



**OSLO METROPOLITAN UNIVERSITY**  
STORBYUNIVERSITETET

Bacheloroppgave

# Dried Blood Spot microsampling with Immunity Capture of Nerve Agent exposure Biomarker butyrylcholinesterase

Biotechnologi og kjemi  
Mai, 2024

Mirna Jarovic, Trine Nøding & Kristian Nærby Vandsemb

**KJTS3900 – Bacheloroppgave**  
20 STUDIEPOENG

Fakultet for teknologi, kunst og design  
Institutt for maskin, elektronikk og kjemi

**Utført ved:** Forsvarets forskningsinstitutt

**Eksternveileder:** Ingvild Comfort Hvinden

**Internveileder:** Kirsten Aarset

Tilgjengelighet: ☐ Åpen ☐ Lukket

## Sammendrag

Etter oppdagelsen og bevæpningen av syntetiske nerveagens, og det påfølgende kjemivåpenkappløpet som oppstod etter 2. verdenskrig, ble kjemivåpenkonvensjonen etablert og effektivisert i 1997. Konvensjonen forbyr all anskaffelse, produksjon, lagring og bruk av kjemiske agens i krig, men det er i ettertid påvist bruk, senest i 2020 ved attentforsøk på Putin-kritiker Aleksej Navalnyj.

Ved eksponering for nerveagens, vil agenset binde til acetyl- og butyrylkolinesteraser (AChE, BuChE) i blodet, som fører til tap av en rekke fysiologiske funksjoner som i ytterste konsekvens medfører død. En metode for å påvise og identifisere eksponering for nerveagens (OPNA) i dag er å måle adduktert butyrylkolinesterase (OP-BuChE) i venøst blod. Prøveopparbeidingen består av immunomagnetisk separasjon (IMS) med påfølgende analyse med væskeskromatografi tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Metoden stiller krav til faglig autorisert personell for prøvetaking, samt temperaturkontroll (2-8°C) ved transport og oppbevaring. For reduksjon av krav til personell og transport, er det av interesse å utvikle nye prøvetakingsmetoder, eksempelvis ved bruk av dried blood spots (DBS). Videre effektivisering av DBS som prøvetakingsmetode er å inkorporere immunoekstraksjon, og dermed forkorte tiden mellom prøvetaking og fremleggelse av analyseresultat.

Målet med oppgaven var å undersøke om antistoff-antigen-spesifisiteten som utnyttes i IMS kunne videreføres til DBS ved immobilisering av antistoff til filterpapir.

Det ble undersøkt to ulike funksjonaliseringer av DBS som baserer seg på metodene beskrevet av Johannsen et al. og Mrsa et al.. Johannsen et al. immobiliserer antistoffet på filterpapir av type Whatman® filterpaper grade 1 ved å benytte streptavidin-biotin binding som forankring av antistoffet. Mrsa et al. benytter divinylsufon som forankring for immobilisering av antistoffet på Whatman® filterpaper grade CF12.

Resultatene viste at både filterpapir av grad 1 og CF12 evnet å binde fritt BuChE i serum med et signal-til-støy-forhold ( $S/N$ )  $> 3$ . Filterpapir av grad 1 festet 7,9 ganger mer BuChE enn CF12. Beregnet  $p$ -verdi på 0,0056 (student  $t$ -test) indikerte at dette skyldtes metodespesifikke egenskaper. De funksjonaliserte filterpapirene ble deretter applisert OPNA-eksponert serum, og mengden festet OP-BuChE ble sammenlignet med standard IMS, som festet henholdsvis 10,13 og 2,41 ganger mer OP-BuChE enn grad 1 og CF12. En ANOVA post hoc Tukey test indikerte at den ulike mengden bundet OP-BuChE skyldtes metodespesifikke egenskaper.

Det ble observert fra resultatene at de ulike funksjonaliseringsmetodene, som benyttet ulike typer filterpapir, utviste et bytte i mengden bundet BuChE avhengig av om det var binding av fritt BuChE eller OP-BuChE. Da det kun ble utført én serie med fem replikater per metode, var det ikke mulig å identifisere om byttet skyldtes tilfeldige eller systematiske feil, eller var på grunn av bindingen til OPNA.

Forsøket ble ansett som vellykket da begge funksjonaliseringsmetodene festet fritt BuChE og OP-BuChE i serum med detekterbare mengder ( $S/N > 3$ ). Resultatene for serum er ikke nødvendigvis reproducerbare ved applisering av blod, på grunn av andre komponenter i prøven og ukjente matrikseffekter. Videre arbeid bør vektlegge evalueringen av ulike forankringsmetoders stabilitet på tvers av filterpapir, samt en påfølgende vurdering av reproducerbarheten til den valgte metoden.

## Forord og anerkjennelser

Arbeidet som presenteres er gjennomført ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI), avdeling Totalforsvar, og skrevet som den avsluttende oppgaven (20 studiepoeng) for studenter ved fakultet for teknologi, kunst og design med studieretning: Bioteknologi- og kjemiingeniør på OsloMet storbyuniversitet. Takk til FFI for denne unike muligheten.

Vi ønsker å uttrykke vår dype takknemlighet til DPhil Ingvild Comfort Hvinden (FFI) for hennes eksemplariske veiledning gjennom hele prosjektet. Din faglige innsikt, sterke engasjement og pedagogiske tilnærming har vært fundamental for oppgaven og av stor inspirasjon.

Vi ønsker å takke instituttet MEK ved OsloMet for tre svært lærerike og formative år. Til alle våre undervisere, takk for all kunnskap og tid. Til alle i syvende etasje, takk for at døren alltid har vært åpen og alle de gode faglige, og ikke-faglige, samtalene. Dere vil bli savnet.

Sist, men definitivt ikke minst, ønsker vi å takke førsteamanuensis Kirsten Aarset (OsloMet) for hennes evige støtte, omsorg og tilstedeværelse fra første, til siste skoledag. I løpet av våre tre år har vi hatt mange spørsmål, og du har svart på alle med faglig tyngde og entusiasme. Din veiledning har vært avgjørende for å opprettholde stabilt trykk og temperatur under arbeidet med oppgaven. Takket være deg føler vi oss trygge og kompetente i overgangen til en ny fase.

Avslutningsvis ønsker vi å takke hverandre, og oss selv, med et sitat fra en kjent lyriker;

*“Last but not least, I wanna thank me,  
I wanna thank me for believing in me,  
I wanna thank me for doing all this hard work,  
I wanna thank me for having no days off,  
I wanna thank me for... for never quitting”*

*Snoop Dogg*



Oslo, 23.05.2024

Mirna Jarovic

A stylized, cursive handwritten signature in black ink.

Trine Nøding

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style.

