 3.2.1.5. Det ble brukt en standardkurve av tyroksin 400 – 200 – 100 – 50 pg/mL og 0-Buffer. Kulene ble testet med lavere 1H1 antistoff konsentrasjon. Det ble laget en 1:2 fortynningsrekke der en startet med en 1H1 konsentrasjon på 0,05 µg/mL og sluttet med en konsentrasjon 1/128 av 0,05 µg/mL.

4. Resultater og diskusjon

4.1. Utvikling av kompetitiv assay med T4-BSA

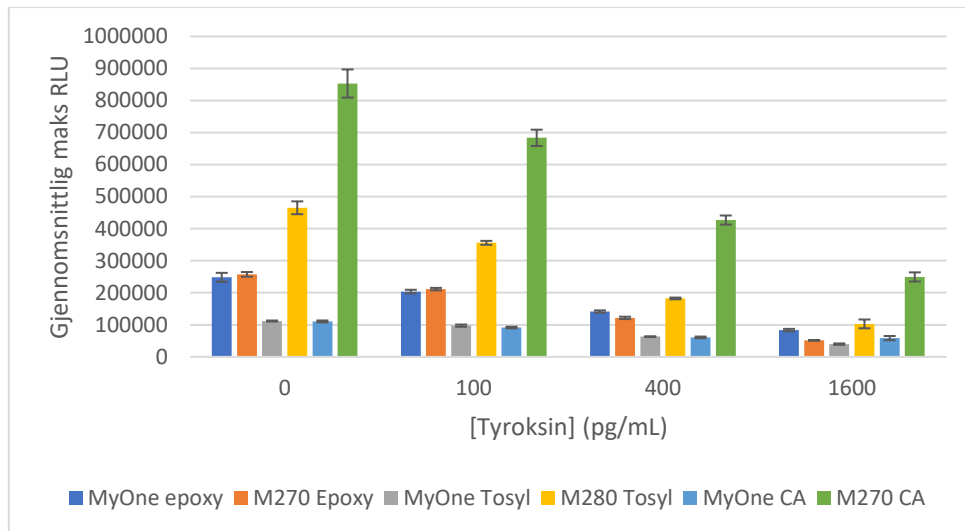
Hensikten med forsøkene var å identifisere en egnet kule for deteksjon av T4-BSA i et kompetitivt assay. Deretter ble parametere i koblingsprosedyren og kompetitiv immunoassayprosedyren undersøkt og optimalisert for å bedre sensitiviteten i det kompetitive immunoassayet.

De ulike koblingene i prosjektet ble nummerert i henhold til ThermoFishers interne koblingsarkiv. Responser som ble sett på var B0, som er RLU for null-prøve uten tilsatt T4, og proteinbindingsgraden (PBG) som er et forholdstall for signalet ved en konsentrasjon av tilsatt tyroksin i forhold til signalet for null-prøven. Proteinbindingsgraden viser i hvor stor grad tyroksin i prøven har utkonkurrert det merkede deteksjonsantistoffet om plass på kulene. En lavere proteinbindingsgrad betyr høyere konkurranse fra tyroksin i prøven. Det anbefalte området for deteksjon er fra 80-20 % bindingsgrad (I. Manger, personlig kommunikasjon, februar 2019).

4.1.1. Kobling av T4-BSA til Epoksy-, Tosyl- og Karboksylsyrekuler

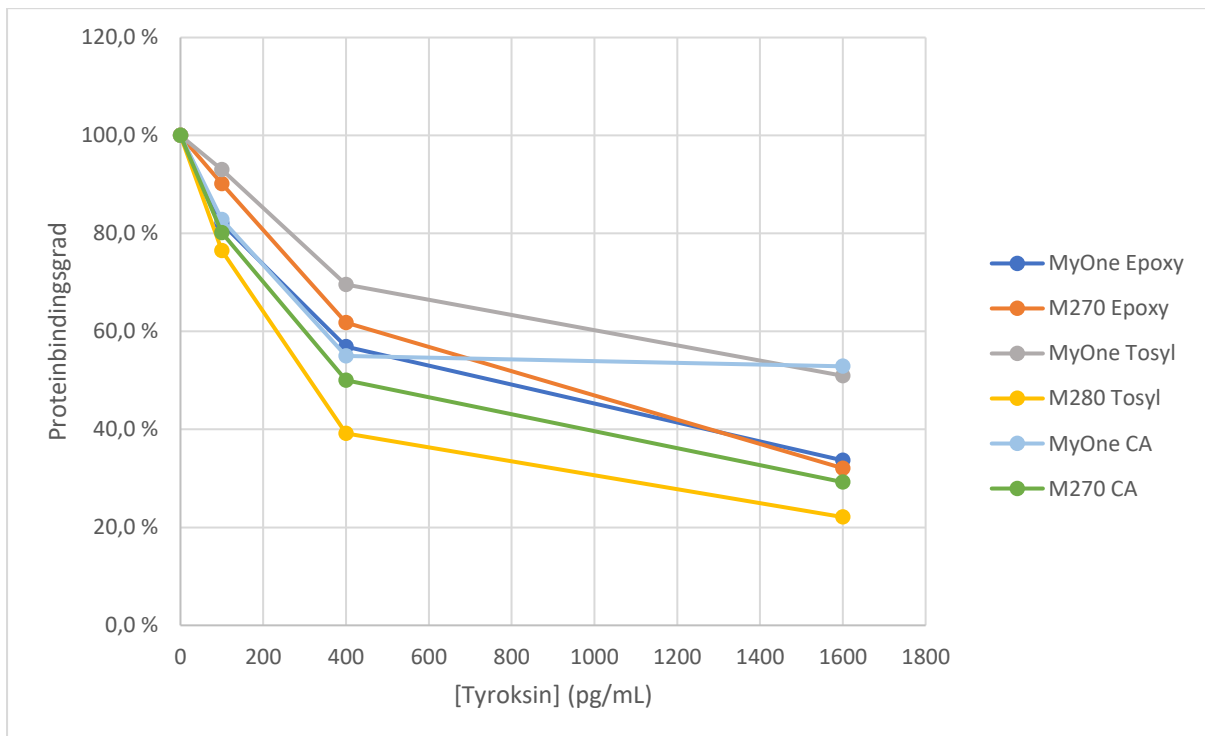
Det ble koblet flere ulike kuler til T4-BSA for å undersøke hvilke kuler som hadde tilstrekkelig B0 for kvantifisering og hadde en større reduisering av proteinbindingsgrad ved en økning av den tilsatte tyroksinkonsentrasjonen. De ulike kulene koblet til T4-BSA ble testet med en kompetitiv immunoassay protokoll utviklet for MyOne strepdavidin med AP merket anti-tyroksin klon 1H1 som deteksjonsantistoff.

MyOne karboksylsyre (CA) og MyOne Tosyl fikk de laveste signalverdiene, som vist i Figur 2. M-270 karboksylsyre hadde det høyeste signalet ved alle konsentrasjonene. M-280 tosyl og MyOne epoksy målte ikke like sterkt signal, men kunne fortsatt vært av interesse med en god proteinbindingskurve.



Figur 2 Målt gjennomsnittlig maks lum for kuler koblet til T4-BSA og testet i et kompetitivt assay .

Med unntak av MyOne karboksylsyre hadde alle proteinbindingsgradkurvene, vist i Figur 3, et lignende mønster med en synkende bindingsgrad. Under forsøket hadde denne prøven en svakere tiltrekning til magneten og fikk et høyere standardavvik ved 1600 pg/mL målepunktet. M-280 Tosyl målte både relativt høyt signal og kom innenfor deteksjonsområdet på under 80% ved 100 pg tyroksin/mL. Dette ga en bratt bindingskurve og indikerte at den hadde den beste sensitiviteten for tyroksin av kulene som ble testet.



Figur 3. Proteinbindingsgrad fra kompetitiv assay med epoksy, tosyl og karboksylsyrekuler med AP-merket antityroksin 1H1 klon som deteksjonsantistoff. Beregnet fra signalverdier i Figur 2.

4.1.2. Optimalisering av kobling med T4-BSA til MyOne Epoksy og M-280 Tosyl

Det ble valgt ut to kuler, en av hver kulestørrelse, fra innledende forsøk. M-280 Tosyl hadde en tilfredsstillende B0, med en god sensitivitet i området 50-400 pg/mL. MyOne epoksy ble valgt for videre forsøk da det var MyOne kulen som viste høyest sensitivitet i det kompetitive immunoassayet.

For kobling av kuler ble det undersøkt hvordan saltkonsentrasjonen; som ble endret ved å variere ammoniumsulfatkonsentrasjonen, pH og konsentrasjonen av T4-BSA brukt under kobling av MyOne epoksy og M280 Tosyl påvirket B0 og sensitiviteten i kompetitiv assayet. Det ble også utført BCA tester på de koblede kulene for å undersøke hvordan disse parameterne påvirket mengden T4-BSA som ble koblet på.

Oppsettet for eksperimentet, vist i Tabell 2, ble satt opp ved hjelp av MODDE, en programvare for design av eksperimenter også brukt for å bestemme faktor bidraget til responsfaktorene.

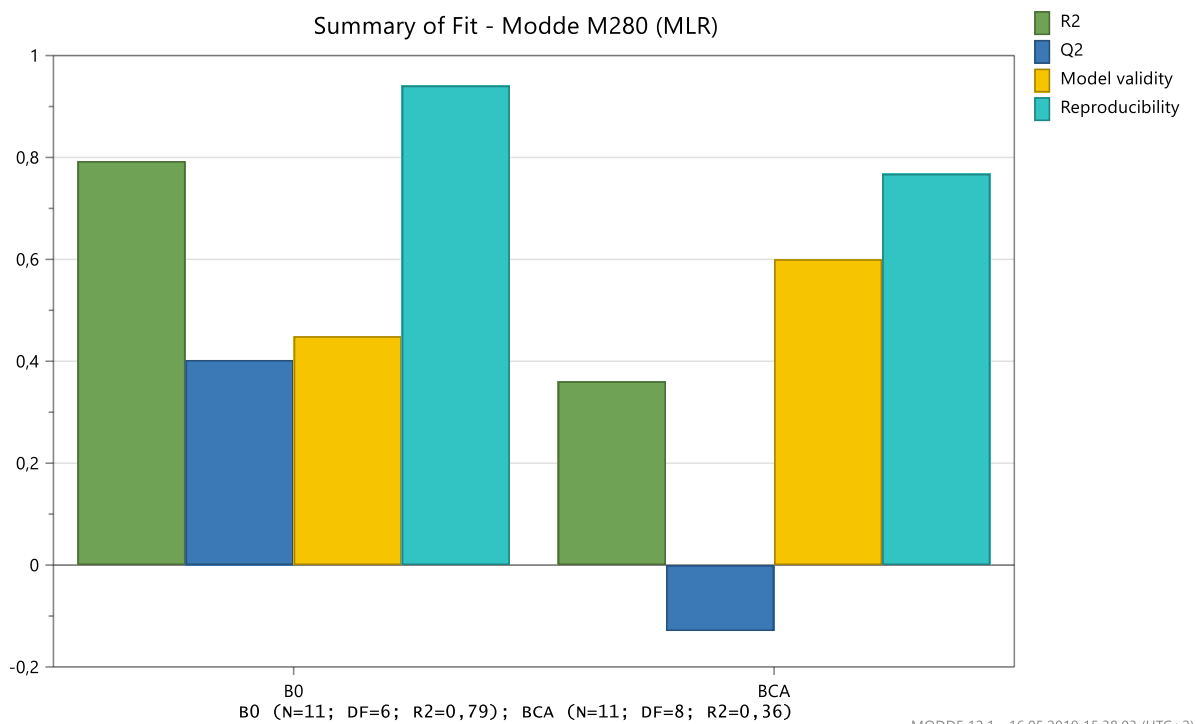
Tabell 2. Koblingsoppsett for kobling av M-280 tosyl til T4-BSA med en kulekonsentrasjon på 20 mg/mL under kobling.