Kristian Nærby Vandsemb

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style.

## Forkortelser

<b>ABC</b>	Ammonium hydrogen karbonat
<b>AChE</b>	Acetylkolinesterase
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>BuChE</b>	Butyrylkolinesterase
<b>DBS</b>	Dried blood spots
<b>CWC</b>	Kjemivåpenkonvensjonen
<b>DMP</b>	Dimethyl pimelimidate dihydrochloride
<b>DVS</b>	Divinylsulfon
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisasjon
<b>FA</b>	Maursyre
<b>HCT</b>	Hematokrit
<b>HPLC</b>	Væskeskromatografi
<b>IMS</b>	Immunomagnetisk separasjon
<b>LOD</b>	Limit of detection
<b><i>m/z</i></b>	Masse ( <i>m</i> ) til ladning ( <i>z</i> ) forhold
<b>mAb</b>	Monoklonalt antistoff
<b>MDL</b>	Method detection limit
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MPA</b>	Metylfosfonsyre
<b>MRM</b>	Multiple Reaction Monitoring
<b>MS</b>	Massespektrometri
<b>MS/MS</b>	Tandem massespektrometri
<b>MWCO</b>	Molecular Weight Cut-Off filter
<b>OP-AChE</b>	Organofosfat-hemmet acetylkolinesterase
<b>OP-BuChE</b>	Organofosfat-hemmet butyrylkolinesterase
<b>OPCW</b>	Organisasjonen for forbud mot kjemiske våpen
<b>OPNA</b>	Organofosfat baserte nerveagens
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PBST</b>	Phosphate buffered saline med Tween
<b>QqQ</b>	Trippelkvadrupol
<b>RBC-ChE</b>	Esteraser lokalisert i erytrocytter
<b>R<sub>t</sub></b>	Retensjonstid
<b>S/N</b>	Signal-til-støy forhold
<b>SA</b>	Streptavidin
<b>TBS</b>	Tris buffered saline
<b>TEA</b>	Triethanolamine buffer solution



## Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b>	I
<b>Forord og anerkjennelser</b>	II
<b>Forkortelser</b>	III
<b>Oversikt over figurer og tabeller</b>	V
<b>1. Introduksjon</b>	1
1.1 Oppfinnelsen av nervestridsmidler	1
1.2 Nervestridsmidler og biologisk materiale	2
1.3 Kolinesteraser	4
1.4 Immunoekstraksjon og DynaBeads™	5
1.5 Dried Blood Spots	6
1.6 Analyse ved væskeskromatografi - tandem massespektrometri	8
1.7 Statistiske signifikanstester	10
1.8 Hensikt med forsøket	11
<b>2. Materialer og metode</b>	12
2.1 Materialer	12
2.1.1 Utstyr	12
2.1.2 Kjemikalier og løsninger	13
2.2 Metode	16
2.2.1. Immunomagnetisk separasjon av butyrylkolinesterase fra serum ved DynaBeads™	17
2.2.2. Biotinylert antistoff bundet til streptavidin på Whatman® qualitative filter paper grade 1	18
2.2.3. Monoklonalt antistoff bundet til divinylsulfon på Whatman® qualitative filter paper grade CF12	20
2.2.4 Organofosfat nerveagenset VX-eksponering av serum	21
2.2.5. Enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering	21
2.2.6 Analyse ved væskeskromatografi - tandem massespektrometri	22
<b>3. Resultater</b>	23
3.1 Fastsettelse av retensjonstid og kvantifiseringsionet til BuChE nonapeptid	23
3.2 Butyrylkolinesterase nonapeptid detekteres ikke fra ikke-modifisert filterpapir	25
3.3 Butyrylkolinesterase nonapeptid detekteres fra modifisert filterpapir	26
3.4 Deteksjon av organofosfat bundet butyrylkolinesterase nonapeptid og sammenligning av modifisert filterpapir mot DynaBeads™	27
3.4.1 Organofosfat bundet butyrylkolinesterase nonapeptid detekteres fra modifisert filterpapir	28
3.4.2 Sammenligning av filterpapirmetoder mot DynaBeads™ for deteksjon av organofosfat bundet butyrylkolinesterase	28
<b>4. Diskusjon</b>	31
4.1 Videreutvikling av prøveopparbeiding og optimalisering av parametere	32
<b>5. Konklusjon</b>	34
<b>Litteraturliste</b>	35
<b>Vedlegg</b>	40
Vedlegg A. Beskrivelse av tillaging av løsninger	40
Vedlegg B. Protokoll for biotinylering av antistoff	44
Vedlegg C. Protokoll for eksponering av serum med VX	48
Vedlegg D. Rådata fra analyse ved LC-MS/MS	49
Vedlegg E. R-kode for kromatogram, boksploott og ANOVA post hoc Tukey test	51
Vedlegg F. Beregninger og sammenligninger	59
Vedlegg G. Student t-test for modifisert filterpapir grad 1 og CF12 påført serum	61

## Oversikt over figurer og tabeller

### Figurer

<b>Figur 1.1</b>	Molekylærstruktur til OPNA	s. 1
<b>Figur 1.2</b>	Oversikt over hydrolysering av ulike nerveagens	s. 3
<b>Figur 1.3</b>	Hemming, aldring og reversering av esteraser ved OPNA eksponering	s. 4
<b>Figur 1.4</b>	Generell struktur av antistoff	s. 5
<b>Figur 1.5</b>	Immunoekstraksjon ved DynaBeads™ Protein G	s. 6
<b>Figur 1.6</b>	Filterpapir av cellulose	s. 7
<b>Figur 1.7</b>	Modifisert filterpapir med divinylsulfon	s. 8
<b>Figur 1.8</b>	Modifisert filterpapir med streptavidin	s. 8
<b>Figur 1.9</b>	Væskeskromatografi – tandem massespektrometri (HPLC-MS/MS)	s. 9
<b>Figur 1.10</b>	Metodespesifikke egenskaper ved immunomagnetisk separasjon og dried blood spots	s. 11
<b>Figur 2.1</b>	Grafisk fremstilling av immunoekstraksjonsmetoder	s. 16
<b>Figur 2.2</b>	Funksjonalisering av DynaBeads™ med antistoff	s. 17
<b>Figur 2.3</b>	Immunomagnetisk separasjon av butyrylkolinesterase fra serum	s. 18
<b>Figur 2.4</b>	Tillaging av modifisert filterpapir grad 1	s. 19
<b>Figur 2.5</b>	Applisering av til modifisert filterpapir grad 1	s. 19
<b>Figur 2.6</b>	Tillaging av modifisert filterpapir CF12	s. 21
<b>Figur 3.1</b>	Kromatogram BuChE standard 1 ppb	s. 24
<b>Figur 3.2</b>	Kromatogram BuChE standard 100 ppb	s. 24
<b>Figur 3.3</b>	Kromatogram for ikke-modifisert filterpapir grad 1	s. 25
<b>Figur 3.4</b>	Kromatogram for ikke-modifisert filterpapir CF12	s. 26
<b>Figur 3.5</b>	Boksplokk av kvantifiseringsion for fritt BuChE i serum på filterpapir grad 1 og CF12	s. 27
<b>Figur 3.6</b>	Kromatogram for modifisert filterpapir grad 1 og CF12 for OP-BuChE	s. 28
<b>Figur 3.7</b>	Boksplokk kvantifiseringsion for OP-BuChE i serum ved DynaBeads™, filterpapir grad 1 og CF12	s. 29

### Tabeller

<b>Tabell 2.1</b>	Anvendt utstyr	s. 12
<b>Tabell 2.2</b>	Anvendte kjemikalier	s. 13
<b>Tabell 2.3</b>	Tillagde løsninger	s. 15
<b>Tabell 3.1</b>	Gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik for OP-BuChE ved DynaBeads™, filterpapir grad 1 og CF12	s. 29
<b>Tabell 3.2</b>	ANOVA post hoc Tukey test for OP-BuChE ved DynaBeads™, filterpapir grad 1 og CF12	s. 30

# 1. Introduksjon

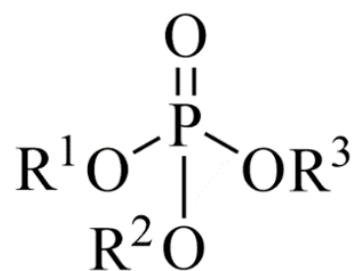
## 1.1 Oppfinnelsen av nervestridsmidler

Konflikter gjennom historien har til tider utviklet seg til å bli langvarige utmattelseskriger, hvor den konvensjonelle krigføringen stagnerer, og kampen om territoriet gradvis dreies om til en utmattelseskrig rundt ressurs- og personelltilgang. I slike situasjoner har ukonvensjonelle metoder blitt ansett som virkemiddel for et mulig vendepunkt (1).

Et eksempel på et slikt vendepunkt er bruken av ulike kjemiske agens<sup>1</sup>, eksempelvis klorgass under første verdenskrig, som et forsøk på å overvinne skyttergravene som stagnerte krigen. Kjemikeren som fremmet forslaget, og la til rette for bevæpningen av klorgass som kjemisk våpen<sup>2</sup>, var Fritz Haber, kjent for ammoniakk syntesen (Haber-Bosch-prosessen) (2).

Under første verdenskrig ble lav selvforsyning gjennom agrikultur avdekket som én av de avgjørende svakhetene for Tyskland. I mellomkrigstiden ble derfor bekjempelse av insekter og skadedyr et viktig fokusområde. Dette resulterte i økte midler til forskning og utvikling av bedre, og mer effektive pesticider<sup>3</sup> (3).

Dr. Gerhard Schrader ledet gruppen for plantebeskyttelse, og forskningsarbeidet knyttet til utvikling av nye pesticider hos IG Farben (tysk kjemikonsern). Under denne perioden syntetiserte han det som i dag regnes som det første syntetiske nervestridsmiddelet Tabun, og senere nervestridsmidlene Sarin og Soman. Arbeidet baserte seg på *prøving og feiling*, og felles for de nye agensene var utgangspunktet i organofosfat som «stamme», med ulike sidegrupper (figur 1.1.) (2, 3).



**Figur 1.1.** Molekylærstruktur til stamme av organofosfat med uspesifiserte sidegrupper R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> og R<sup>3</sup> (Laget i ChemDraw).

De nye pesticidene, ble konstatert som for farlige til kommersielt bruk på grunnlag av de toksiske analysene, men ble rapportert til den tyske regjeringen, da de utviste egenskaper med potensiale for bruk i krig. Selv om oppdagelsen av nervestridsmidlene ble gjort på laboratoriet til IG Farben, er det Schrader som krediteres for oppdagelsen av syntetiske organofosfat nerveagens (OPNA (2, 3).

Tiden mellom første og andre verdenskrig defineres i dag som perioden hvor syntetiske nerveagens ble oppfunnet (2). Som et resultat av den økende geopolitiske spenningen etter andre verdenskrig, oppsto det et betydelig kjemivåpenkappløp (2). Det er i moderne tid syntetisert flere varianter unitære og binære<sup>4</sup> nerveagens for bruk i krig (4). Trusselen om mulig bruk av kjemiske våpen, og de katastrofale konsekvensene dette kan medføre, har lagt grunnlaget for kjemivåpenkonvensjonen (CWC).

<sup>1</sup> Kjemisk agens er et kjemisk stoff som er i stand til å fremkalle en biologisk, kjemisk eller fysisk forandring.

<sup>2</sup> Kjemisk våpen er kjemisk agens tilrettelagt for bruk i krig/konflikt.

<sup>3</sup> Pesticider er giftstoffer som er beregnet på planter, insekter, sopp og gnagere, men som ikke skader produktet.

<sup>4</sup> Unitære nerveagens betyr at agenset er syntetisert ferdig. Binære nerveagens betyr at agenset ikke er ferdig, men består av to komponenter, som ved blanding vil danne agenset.

## 1.2 Nervestridsmidler og biologisk materiale

Kjemivåpenkonvensjonen har til hensikt å forby all produksjon, lagring, transport, eller bruk av kjemiske stridsmidler. Traktaten håndheves av *Organisasjonen for forbud mot kjemiske våpen* (OPCW) og samtlige land som ratifiserer traktaten er pålagt å deklare all aktivitet som omfatter de overnevnte punktene, samt å destruere den beholdning landet måtte besitte.

Til tross for ikrafttreddelsen av CWC i 1997 har det blitt registrert flere mulige tilfeller av OPNA-bruk i konflikter. I den pågående borgerkrigen i Syria er det registrert en betydelig mengde kjemiske angrep siden konflikten oppstod i 2011, hvorav angrepet i Ghouta i 2013 ansees som det største kjemiske angrepet i moderne tid, hvor flere hundre mennesker mistet livet (5, 6). Det er i tillegg registrert angrep på enkeltindivider, hvor attentatforsøket på Putin-kritiker Aleksej Navalny i 2020 er blant de mest kjente i nyere tid (7). Dette er kun to eksempler av flere hendelser hvor bruk av OPNA er mistenkt som virkemiddel av land som har ratifisert, og dermed forpliktet seg til å følge CWC.