Kobling nr (K.4552)	Tyrosin-BSA/kuler ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Ammoniumsulfat (M)	pH
1	4	0,7	7,4
2	4	1,5	7,4
3	10	0,7	7,4
4	10	1,5	7,4
5	4	0,7	9,5
6	4	1,5	9,5
7	10	0,7	9,5
8	10	1,5	9,5
9	7	1,1	7,4
10	7	1,1	7,4
11	7	1,1	7,4

Tilpassing av modellen fra MODDE, vist i Figur 4 ga en oversikt over de målte responsene, vist i Tabell 3 sin konformitet i forhold til hva modellen forventet. For B0 viste gyldigheten at modell usikkerheten ikke er signifikant større enn usikkerhet fra reproduserbarheten. Senterpunktene målte lavere verdi enn forventet og det var målepunkter utenfor forventet trend. For BCA ble variansen mellom R2 og Q2 $> 0,7$. Det var flere målepunkter utenfor den forventede trenden som førte til den lave Q2 verdien.

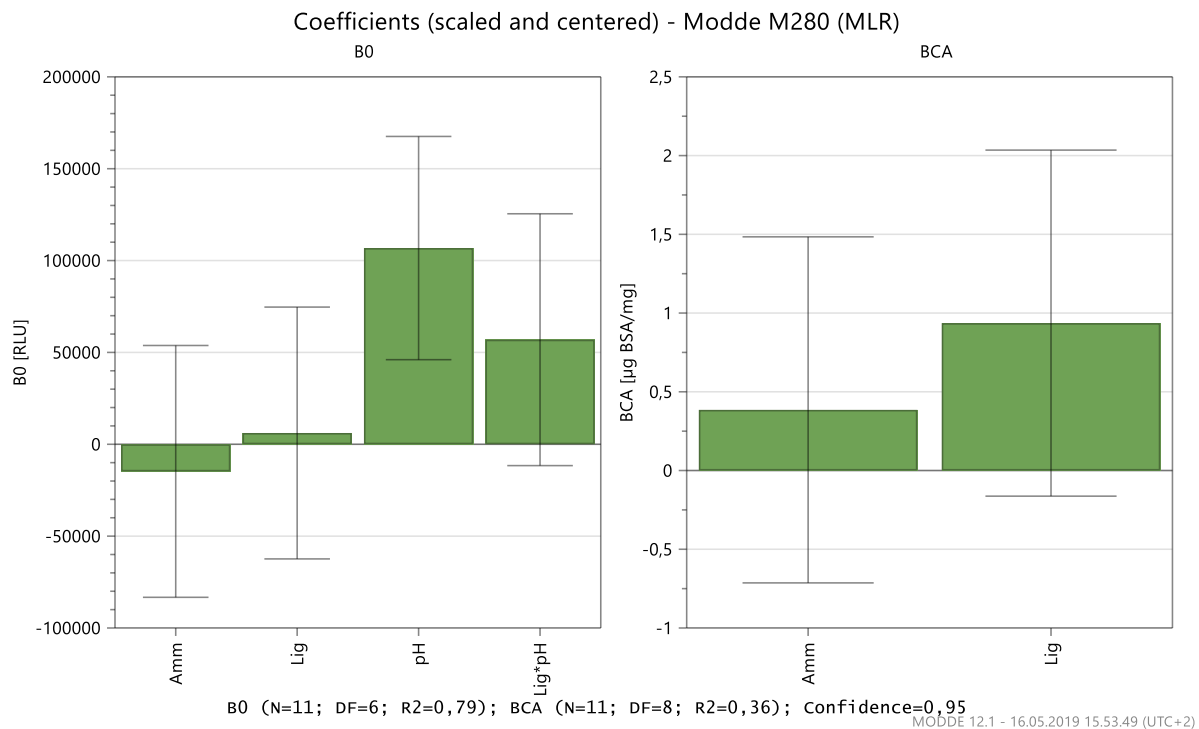
Tabell 3. Målte verdier for koblede M-280 tosyl med T4-BSA i et kompetitivt immunoassay.

Kobling nr (K.4552)	B0 (RLU)	Påkoblet protein/kule (µg/mg)
1	290278	0,24125
2	282662	0,27875
3	244660	0,78625
4	125122	4,12975
5	324072	0,79825
6	334949	1,1145
7	456573	2,81025
8	454745	2,19475
9	138631	2,84925
10	97530	3,367
11	73875	4,284



Figur 4. Tilpassing av modell med B0 og BCA for M-280 Tosyl koblinger ved endring av pH, T4-BSA og saltkonsentrasjoner.

For M-280 tosyl førte en økning av pH til en positiv påvirkning på B0, som vist i Figur 5. Oppsettet med M-280 tosyl for BCA test ga ingen klare resultater da modellen kun hadde ikke-signifikante faktorer og indikerte at mengden protein koblet til kulene med metoden var robust innenfor parameterverdier som ble variert.



Figur 5. Oversikt over hvordan saltkonsentrasjon, pH og ligandkonsentrasjon påvirket B0 og BCA assay i modellen for M280 Tosyl. Amm var ammoniumsulfatkonsentrasjon og Lig var ligandkonsentrasjon.

MyOne epoksy ble koblet til T4-BSA med et faktorielt design oppsett for kobling satt opp ved hjelp av MODDE, vist i Tabell 4. og målte responser i et kompetitivt immunoassay med koblingene i Tabell 5.

Tabell 4. Koblingsoppsett for kobling av MyOne epoksy til T4-BSA med en kulekonsentrasjon på 20 mg/mL i løsningen under kobling.

Kobling nr (K.4559)	Tyrosin-BSA/kuler ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Ammoniumsulfat (M)	pH
1	5	0,7	7
2	5	1,5	7
3	15	0,7	7
4	15	1,5	7
5	5	0,7	8
6	5	1,5	8
7	15	0,7	8
8	15	1,5	8
9	10	1,1	7,4
10	10	1,1	7,4
11	10	1,1	7,4

Tabell 5. Målte verdier for koblede MyOne epoksy med T4-BSA i et kompetitivt immunoassay og BCA assay.

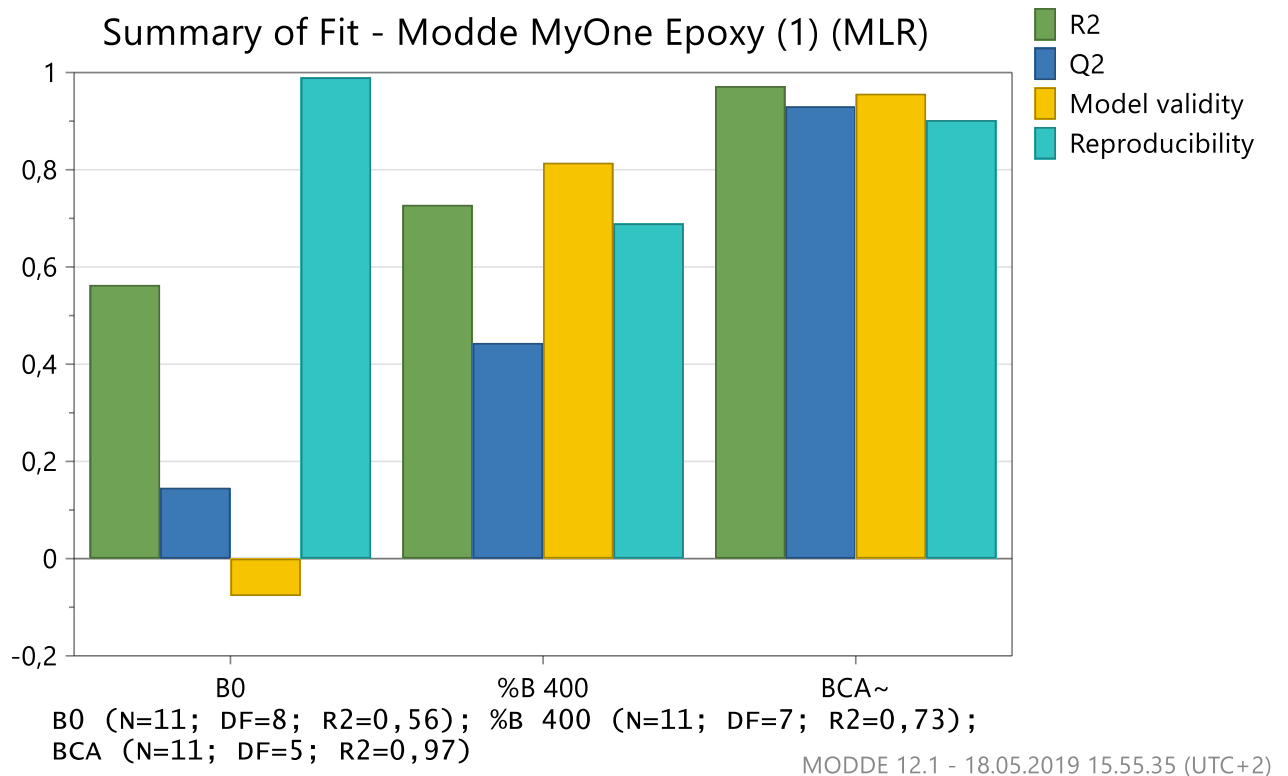
Kobling nr (K.4559)	B0 (RLU)	Proteinbinding ved 400 pg tyrosin/mL (%)	Påkoblet protein/kule (µg/mg)
1	50348	38	3,19075
2	62622	25	4,0975
3	34242	49	6,4065
4	38899	40	8,186
5	75207	28	3,14475
6	99373	19	3,78175
7	69493	39	6,856
8	33829	39	9,2565
9	36290	48	5,17425
10	37481	38	5,16775
11	40441	41	6,307

I tilpassing av modellen fra BCA assay verdier med MyOne Epoksy, vist i Figur 6, var R², Q², gyldighet og reproduserbarhet nærme 1,0. Dette var en god modell laget fra måledata med liten variasjon i senterpunktene og hvor målte og forventede verdier hadde høy likhet.

Faktorene som hadde en signifikant påvirkning for koblingen av T4-BSA til MyOne epoksy, vist i Figur 7, var mengden salt og T4-BSA. pH og interaksjonene mellom faktorene hadde ingen signifikant virkning på mengden protein som ble påkoblet kulene innenfor verdiene parameterne ble testet for. Le Châtelier's prinsipp kan forklare hvordan en økt mengde av tilsatt T4-BSA økte mengden T4-BSA som ble koblet til kulene.