Konvensjonen består av grundige definisjoner og kriterier, samt tre vedlegg (schedule 1-3) som lister de spesifikke kjemiske agensene og spesielle utgangsstoffer som nyttes i syntesen av kjemiske stridsmidler (8, 9). OPNA benevnes som nervestridsmidler og tilhører vedlegg 1 i CWC (9). Avhengig av deres fysikalske egenskaper, deles nervestridsmidler inn i to kategorier: *varig* og *ikke-varig*<sup>5</sup> (10). Kategoriene tar i betraktning flyktigheten til agenset og hvor lenge (timer, dager, uker) det spesifikke agenset blir værende i miljøet (11, 12).

Fra CWC, vedlegg 1, listes blant annet følgende nervestridsmidler; Sarin, Soman og VX. Sarin og Soman er begge eksempler på flyktige agens og tilhører kategorien *ikke-varige* nervestridsmidler. For flyktige kjemikalier, er eksponeringsfaren primært respiratorisk og sekundært via hud. Sarin har en LD<sub>50</sub><sup>6</sup> på 1700 mg/70 kg og LC<sub>50</sub><sup>7</sup> på kun 100 mg × min/m<sup>3</sup> (12). Dermed vil et menneske på 70 kg ha 50% sannsynlighet for å dø etter eksponering for 1700 mg Sarin via hud.

VX er et lite flyktige agens som tilhører kategorien *varige* stridsmidler. Agenset har primær eksponeringsvei via hud og svelg, men på grunn av de fysikalske egenskapene, er trusselen for innånding liten. VX har en LD<sub>50</sub> på 9,45 mg/70 kg, og LC<sub>50</sub> 30 mg × min/m<sup>3</sup> (11). Tross lavere verdi av tiltrengt konsentrasjon agens i luft, enn de overnevnte flyktige agensene, vil den primære eksponeringsveien for VX være via hud (11).

Gitt de forpliktelsene som er nedfelt i CWC, er det nødvendig med pålitelig påvisning av nervestridsmiddel og identifikasjon av agens som evidens for brudd på konvensjonen. En metode for påvisning innebærer funn av biomarkører i biologiske prøver fra individer mistenkt for eksponering. Biomarkører er målbare indikatorer som kan benyttes til å evaluere biologiske prosesser eller sykdomstilstander i organismer. Biomarkører kan produseres av noe fremmed i organismen, eller være et resultat av effekten det har på det intrakorporale<sup>8</sup>. En god biomarkør vil være følsom, pålitelig, høyt diagnostisk sensitiv og positiv prediktiv, samt enkelt ekstrahert fra det biologiske materialet (13).

---

<sup>5</sup> *Varig* nervestridsmidler har fysikalske egenskaper som gjør at de blir værende i miljøet lenge (dager-uker). *Ikke-varige* nervestridsmidler har fysikalske egenskaper som gjør at de **ikke** blir værende i miljøet lenge (timer-dager)

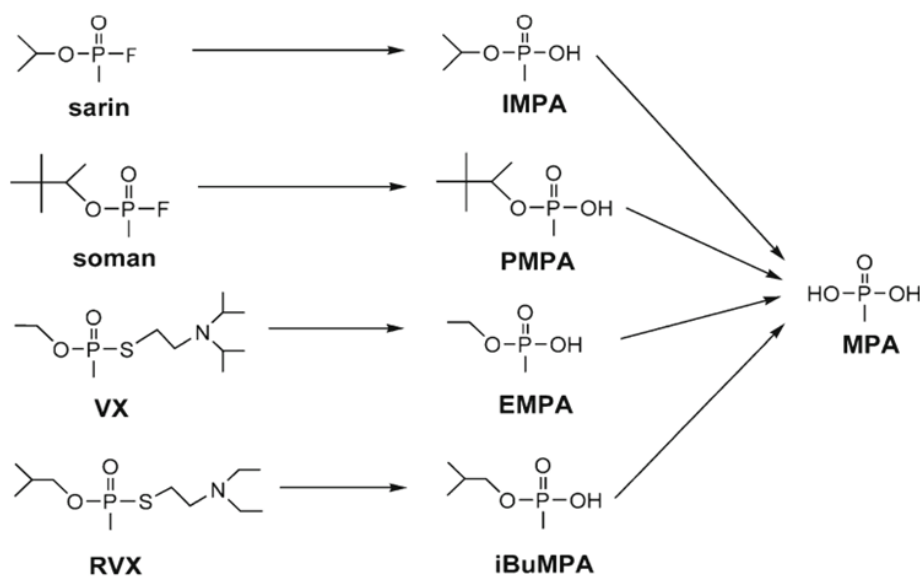
<sup>6</sup> LD<sub>50</sub> (Lethal Dose) er et mål på mengde kjemikalie på hud som vil medføre tap av liv for 50% av testobjektene.

<sup>7</sup> LC<sub>50</sub> (Lethal Concentration) er et mål på mengde kjemikalie i luft som vil medføre tap av liv for 50% av testobjektene.

<sup>8</sup> Fellesbetegnelse for alt som foregår, eller er lokalisert innenfor kroppen til en organisme (intracellulært og ekstracellulært).

En rekke typer biologisk materiale kan benyttes ved diagnostiske og kliniske analyser. Valg av biologisk materiale vil ofte være innvirket av faktorer som sykdomslokalitet, følsomhet, målrettet informasjon, tilgjengelighet og praktiske hensyn (14). Blod er et mye benyttet biologisk materiale på grunn av sin tilgjengelighet, representative natur og evne til å gi dynamisk informasjon om organismen. Blod har naturlig koagulerende egenskaper. Når en blodprøve ikke tilsettes et antikoagulent, vil prøven etter sentrifugering danne to faser; et sediment – *koagelen* og en lys væskefase – *serum* (14). Serumets matriks er bestående av blant annet ulike proteiner, metabolitter og hormoner, i tillegg til vann. Det vil kunne nyttes til deteksjon av en rekke komponenter, deriblant proteiner som enzymer, antigener eller antistoff av interesse (15). Urin er et annet hyppig anvendt biologisk materiale. Urin dannes i nyrene gjennom filtrering av blodet, og utskilles deretter gjennom urinveiene. Dermed kan urinens sammensetning reflektere en rekke biologiske prosesser via metabolitter, elektrolytter, proteiner og hormoner som skilles ut, der alle kan fungere som biomarkører (13, 16).

Ved eksponering for OPNA, vil kroppens metabolske prosesser bidra til å øke vannløseligheten til agenset (14). OPNA-molekylene som ikke er bundet til makromolekyler vil gjennomgå hydrolyse og omdannes til sine spesifikke syrer ved at en sidegruppe knyttet til fosforatomet subsidieres med en hydroksylgruppe (figur 1.2). Videre vil en ytterligere substitusjon med et nytt hydroksyl danne metylfosfonsyre (MPA), sluttproduktet i hydrolysenedbrytningen av OPNA (17). Fosfonsyrene (eksempelvis IMPA, figur 1.2.) kan påvises i biologisk material som blod og urin etter eksponering.