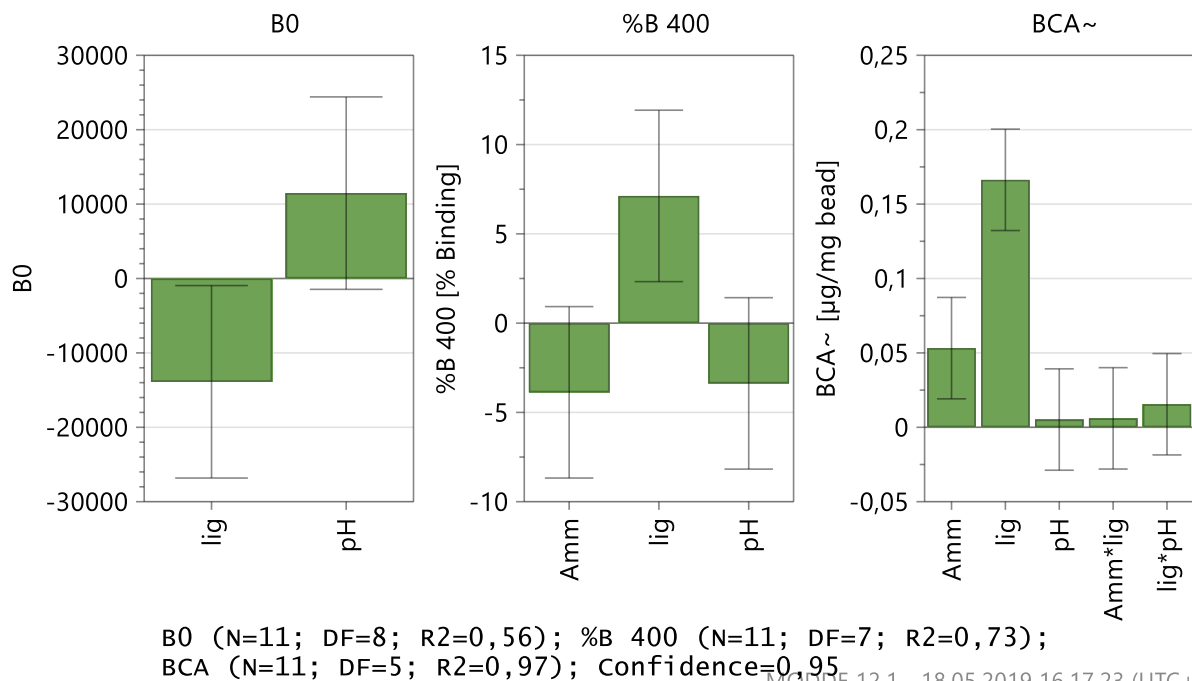
Modellen for B0 hadde en negativ gyldighet og Q² < 0,2 som kan tyde på at modellen ikke forklarte sammenhengen mellom de ulike faktorene og hva som ble målt. Den lave gyldigheten og Q² var forårsaket av målepunkter utenfor den forventede trenden for kobling nr 6, 7 og alle senterpunktene. Senterpunktene hadde et lavere signal enn hva som ble forventet av modellen. Prøvene for senterpunkter ble analysert på en egen plate og en ukjent årsak kan ha ført til et redusert signal. Koeffisient plottet i Figur 7 indikerte at en høyere konsentrasjon av T4-BSA reduserte signalet, men det var ikke-signifikant.

Proteinbindingsgraden hadde et likt mønster for tilpassing av modellen ved alle konsentrasjoner av tyroksin og derfor ble kun modell for proteinbindingsgrad ved 400 pg tyroksin, vist i Figur 6. Ved 400 pg tyroksin/mL var det en reproduserbarhet på 0,69. Den noe lavere reproduserbarhet og gyldigheten førte til en Q2 på 0,44. Kan forklares av at det ene senterpunktet havnet utenfor trenden. Koeffisient plottet indikerte at en økt konsentrasjon av liganden førte til en økt proteinbindingsgrad som førte til en svakere sensitivitet for assayet.



Figur 6. Tilpassing av modell fra MODDE med B0, %Binding ved 400 pg tyroksin/mL og fra BCA test med protein bundet til kulene. Faktorene som ble testet var saltkonsentrasjonen, pH og konsentrasjonen av T4-BSA ved kobling.

Coefficients (scaled and centered) - Modde MyOne Epoxy (1) (MLR)



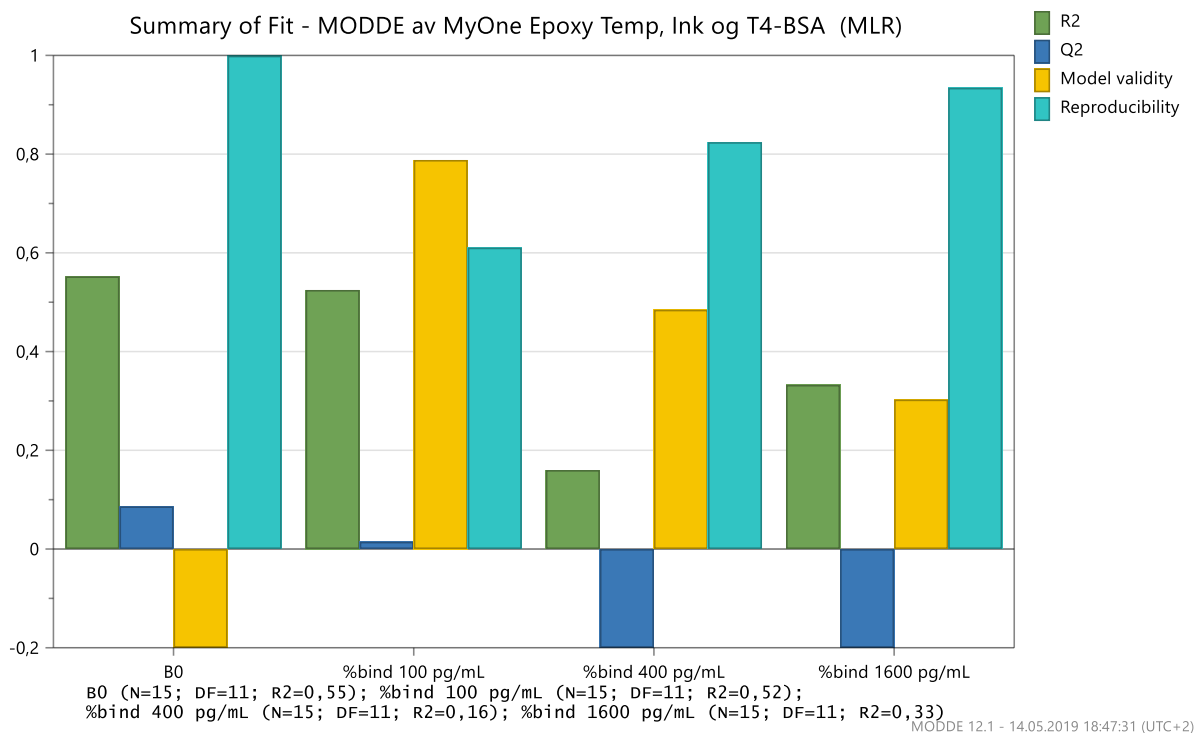
MODDE 12.1 - 18.05.2019 16.17.23 (UTC+2)

Figur 7. Hvordan faktorene pH, salt og T4-BSA påvirket B0, proteinbindingsgrad ved 400pg tyroksin/mL og mengden protein koblet på kulene.

For Myone Epoksy indikerte resultatene fra MODDE modellen at en lavere konsentrasjon av T4-BSA under kobling førte til bedre sensitivitet og at en høyere konsentrasjon av T4-BSA under kobling førte til en større mengde T4-BSA koblet til MyOne epoksy.

4.1.3. Videre optimalisering av koblingsprosedyre for MyOne epoksy

Det ble kjørt et oppsett for å se hvordan en endring av inkubasjonstid, temperatur og ligandkonsentrasjon ved kobling av MyOne Epoksy påvirket B0 og proteinbindingsgrad. Tilpassing av modellen, vist i **Error! Reference source not found.**, ga ingen modell for noen av koblingsfaktorene. Dette indikerte at koblingsbetingelsene var robuste i området de ble testet for, se Tabell A.1 i Bilag A for fullt oppsett for forsøket. Inkubasjonstid ble variert fra 3-24 timer, ligandkonsentrasjon fra 2,5-10 mg/mg kule og inkuberingstemperatur fra 25-45 °C.

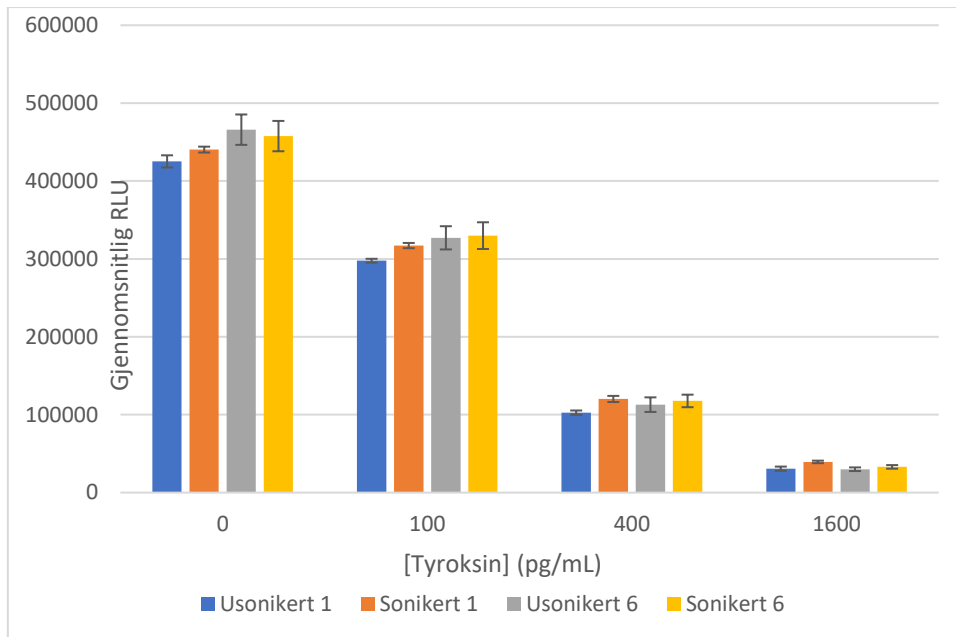


Figur 8. Tilpassing av modell fra MODDE med MyOne Epoksy ved endring av temperatur, inkubasjonstid og T4-BSA konsentrasjon. Responsene var B0 og proteinbindingsprosent 100- 400 - 1600 pg/mL tyroksin

4.1.4. Sonikering av aggregerte MyOne epoksy

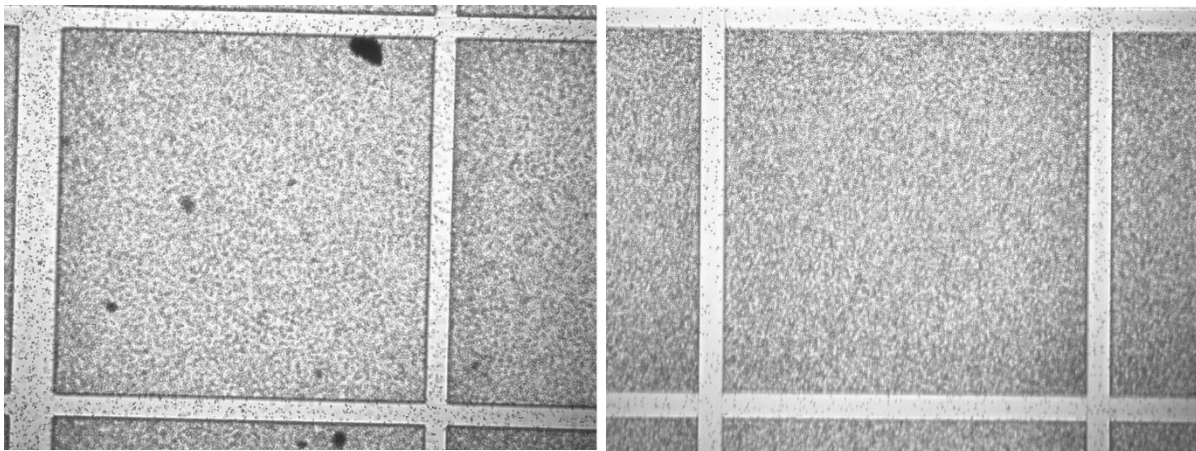
Det ble observert at koblinger med MyOne epoksy kuler hadde en høyere grad av aggregering enn kulene med andre overflater. Denne aggregeringen var observert som små synlige flak i løsningen. For å reversere aggregeringen ble kulene sonikert med en sonikeringsprobe i et par sekunder.