**Figur 1.2.** Nerve agensene: Sarin, Soman, VX og RVX, med deres spesifikke semi-hydrolyserte fosfonsyrer og det fullstendig hydrolyserte sluttproduktet metylfosfonsyre (MPA) (17).

En begrensning ved urinalyse er den raske nedbrytningen og elimineringen av de metabolske syrene gjennom urinutskillelse. Dette medfører tidskritiske momenter og en mer krevende ekstraksjonsprosess for selve prøven. Blod som biologisk materiale for påvisning ved biomarkør er av den grunn å foretrekke, da metabolitten vil ha vesentlig lengre oppholdstid i organismen ved at det binder til proteiner i blodet, som albumin, hemoglobin og esteraser.

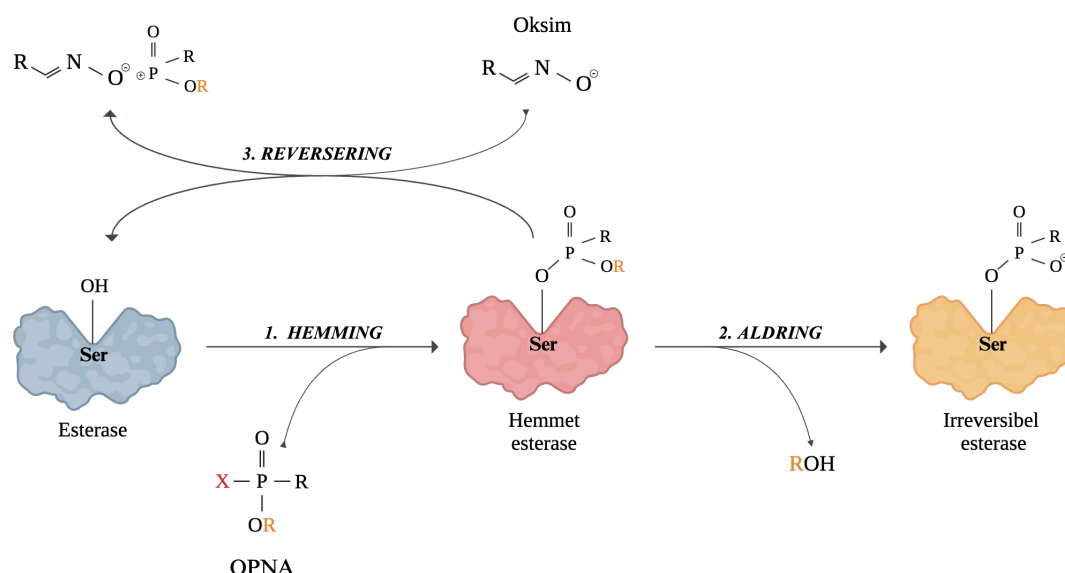
### 1.3 Kolinesteraser

Esteraser er en fellesbetegnelse for en rekke enzymer med evne til å katalysere hydrolyse av esterbindinger, og de er navngitt på bakgrunn av substratet de hydrolyserer (18). Acetylkolinesterase (AChE) er et enzym som hydrolyserer nevrotransmittoren acetylkolin i nervesystemet. Acetylkolin produseres av kolinerge nerveceller. Disse nervecellene er, blant annet, involvert i regulering av våkenhet, oppmerksomhet, læring, hukommelse og muskelkontraksjon (19).

Ved eksponering for OPNA vil aktiviteten til AChE hemmes ved at det aktive serinsetet (serin<sub>203</sub>) på enzymet fosforyleres, og det kovalente adduktet OP-AChE dannes (20, 21). Hemming av AChE vil gi opphopning av acetylkolin i kolinerge nerveceller. Overstimuleringen av disse nervecellene fører videre til økt salivasjon, kramper, respiratorisk svikt og i alvorlige tilfeller, død (20, 22).

Inhibering av AChE er den mest fremtredende mekanismen for toksisitet ved nerveagens-eksponering, men agenset vil raskere binde til, og på lik måte hemme, enzymet butyrylkolinesterase (BuChE) ved å fosforylere serin<sub>198</sub>. Hemmingen av BuChE har per dags dato ingen kjent bivirkning, men som forskning fra år 2000 har vist, vil inhibering av BuChE, ved deaktivering av AChE, medføre død i modellorganismen. Dette antyder at det kan ha alvorlige konsekvenser i organismer hvor AChE-aktiviteten samtidig er redusert (22-24).

Inhibering av fosforylerte esteraser kan reverseres ved bruk av et oksim (motgift), men avhenger av om adduktet har stabilisert seg (25). Stabiliseringen oppstår ved at en sekundær gruppe, vanligvis en alkylsidegruppe, spontant frigjøres fra fosfatet. Denne prosessen, presentert i figur 1.3, er bedre kjent som «aldring» eller «aging». Ved det tidspunkt et addukt gjennomgår aldring vil inhiberingen være irreversibel (20, 22). Halveringstiden for denne prosessen varierer stort for ulike agens; eksempelvis 2 minutter for Soman og 24 timer for VX (22, 25). Aldring har dermed en stor klinisk innvirkning, men fremmer også en utfordring ved identifisering av nerveagens.



**Figur 1.3.** Organofosfat nerveagens (OPNA) binder til enzym esterase (blå) ved serin (ser), som leder til (1) hemming av esterasen (rød), samtidig som OPNA mister en utgående gruppe (X). Hemmet esterase (rød) vil deretter gjennomgå (2) aldring ved å miste en utgående gruppe (ROH), og ved fullstendig aldring (gul) er esterasen irreversibelt bundet og kan ikke returnere til normalfunksjon. Ved at hemmet esterase (rød) blir eksponert for et oksim reverseres (3) binding mellom OPNA og esterase, og esterasen returnerer til sin normalfunksjon (blå) (Laget i BioRender).



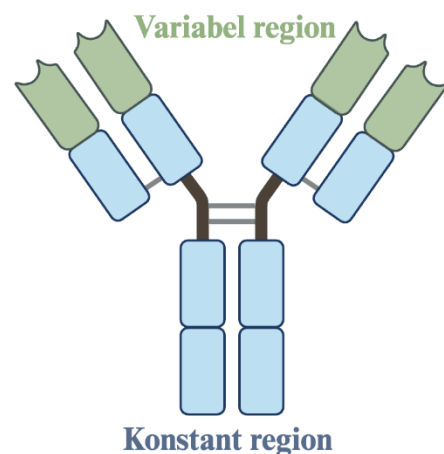
Adduktet som dannes etter at agenset har reagert med AChE eller BuChE forblir bundet etter enzymatisk kløyving av proteinet. Peptid med addukt vil være ulike avhengig av nerveagensene, inntil aldring har forekommet. Etter fullstendig aldring vil det ikke være mulig å skille på nerveagensene (22). Tidsaspektet er dermed en avgjørende faktor for identifisering av agens. Videre vil mengde bundet OPNA være av vesentlig betydning. Det er dermed ønskelig å isolere og konsentrere biomarkøren med høyest relativ mengde og lengst halveringstid.