Signalet fra to aggregerte MyOne epoksy koblinger, vist i Figur 9, før og etter de ble sonikert. Kobling A viste en liten, men signifikant forskjell mellom signalet fra sonikerte og usonikerte kuler. Kobling B viste ingen signifikant forskjell.

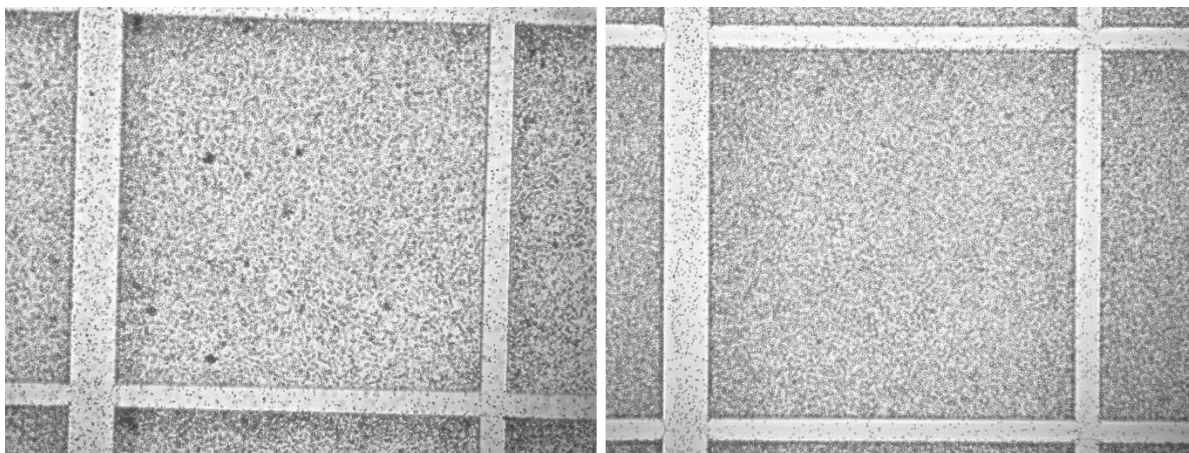


Figur 9. To MyOne Epoksy kuler ble testet før og etter sonikering for å se på påvirkningen av aggregering.

Kobling A og B ble sett på under mikroskop, som vist i hhv. Figur 10 og Figur 11, der kobling A viste mer aggregering enn kobling B. Dette indikerte at aggregering kan føre til små signifikante forskjeller.



Figur 10. Usonikert t.v. og sonikert t.h. av MyOne epoksy kobling A hvor aggregering ble reversert ved sonikering med sonikeringsprobe.



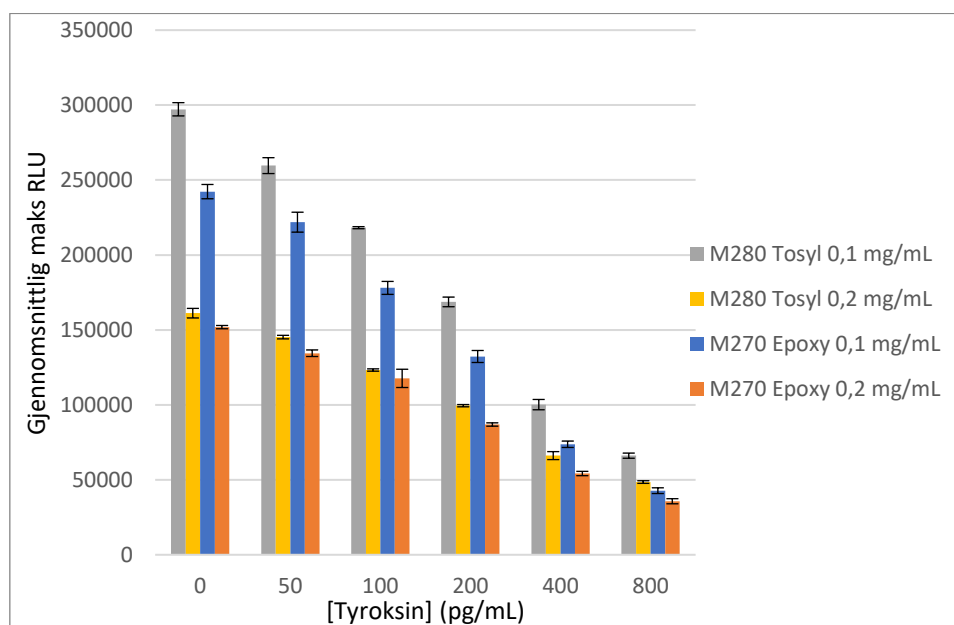
Figur 11. Usonikert t.v. og sonikert t.h. MyOne epoksy kobling B hvor aggregering ble reversert ved sonikering med sonikeringsprobe.

4.1.5. Optimalisering av kulekonsentrasjon i kompetitiv assay

Det ble undersøkt hvordan målt signal og sensitivitet ble påvirket ved en endring av kulekonsentrasjonen i prosedyren for kompetitiv immunoassay. De testede kulene var koblet til T4-BSA og merket deteksjonsantistoff var anti-T4 klon 1H1.

Begge kulene hadde et synkende signal ved økning av tyroksinkonsentrasjon, som sett i Figur 12.

M280 Tosyl ga et høyere signal enn M270 Epoksy ved begge kulekonsentrasjonene. En høyere kulekonsentrasjon resulterte i et lavere signal for begge kulene ved alle tyroksinkonsentrasjonene.



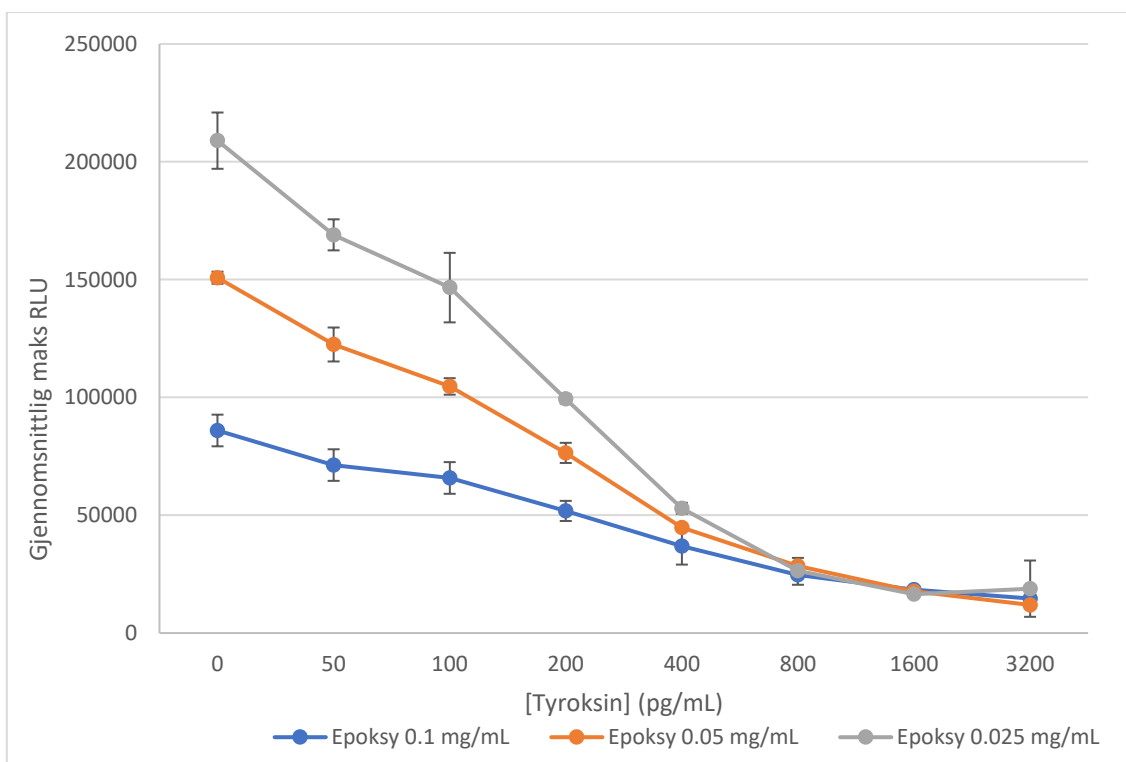
Figur 12. Målt gjennomsnittlig maks RLU ved to ulike konsentrasjoner av tilsatt M280 Tosyl og M270 Epoksy i et kompetitivt assay

Siden en økning av kulekonsentrasjonen av M-270 Tosyl og epoksy førte til et redusert signal ble det undersøkt om MyOne epoksy fulgte den samme trenden. Målet var å undersøke hvor lav

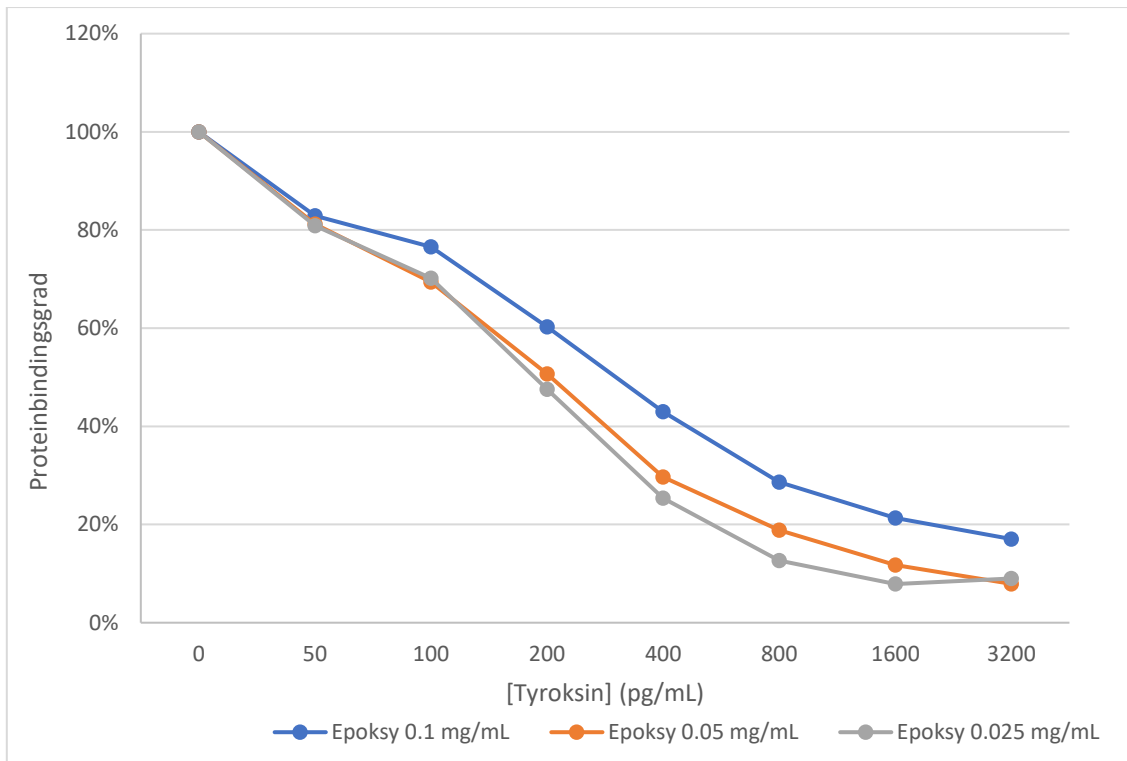
kulekonsentrasjonen kunne være før det ble et høyt standardavvik. Det ble utført et kompetitivt immunoassay med MyOne epoksy påkoblet T4-BSA hvor standard protokoll med kulekonsentrasjon på 0.1 mg/mL og 1:2 fortyninger ned til 0.025 mg/mL ble testet.

Ved de lavere konsentrasjonene av tyroksin økte signalet til over dobbel verdi ved å bruke en fjerdedel av kulemengden, som vist i Figur 13, men fra 400 pg/mL tyroksin falt denne forskjellen til det ikke var noen signifikant forskjell mellom høy og lav kulemengde. Ved den laveste kulemengden var det høyere standardavvik, som kan ha oppstått ved at det er en større grad av tapte kuler under prøveopparbeiding grunnet lite synlig volum av kuler i forhold til ved 0.1 mg/mL epoksy.

Proteinbindingsgraden, vist i Figur 14, som ble beregnet fra signalene, vist i Figur 13, indikerte at det var en reduisering i proteinbindingsgrad ved reduisering av kulekonsentrasjon. En paret t-test viste at det var en signifikant forskjell mellom proteinbindingsgrad ved 0.1 og 0.05 mg/mL konsentrasjon av epoksykuler, men ikke mellom 0.05 og 0.025 mg/mL. Ved de lave konsentrasjonene av tyroksin var det lik eller større proteinbindingsgrad for 0.025 sammenliknet med 0.05mg/mL epoksy konsentrasjon. Det høyere avviket i signalet ved 0, 50 og 100 pg/mL tyroksin for 0.025 mg/mL epoksy kuler kan ha forårsaket dette.



Figur 13. Kompetitivt assay med tre forskjellige konsentrasjoner av MyOne epoksy ved åtte konsentrasjoner av tilsatt tyroksin.



Figur 14. Beregnet proteinbindingsgrad fra kompetitivt assay ved tre tilsatte konsentrasjoner av MyOne epoksy koblet til T4-BSA.

0,05 mg/mL epoksy ga et høyere signal og økt sensitivitet enn 0,1mg/mL. 0,025 mg/mL epoksy hadde det høyeste signalet, men siden det hadde liten innvirkning på sensitiviteten i området 50-400 pg tyroksin/mL kombinert med at 0,05 mg/mL epoksy var en bedre håndterbar mengde blir 0,05 mg/mL valgt som optimal konsentrasjon.

4.2. Direktekobling av tyroksin til kuleoverflater

I denne delen av oppgaven ble det forsøkt å koble fritt tyroksin direkte til en kuleoverflate uten å konjugere det til BSA. Tyroksin er et lite molekyl 776,87 g/mol og krever en annen koblingsprosedyre enn ved påkobling av T4-BSA. Hensikten var å utvikle en metode for direktekobling og optimalisere sensitiviteten på et kompetitivt immunoassay for deteksjon av tyroksin med denne kulekoblingen.

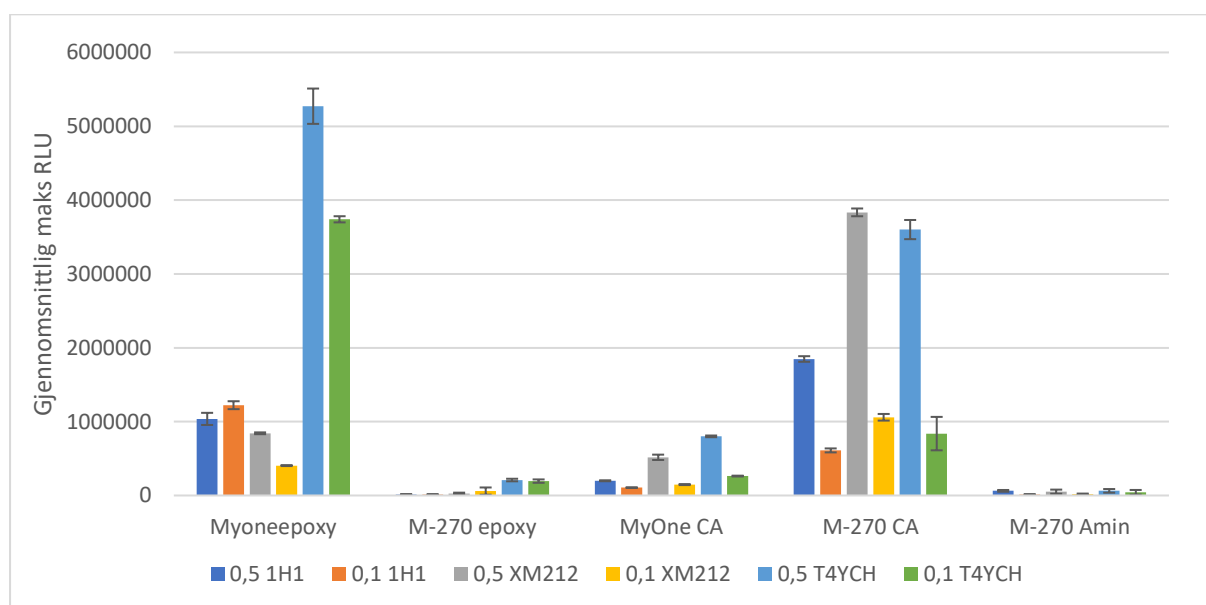
4.2.1. Direktekobling av fritt tyroksin til karboksylsyre-, epoksy- og aminkuler

Kulene som det ble testet med var MyOne karboksylsyre, MyOne Epoksy, M-270 karboksylsyre, M-270 Epoksy og M-270 Amin. For å teste om tyroksin ble koblet til kulene ble de testet i et kompetitivt assay med tre deteksjonsantistoffer. Antityroksin klon 1H1, XM212 og T4YCH.

MyOne epoksy hadde det høyeste signalet, vist i Figur 15 med T4YCH, men fikk også i en mindre grad signal mot de andre antistoffene. Denne kule hadde aggregering, men det har i tidligere forsøk vært observert at aggregering av MyOne epoksy kan reverseres med sonikering uten at dette

reduserer det totale signalet, som vist i Figur 9. M-270 epoksy hadde et svakt til ingen signal mot alle antistoffene og ingen trend i varians mellom konsentrasjonen på de forskjellige deteksjonsantistoffene. M-270 amin hadde et lignende lavt signal, men hadde et avvik fra koblingsprosedyre som gjør at en gjentagelse av kobling med M-270 amin må utføres før det kan konkluderes i om denne prosedyren gir direktekobling til tyroksin.

MyOne karboksylsyre målte signal ved alle antistoffer med en signifikant forskjell fra 0,5 og 0,1 µg/mL konsentrasjon av de tre deteksjonsantistoffene. M-270 karboksylsyre viste et lignende mønster som MyOne størrelsen, men med et flerdoblet signal ved alle deteksjonsantistoffene i forhold til MyOne karboksylsyre.



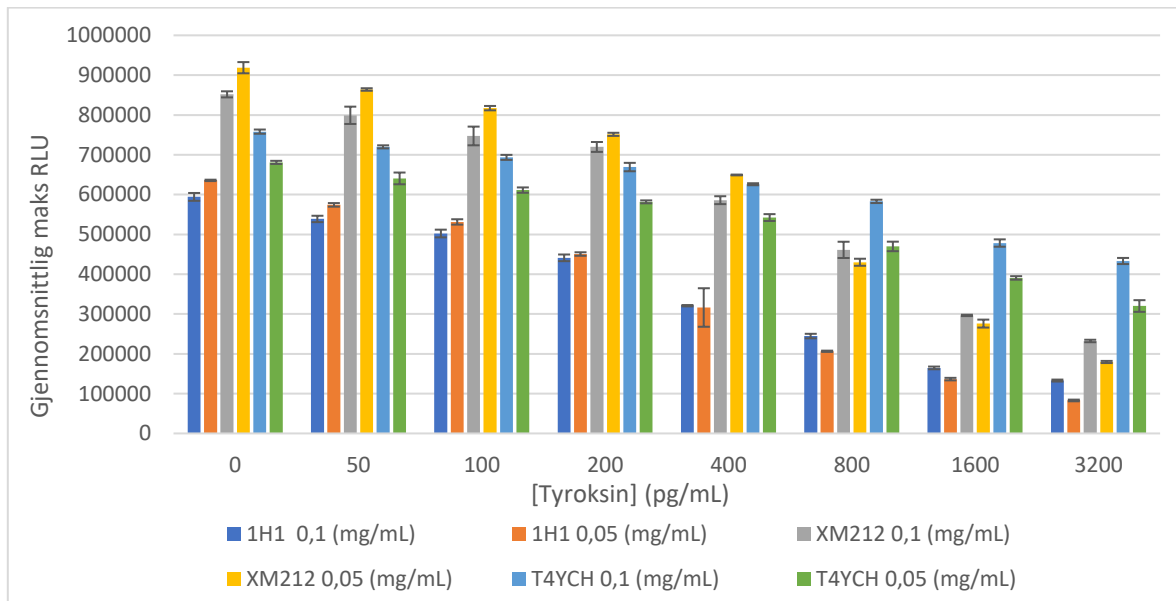
Figur 15. Målt B0 av fem direktekoblede kuler fra et kompetitivt immunoassay med tre forskjellige deteksjonsantistoff i to konsentrasjoner.

M-270 karboksylsyre ble valgt over MyOne epoksy for videre forsøk da den hadde høye signal mot alle deteksjonsantistoffene og hvor en reduisering av antistoff konsentrasjonen reduserte signalet. MyOne epoksy hadde en stigning i signalet ved reduisering av 1H1 konsentrasjonen og ble derfor valgt vekk.