AChE er primært distribuert i vev, noe som kompliserer direkte kvantifisering. Det er av den grunn vanlig å måle på andre påvirkede esteraser, slik som BuChE, eller esteraser som er lokalisert i erytrocytter (RBC-ChE), da disse finnes i blod, og enkelt kan ekstraheres og opparbeides for kvantifisering (20). Forekomsten av BuChE i blodserum er funnet til å være 2-5 mg/L blod, med en snittkonsentrasjon på 80nM (22, 26, 27). I kombinasjon med en halveringstid på 12 døgn, hvilket muliggjør prøvetaking over et utvidet tidsvindu, og forenkler ekstraksjonen av biologisk prøvemateriale, er BuChE en særlig interessant biomarkør (27). På grunn av den lave konsentrasjonen til BuChE er det ønskelig å isolere og konsentrere proteinet, eksempelvis med immunoekstraksjon.

## 1.4 Immunoekstraksjon og DynaBeads™

Immunoekstraksjon er en metode som utnytter antistoff-antigen interaksjoner. Metoden muliggjør, i kombinasjon med andre teknikker, sensitiv og selektiv påvisning av et målmolekyl, og kan isolere både proteiner og peptider.

Antistoff er proteiner som består av en konstant - og en variabel region (figur 1.4.). Den variable regionen er avgjørende for gjenkjenning av antigenet gjennom dets epitop (figur 1.5.) (28). Komplementære bindinger mellom den variable regionen og epitopet på antigenet gir høy selektivitet. Antistoffet kan ytterligere rette seg mot enten lineære epitoper, som er sammenhengende aminosyresekvenser langs proteinet, eller konformasjonelle epitoper, som dannes av aminosyrer som er plassert på ulike deler av proteinets struktur, men er sammenført på grunn av proteinets folding. Dette gir en bred anvendelse av immunoekstraksjon som metode (29).



**Figur 1.4.** Generell struktur av antistoff med illustrert konstant- og variabel region (Laget i BioRender).

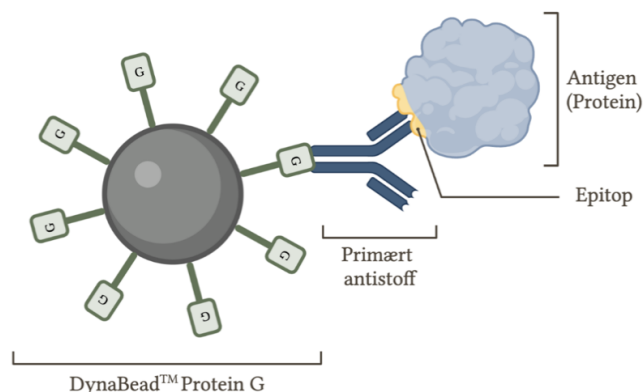
Antistoff kan deles inn i to hovedgrupper; monoklonale og polyklonale. Monoklonale antistoff gjenkjenner et spesifikt epitop på antigenet, hvor polyklonale antistoff vil gjenkjenne flere epitoper. Monoklonale antistoff vil dermed gi høyere spesifisitet (30).

Den mest utbredte metoden i dag for ekstrahering av nerveagens biomarkøren OP-BuChE<sup>9</sup> fra blodprøver er immunomagnetisk separasjon (IMS) ved bruk av DynaBeads™ (21, 23, 24). DynaBeads™ er ikke-porøse, monodispergerte polystyrenkuler (31). Beadsene er superparamagnetiske, som vil si at de kun utviser magnetiske egenskaper når de er i et magnetfelt. Når det ytre magnetfeltet fjernes, vil ikke beadsene ha noe resterende magnetisme (30). Det produseres en rekke ulike varianter av DynaBeads™, som varierer i blant annet størrelse og overflatefunksjon med flere ulike applikasjonsområder, eksempelvis protein-protein

<sup>9</sup> OP-BuChE er adduktet molekylet bestående av organofosfat bundet til butyrylkolinesterase.

interaksjoner og isolering av celler (30, 32).

For å utføre immunoekstraksjon med DynaBeads™ funksjonaliseres beadsene ved å koble et målspesifikt antistoff til overflaten. Funksjonaliserte beads vil deretter inkuberes i en proporsjonal mengde biologisk prøve, eksempelvis serum, for selektiv binding av antistoff til målmolekylet ved antistoff-antigeninteraksjoner (figur 1.5). Eventuelle ikke-bundne komponenter elimineres ved et vaskesteg før målmolekylet frigjøres fra beadsene ved hjelp av en elueringsbuffer, eller andre metodespesifikke betingelser (31). Immunoekstraksjon med DynaBeads™ benytter vanligvis et prøvolum på 200µL (24).



**Figur 1.5.** Illustrasjon av DynaBeads™ Protein G med immobilisert primært antistoff bundet til epitop på antigen (Laget i BioRender).

Videre stilles det krav til faglig kvalifisert personell for prøvetaking, og nøyaktig temperaturkontroll (2-8°C) under oppbevaring av prøven (14). For en bredere anvendelse er det ønskelig å eliminere disse kravene uten at det påvirker analysens kvalitet. Det er dermed av interesse å se på andre prøvetakingsmetoder som beholder spesifisiteten til antistoff-antigeninteraksjoner, og samtidig reduserer krav til faglig kvalifisert personell, samt temperaturkontroll ved transport og oppbevaring av prøven.

## 1.5 Dried Blood Spots

Utviklingen av mer sofistikerte kvantitative og kvalitative analyseinstrument har betydelig redusert behovet for prøvolum, og har lagt til rette for utviklingen av mikrosampling (prøvolum <50 µL). En velkjent og mye undersøkt teknikk innen dette feltet er Dried Blood Spots (DBS), hvor en kapillærblodprøve fra hæl, øre eller finger påføres filterpapiret og deretter tørkes (33, 34). Når prøven er tørr kan den enkelt lagres og transporteres i en konvolutt med tilstedeværende tørkemiddel, uten at det stilles andre krav til oppbevaring eller temperatur (34-36). DBS utmerker seg som en minimalt invasiv og enkel tilnærming som reduserer kravene til både prøvolum, prøvetaking, oppbevaring og transport (36, 37).