4.2.2. Utvelgelse av deteksjonsantistoffklon for M-270 karboksylsyre

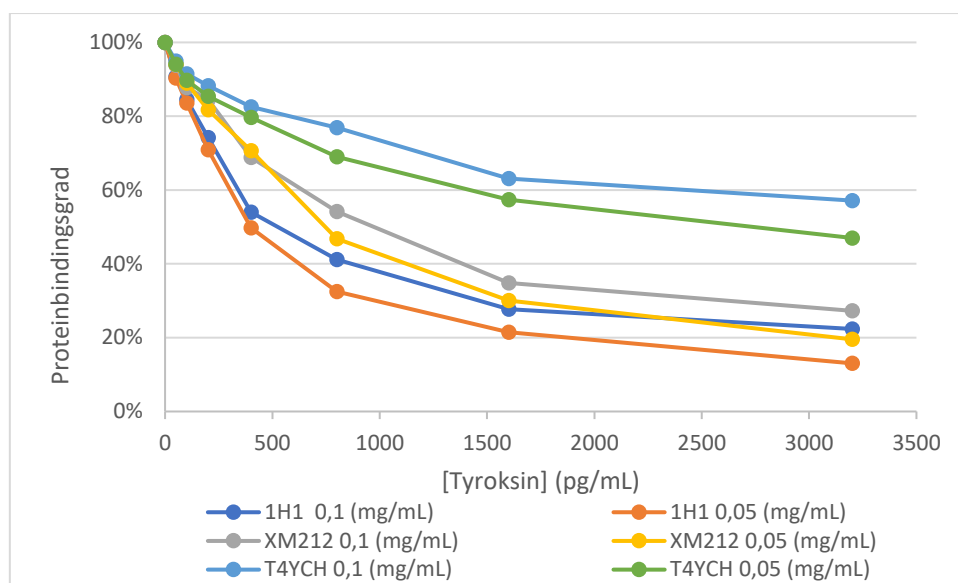
For å velge antistoffklon ble det utført kompetitive immunoassay fra 0-3200 pg/mL tyroksin med antityroksin klon 1H1, XM212 og T4YCH, med målte signaler vist i Figur 16. Alle antistoffklonene målte tilstrekkelig signal for videre bruk. For 1H1 førte en halvering av antistoffkonsentrasjonen til en svak økning ved lav konsentrasjon av tyroksin som ble til en reduksjon av signalet ved 800, 1600

og 3200 pg/mL tyroksinkonsentrasjon. XM212 hadde et lignende mønster som 1H1. T4YCH hadde en reduksjon av signalet ved halvering av deteksjonsantistoffkonsentrasjonen gjennom hele tyroksinkonsentrasjon rekken.



Figur 16. Tre deteksjonsantistoff ved to konsentrasjoner, ble testet mot direktekoblede M-270 karboksylsyre ved ulike konsentrasjoner av tyroksin. Feilfeltet ble beregnet fra hver prøve sitt standardavvik.

Begge 1H1 klonene hadde den høyeste sensitiviteten, som vist i Figur 17. 1H1 ved 0,05 mg/mL hadde lavere verdier ved alle punktene sammenlignet med det samme klonet ved 0,1 mg/mL. Det ble observert at alle klonene ved 0,05mg/mL hadde en brattere reduksjon i proteinbindingsgrad i forhold til 0,1 mg/mL.



Figur 17. Beregnet proteinbindinggrad fra signal av M-270 karboksylsyrekuler testet med tre deteksjonsantistoff i et kompetitivt assay.

Resultatene indikerte at en reduisering av antigenkonsentrasjonen førte til en økt sensitivitet for deteksjonen av tyroksin. Basert på disse resultatene ble klon 1H1 valgt da den hadde høyest sensitivitet.

4.2.3. Optimalisering av direktekoblingsprosedyre

Det ble laget et oppsett ved hjelp av MODDE, vist i Tabell 6, for direktekobling av M-270 karboksylsyre hvor parameterne inkuberingstid, tyroksinkonsentrasjon og konsentrasjonen av EDC og NHS ble variert for å finne optimale verdier og hvordan de påvirket det kompetitive assayet. For analysering ble EDC og NHS konsentrasjonen sin påvirkning slått sammen.

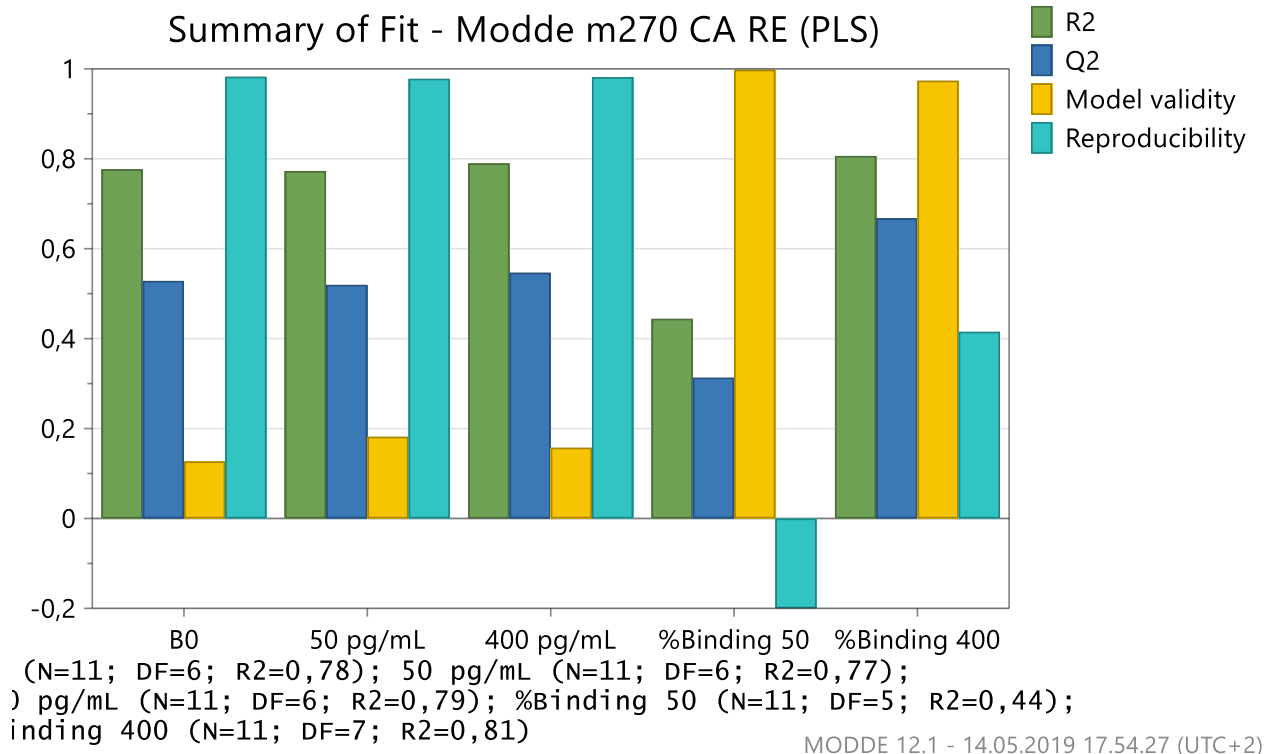
Tabell 6. MODDE oppsett for kobling av M-270 karboksylsyre med FT4 for optimalisering av sensitivitet i et immunoassay med hensyn på tyroksinkonsentrasjon, inkuberingstid, NHS og EDC konsentrasjon under kobling

Kobling nr (K.4594)	FT4/kule (µg/mg)	Tid (min)	EDC/tørre kuler (mmol/g)	NHS/tørre kuler (mmol/g)
1	10	15	0,2	0,22
2	150	15	0,2	0,22
3	10	120	0,2	0,22
4	150	120	0,2	0,22
5	10	15	0,6	0,66
6	150	15	0,6	0,66
7	10	120	0,6	0,66
8	150	120	0,6	0,66
9	80	67,5	0,4	0,44
10	80	67,5	0,4	0,44
11	80	67,5	0,4	0,44

Tilpassing av modell fra MODDE, vist i Figur 18 for en modell av hvordan de tre parameterne under kobling påvirker målt RLU og proteinbindingsgrader. For signal ved 0, 50 og 400 pg/mL tyroksin i kompetitiv assayet var det like verdier på R2, Q2, modell gyldighet og reproduserbarhet. Den lave gyldigheten skyldes et lavere signal enn modellen forventet for senterpunkt prøvene 9, 10 og 11, som vist i Tabell 7. Det var en høy reproduserbarhet da signalet på alle senterpunkt prøvene hadde lav variasjon. Q2 var >0,7 og R2 var >0,5 som indikerte en god modell.

Tabell 7. Målte verdier for M-270 karboksylsyre koblet med FT4 i et immunoassay.

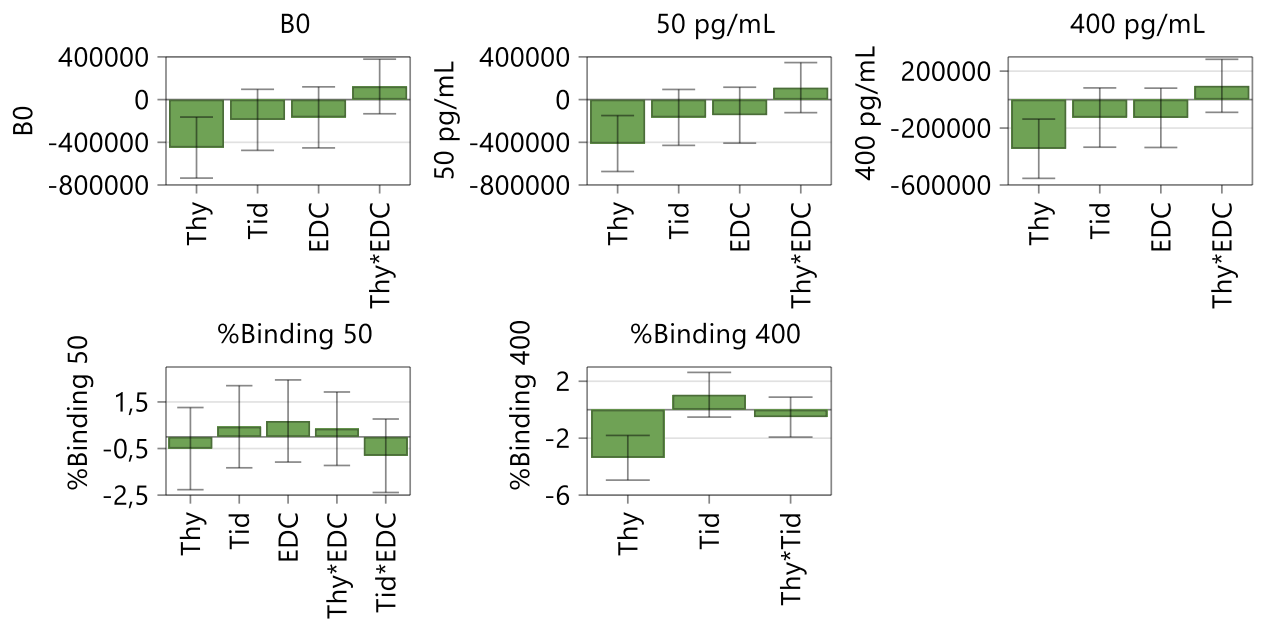
Kobling nr (K.4594)	B0 (RLU)	50 pg tyroksin/mL (RLU)	400 pg tyroksin/mL (RLU)	PBG 50 (%)	PBG 400 (%)
1	1881702	1683670	1393497	89,5	74
2	563865	491474	375997	87,2	66,7
3	1538587	1418085	1161863	92,2	75,5
4	231442	209564	152231	90,5	65,8
5	1423262	1307888	1009993	91,9	71
6	449626	413296	295686	91,9	65,8
7	636975	580054	489268	91,1	76,8
8	215181	195030	143645	90,6	68,8
9	220213	190537	145511	86,5	66,1
10	286094	258730	205163	90,4	71,7
11	378374	352619	268635	93,2	71



Figur 18. Tilpassing av modell for MODDE oppsett for direktekobling av M-270 karboksylsyre til tyroksin med variert inkuberingstid, tilsatt tyroksin mengde og NHS/EDC mengde.