I dag benyttes DBS som standardprosedyre for blodprøvetaking ved nyfødt screening, en nasjonal behandlingstjeneste som tar til sikte å screene alle nyfødte for alvorlig medfødte sykdommer, og arvelige metabolske lidelser (38, 39). I forskning har DBS blitt benyttet til en rekke formål, blant annet toksikologi og validering av biomarkører (39).

DBS har blitt evaluert for deteksjon og verifisering av OPNA-eksponering av Bruin-Hoegée et al. (40). De anvendte et Whatman 903 protein saver card med avsatt OPNA-eksponert blod, hvorefter det ble utført prøveoppbehandling med DynaBeads™ ved IMS for ekstraksjon av biomarkør OP-BuChE. Ved å kombinere bruken av DBS og IMS reduseres krav til faglig kvalifisert personell for prøvetakingen, men prøveoppbehandling ved bruk av IMS er fremdeles tidkrevende. Antistoff-antigeninteraksjonen som utnyttes i IMS kan overføres til filterpapir ved å immobilisere antistoffet direkte på filterpapiret (41, 42). Dermed starter



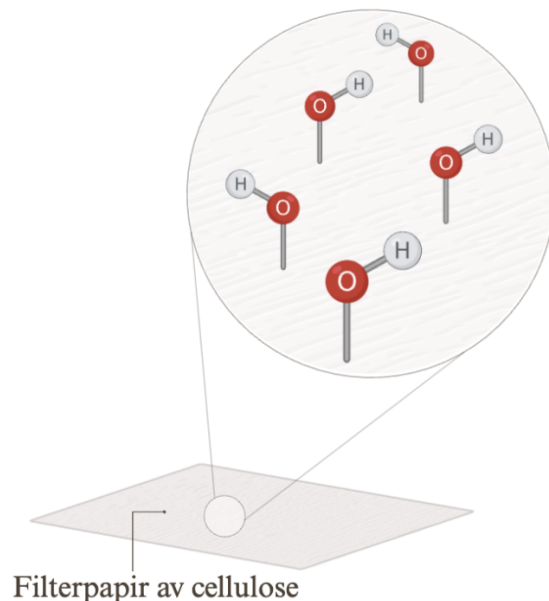
prøveopparbeidingen i forkant av prøvetaking, og bearbeiding av prøven begynner ved avsetting av blod, slik at tiden fra prøvemottak til analyseresultatet foreligger kan reduseres.

Filterpapiret som benyttes i DBS er vanligvis fremstilt av cellulose, men alternative cellulosefrie materialer har også blitt utforsket (43). Cellulose er en naturlig biopolymer av glukosemolekyler, og er lett tilgjengelig og bærekraftig (30, 42). Cellulosebasert filterpapir har hydroksylgrupper på overflaten (figur 1.6.) som kan danne bindinger til andre molekyler. Dette muliggjør modifikasjoner av papiret som tillater binding og ekstraksjon av spesifikke biomolekyler i en prøve (44, 45).

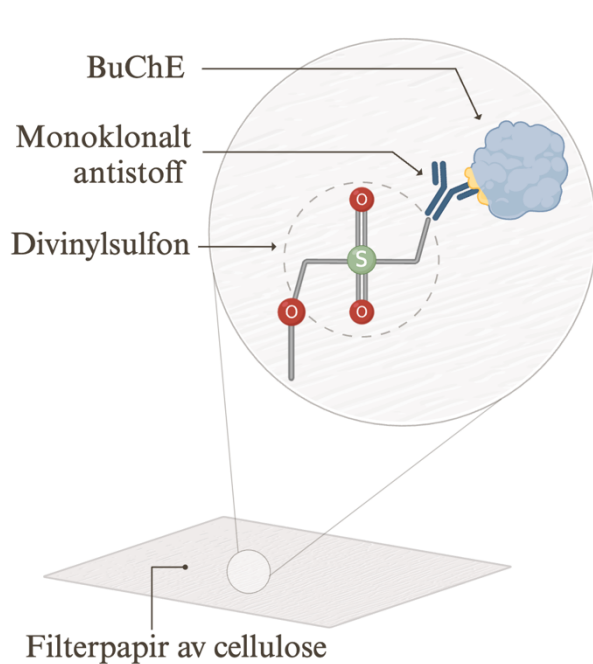
Antistoff har evnen til å enten adsorberes direkte til overflaten av papiret via svake intermolekylære krefter, eller bindes kovalent ved å bruke et ankermolekyl som bindeledd mellom papir og antistoff. Jarujamrus et al. har vist at 40% av antistoff som bindes ved adsorpsjon, blir desorbert ved påfølgende vasking av papiret (46). Rene prøver gir mer sensitiv analyse, dermed må tap av antistoff og bundet antigen ved vask av filterpapir forhindres. Dette kan oppnås ved at antistoffet festes kovalent, men krever funksjonalisering eller oksidering av hydroksylgruppene før immobilisering av antistoffet.

Antistoff har tidligere blitt immobilisert på filterpapir ved bruk av divinylsulfon (DVS) som et bindeledd av Mrsa et al (42). DVS er et lite molekyl med to elektrofile vinylgrupper som kan danne hver sin kovalente binding (47). Ved å funksjonalisere cellulosepapir med DVS, vil den ene vinylgruppen danne en kovalent binding til papiret, mens den andre vil danne en kovalent binding til antistoffet. Immobilisert antistoff med DVS er illustrert i figur 1.7.

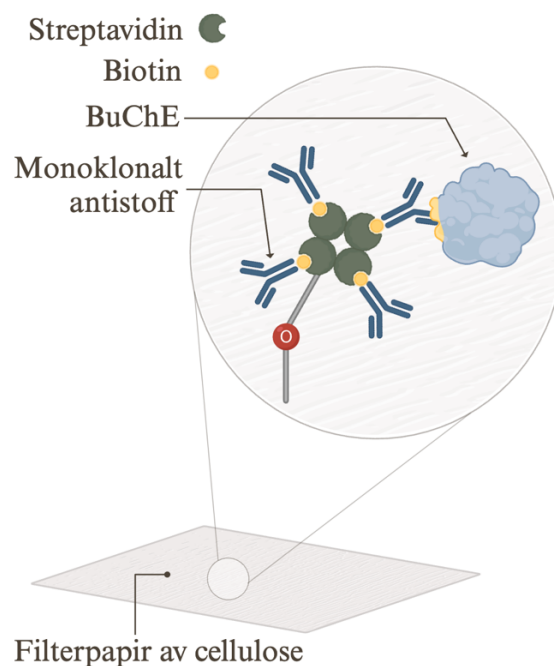
Alternativt kan antistoff immobiliseres ved å utnytte den sterke ikke-kovalente interaksjonen mellom proteinet streptavidin og vitaminet biotin. Dette er tidligere utført av Johannsen et al. (41). Streptavidin kan binde inntil fire biotin molekyler. Dette komplekset er i tillegg svært stabilt og motstandsdyktig mot endringer i pH, temperatur og denatureringsagenser (48). Biotin er et lite molekyl som enkelt kan konjugeres til større proteiner uten å påvirke proteinets biologiske aktivitet (48, 49). Ved å oksidere hydroksylgruppene på cellulosepapiret kan streptavidin bindes kovalent til papiret. Deretter kan biotinyllert antistoff bindes irreversibelt til papiret grunnet de naturlige egenskapene til streptavidin-biotin-komplekset. Immobilisert antistoff med streptavidin og biotin er illustrert i figur 1.8.