For proteinbindinggrad ved hhv 50 og 400 pg/mL tyroksin var det en negativ og lav reproduserbarhet på grunn av høy variasjon av proteinbindingsgrad for prøvene som ble inkubert i 67,5 minutter. I plottet for hvordan parameterne påvirket responsene, vist i Figur 19 indikerte modellen at de fleste faktorene var ikke-signifikante med unntak av tyroksinkonsentrasjonen som hadde en negativ innvirkning på målt signal og proteinbindingsgrad.

Coefficients (scaled and centered) - Modde m270 CA RE (PLS)



B0 (N=11; DF=6; R2=0,78); 50 pg/mL (N=11; DF=6; R2=0,77);
 400 pg/mL (N=11; DF=6; R2=0,79); %Binding 50 (N=11; DF=5; R2=0,44);
 %Binding 400 (N=11; DF=7; R2=0,81); Confidence=0,95

MODDE 12.1 - 14.05.2019 17.54.27 (UTC+2)

Figur 19. Oversikt over koeffisienter som påvirker responsfaktoren for MODDE oppsett M-270 karboksylsyre direktekobling med variert inkuberingstid, tilsatt tyroksin mengde og NHS/EDC mengde.

En lav tyroksinkonsentrasjon under kobling førte til et høyere signal ved B0, 50 og 400 pg tyroksin/mL i det kompetitive assayet.

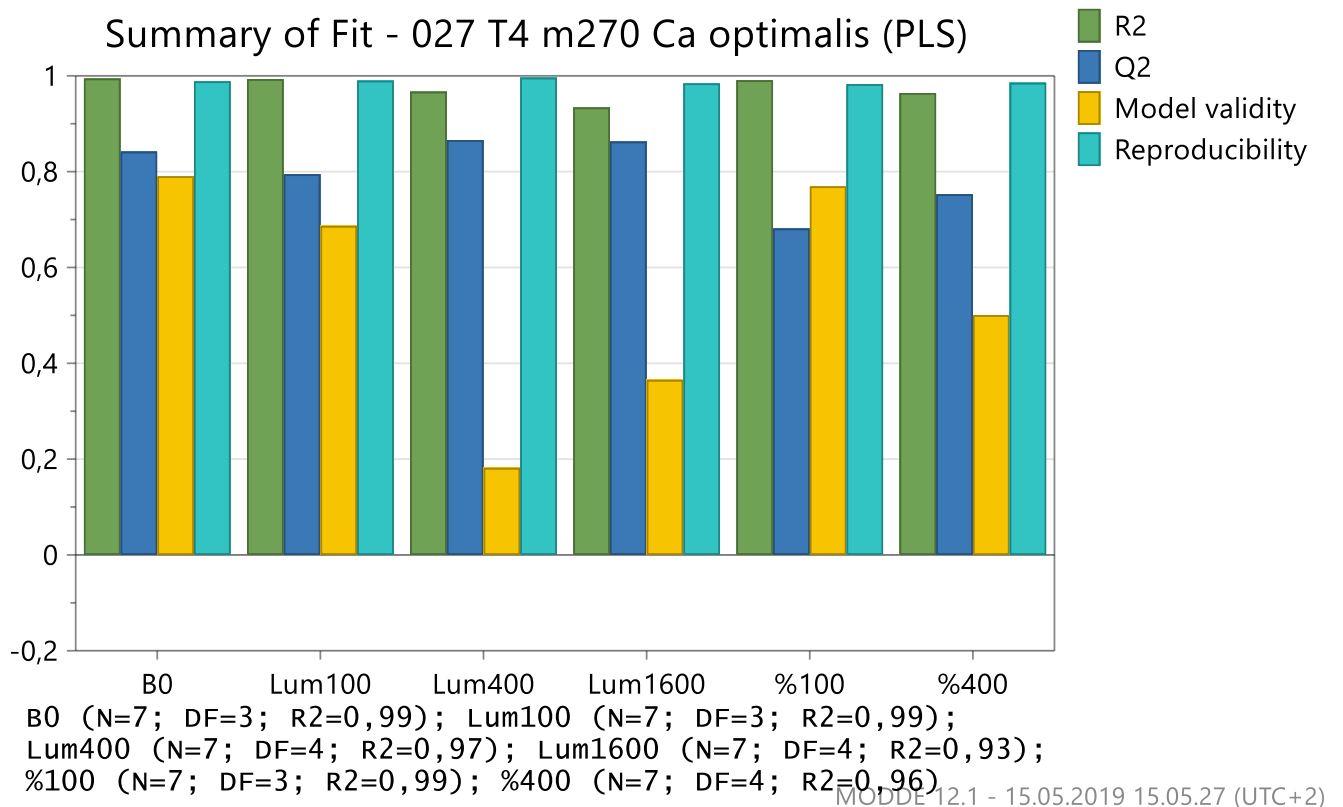
4.2.4. Optimalisering av kompetitiv assay med M-270 karboksylsyre

Det ble undersøkt hvordan deteksjonsantistoffkonsentrasjonen og kulekonsentrasjonen påvirket signalet og proteinbindingsgraden for M-270 karboksylsyre direktekoblet til tyroksin. Det ble utført et kompetitivt assay med de direktekoblede kulene med verdiene vist i Tabell 8

Tabell 8. Kulekonsentrasjon av M-270 karboksylsyre og antityroksin klon 1H1 konsentrasjon i syv prøver for undersøkelse av parametrenes påvirkning på B0 og sensitivitet i kompetitiv assay.

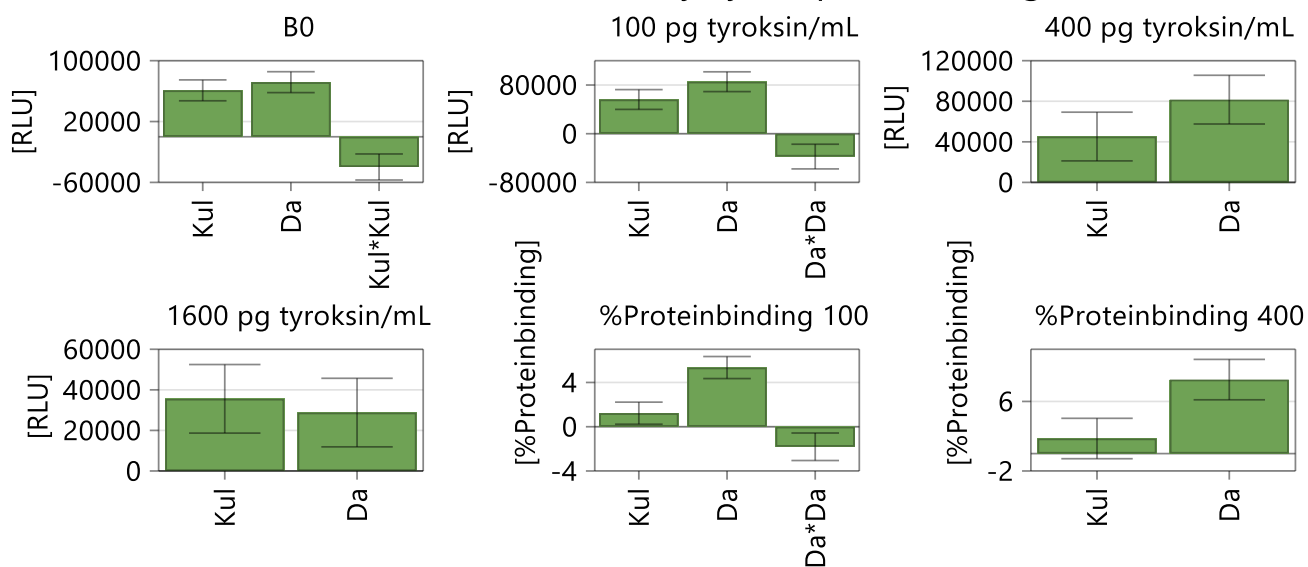
Prøve	Kulekonsentrasjon (mg/mL)	Deteksjonsantistoffkonsentrasjon (µg/mL)
1	0,025	0,025
2	0,075	0,025
3	0,025	0,075
4	0,075	0,075
5	0,05	0,05
6	0,05	0,05
7	0,05	0,05

Summary of fit fra modellen for målt signal ved hhv 0, 100, 400 og 1600 tilsatt pg tyroksin/mL, markert B0 og Lum100, Lum400 og Lum1600 vist i Figur 20. Modellen 0 og 100 pg tyroksin/pL, samt %proteinbindingsgrad ved 100 og 400 pg/mL hadde alle R2 og reproduserbarhet nærme 1, med Q2 og modell gyldighet >0,50 som indikerte en modell hvor målte verdier var nærme forventet verdi. Ved 400 og 1600 pg tyroksin/mL var den en lav gyldighet som kan indikere at verdiene avviker fra hva modellen forventet.



Figur 20. Tilpassing av modell fra forsøk hvor deteksjonsantistoffkonsentrasjonen og kulekonsentrasjonen i det kompetitive assayet ble utført med verdiene fra Tabell 8.

Coefficients - M-270 karboksylsyre optimalisering (PLS)



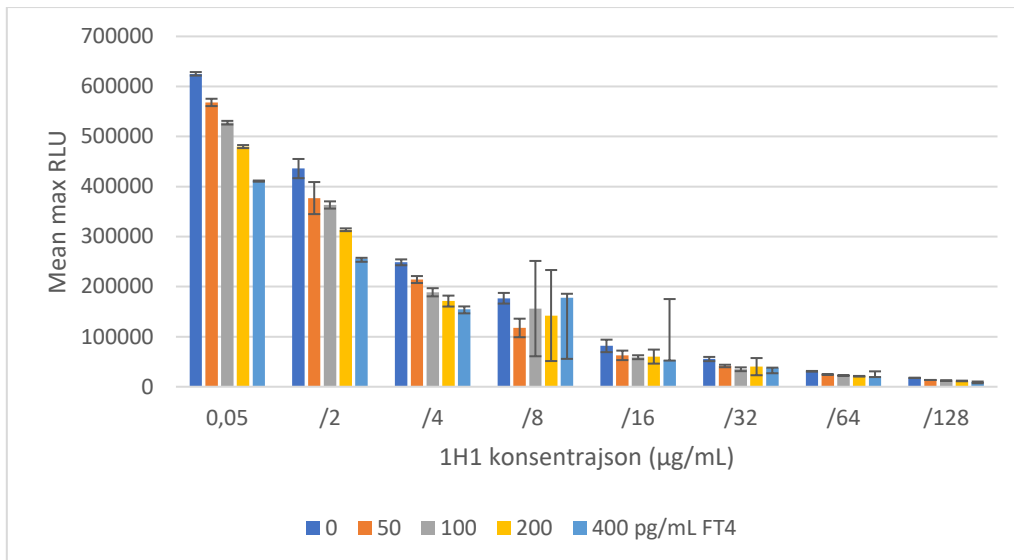
B0 (N=7; DF=3; R2=0,99); 100 pg tyrosin/mL (N=7; DF=3; R2=0,99);
 400 pg tyrosin/mL (N=7; DF=4; R2=0,97);
 1600 pg tyrosin/mL (N=7; DF=4; R2=0,93);
 %Proteinbinding 100 (N=7; DF=3; R2=0,99);
 %Proteinbinding 400 (N=7; DF=4; R2=0,96); **Confidence=0,95**

MODDE 12.1 - 15.05.2019 15.20.04 (UTC+2)

Figur 21. Koeffisienter fra MODDE modell for hvordan kulekonsentrasjon og deteksjonsantistoffkonsentrasjon påvirket RLU ved 0, 100, 400 og 1600 pg tyrosin/mL og proteinbindingsgrad ved 100 og 400 pg tyrosin/mL.

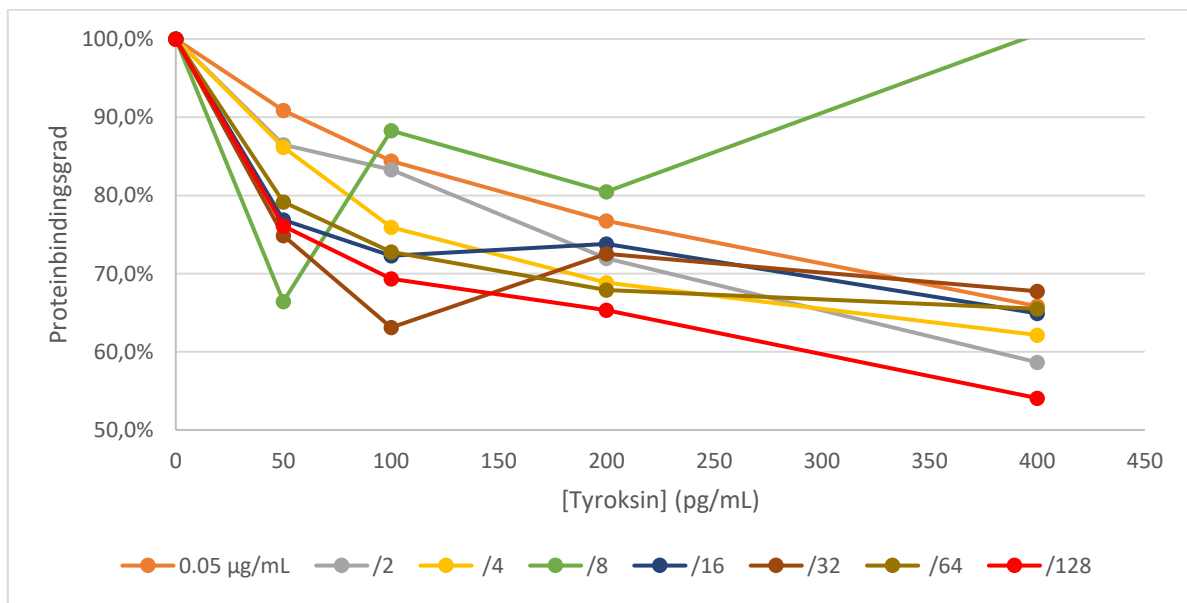
4.2.5. Undersøke optimal konsentrasjon for deteksjonsantistoff i kompetitivt assay

Det ble laget en 1:2 fortynningsrekke av klon 1H1 for å se på prosentbinding av M-270 karboksylsyre ved lavere 1H1 konsentrasjoner. Startkonsentrasjonen av 1H1 var 0,05 µg/mL. En reduisering av 1H1 konsentrasjonen førte til en reduksjon av gjennomsnittlig maks RLU signalet, vist i Figur 22. Signal redueringen kan ha ført til større variasjoner i relative avvik, som var tilfelle for 1/8, 1/16 og 1/32.



Figur 22. Gjennomsnittlig maks RLU av M-270 karboksylsyre med forskjellige 1H1 konsentrasjoner.

Prøve /8, /16 og /32 hadde et avvik fra forventet trend med en proteinbindingsgrad direkte koblet til 1H1 konsentrasjonen. En reduisering av 1H1 konsentrasjonen førte til høyere sensitivitet, som vist i Figur 1, men også en mindre robust metode på grunn av tilfeldige feil. Fra forsøket ble fortyning /4 som tilsvarte 0,0125 µg/mL valgt som den optimale konsentrasjonen av 1H1.



Figur 23. Proteinbindingsgrad for M-270 karboksylsyre under 1:2 fortyninger av antityrosin klon 1H1 konsentrasjonen med 0,05 µg/mL som utgangspunkt.

5. Konklusjon

Ved kobling av T4-BSA ble det funnet at MyOne epoksy hadde den høyeste sensitiviteten for deteksjon av FT4 ved en ligandkonsentrasjon på 5 µg ligand/mg kuler, ammoniumsulfatkonsentrasjon på 1,5 M og inkubering i fosfatbuffer pH 8.

MyOne epoksy viste en trend med større grad av synlig aggregering etter kobling. Det ble funnet at en reversering av aggregering ved sonikering av MyOne epoksy førte til en signifikant, men lav økning av signalet uten at dette påvirket sensitiviteten på kompetitiv immunoassayet.

For det kompetitive immunoassayet med MyOne epoksy koblet til T4-BSA ble det funnet at den optimale MyOne epoksy konsentrasjonen var på 0,05 mg/mL.

For direktekobling med FT4 fikk M-270 karboksylsyre, MyOne karboksylsyre og MyOne epoksy målt signal som indikerte en påkobling og deteksjon av tyroksin. M-270 karboksylsyre ble optimalisert videre for kobling. Ligand, inkuberingstid og NHS/EDC konsentrasjon ble sett på som parametre. Det ble funnet at en høyere ligandkonsentrasjon reduserte det målte signalet. Det ble ikke funnet noen signifikant sammenheng mellom ligandkonsentrasjonen, inkuberingstiden og EDC/NHS konsentrasjonen under kobling for sensitiviteten til kompetitiv assayet.

I det kompetitive immunoassayet med M-270 karboksylsyre koblet til FT4 viste resultatene at deteksjonsantistoffet antityroksin klon 1H1 ga den høyeste sensitiviteten for kompetitiv assayet ved alle konsentrasjonene av tyroksin fra 0-3200 pg tyroksin/mL. Resultatene indikerte at en redusert konsentrasjon av deteksjonsantistoff og kulekonsentrasjon økte sensitiviteten til kompetitiv assayet. Den laveste konsentrasjonen av deteksjonsantistoffet, og den som ble valgt som anbefalt konsentrasjon, var 0,0125 µg/mL før en høy variasjon førte til en ustabil sensitivitet.

For videre forskning kan ulike blokkeringer av kuler etter kobling, og ulike assaybufferer med og uten proteiner undersøkes for å redusere uspesifikk binding av antistoff og øke det dynamiske området. Flere koblingsparametre ved direktekobling, som EDC og NHS konsentrasjon, inkuberingstid og temperatur bør undersøkes utenfor verdiene som det ble koblet med i denne rapporten for å finne eventuelle grenser hvor de får en signifikant påvirkning på signal eller sensitivitet. For kompetitiv assay prosedyren kan de to inkuberingstidene undersøkes for optimale verdier. For MyOne epoksy kan det være av interesse å finne koblingsparametre hvor aggregering ikke oppstår etter kobling til T4-BSA.

6. Referanseliste

Berg, J., (2018, 11. mai). tyroksin. I *Store medisinske leksikon*. Hentet fra:

<https://sml.snl.no/tyroksin>

Gifford, J.L., Sadrzadeh, S.M.H. & Naugler, C. (Mai, 2018). Biotin interference: Underrecognized patient safety risk in laboratory testing. I *NCBI*. Hentet fra:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5951654/>

Merck (u.å) An Introduction to Antibodies: Antigens, Epitopes and Antibodies. Hentet fra:

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antigens-epitopes-antibodies.html>

NCBI, Immunoassay methods (2014). Hentet fra:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>

Nist. (u.å) How can I tell if a model fits my data? Hentet fra:

<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pmd/section4/pmd44.htm>

ThermoFisherScientific. (u.å.a). Dynabeads™ M-270 Amine. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14307D>

ThermoFisherScientific. (u.å.b). Dynabeads™ M-270 Carboxylic Acid. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14305D>

ThermoFisherScientific. (u.å.c). Dynabeads™ MyOne™ Carboxylic Acid. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65011>

ThermoFisherScientific. (u.å.d). Dynabeads™ M-270 Epoxy. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14302D>

ThermoFisherScientific. (u.å.e). Dynabeads™ MyOne™ Epoxy, for OEM and industrial use only.

Hentet fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/34001D>

ThermoFisherScientific. (u.å.f). Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65601>

ThermoFisherScientific. (u.å.g). Dynabeads™ MyOne™ Tosylactivated. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65501>

ThermoFisherScientific. (u.å.h). Dynabeads™ M-280 Tosylactivated. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14203>

ThermoFisherScientific. (u.å.i). Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Hentet fra:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227>

Bilag A

Tabell A.1. Fullt oppsett for kobling av MyOne epoksy der tyroksinkonsentrasjon, inkuberingstid og inkuberingstemperatur ble endret.

Kobling nr (4575)	tyroksin (mg/mg kuler)	inkuberingstid (h)	temperatur (C)	Kuler (mg)	totalvolum (µL)	buffer (µL)	3M amoniumsulfat (µL)	1 mg/mL tyroksin (µL)
1	2,5	3	25	2,5	125	56	62,5	6,25
2	10	3	25	2,5	125	37,5	62,5	25
3	2,5	24	25	2,5	125	56	62,5	6,25
4	10	24	25	2,5	125	37,5	62,5	25
5	2,5	3	37	2,5	125	56	62,5	6,25
6	10	3	37	2,5	125	37,5	62,5	25
7	2,5	24	37	2,5	125	56	62,5	6,25
8	10	24	37	2,5	125	37,5	62,5	25
9	2,5	3	45	2,5	125	56	62,5	6,25
10	10	3	45	2,5	125	37,5	62,5	25
11	2,5	24	45	2,5	125	56	62,5	6,25
12	10	24	45	2,5	125	37,5	62,5	25
13	6,25	13,67	37	2,5	125	47	62,5	15,5
14	6,25	13,67	37	2,5	125	47	62,5	15,5
15	6,25	13,67	37	2,5	125	47	62,5	15,5