**Figur 1.6.** Filterpapir av cellulose med illustrert funksjonelle hydroksylgrupper på overflaten av papiret (Laget i BioRender).



**Figur 1.7.** Modifisert filterpapir av cellulose med divinylsulfon-bundet antistoff på overflaten (Laget i BioRender).



**Figur 1.8.** Modifisert filterpapir av cellulose med streptavidin og biotinylert-antistoff på overflaten (Laget i BioRender).

## 1.6 Analyse ved væskekromatografi - tandem massespektrometri

En av de mest utbredte bioanalytiske teknikkene er separasjon via væskekromatografi (HPLC) og analyse med masse spektrometri (MS), som gir høy sensitivitet og selektivitet (50, 51).

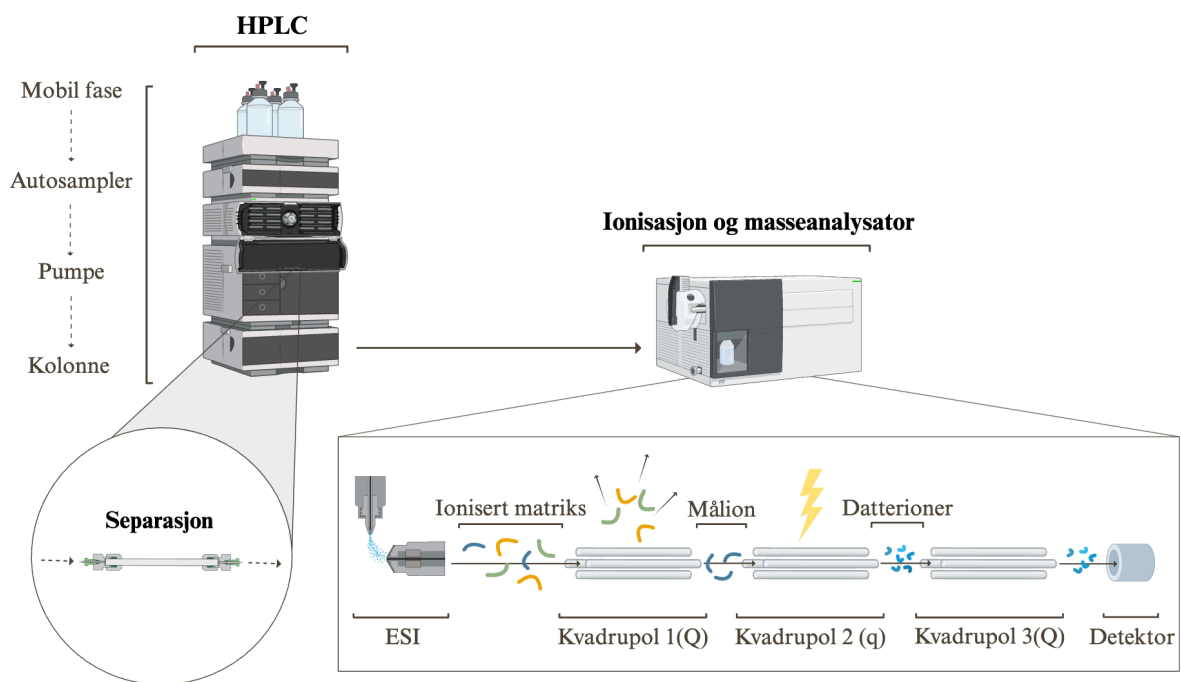
HPLC er en separasjonsteknikk som separerer analytter i en prøve basert på deres fordeling (affinitet) mellom en mobil fase og en stasjonær fase (52). HPLC benyttes typisk som separasjonsteknikk i analyser der analyttene er lite flyktige. Ett av de mest brukte prinsippene innenfor HPLC er omvendt fase. Ved omvendt fase vil den stasjonære fasen være upolar og den mobile fasen polar. Analytter og prøvematriks separeres fra hverandre basert på deres polaritet (52). Et HPLC system består av et mobilfasereservoar, et pumpesystem, en autosampler, en analytisk kolonne og en detektor (figur 1.9). Separasjonen av analytter finner sted i den analytiske kolonnen; den er tettpakket med porøse kuler, ofte av silika, som gir stor overflate og økt mulighet for interaksjon mellom stasjonærfasen og prøvematriksen (52).

Prinsippet i massespektrometri består av å separere ioner i gassfase etter deres masse ( $m$ ) til ladning ( $z$ ) forhold ( $m/z$ ). Et massespektrometer består av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. Ionekilden gir opphav til ioner i gassfase og hvilken kilde som benyttes avhenger av fasen til prøven og analyttene. Elektrosprayionisasjon (ESI) er foretrukket for væskeprøver med polare og/eller sure/basiske analytter. Analyttene kan allerede foreligge på ionisk form i den mobile fasen, eller bli ionisert i ionekilden. Prinsippet bak ESI innebærer at væsken fra HPLC systemet passerer gjennom et tynt kapillærrør omgitt av en svært varm ( $>200^{\circ}\text{C}$ ) nitrogengass. I kombinasjon med et elektrisk felt vil væsken omdannes til aerosoler ved utgangen av kapillærrøret. Når løsemiddelet i aerosolen fordampes til små, ustabile væskedråper, vil de frastøtende, elektriske kreftene i dråpene bli så store at frie ioner unnslipper til gassfase (53, 54). Disse ionene blir deretter ført videre til masseanalysatoren.

Etter ionekilden føres ionene inn i instrumentet, som opererer under høyt vakuum for å unngå kollisjoner mellom ionene som analyseres. Dette gir lite tap av ioniserte analytter og høy følsomhet (55).

Det finnes flere typer masseanalysatorer med ulike egenskaper. Blant de vanligste og mest robuste er kvadrupoler (56). En kvadrupol består av fire stavformede poler. Stavene blir parvis applisert konstant likespenning eller vekselspanning i radiofrekvensområdet, som danner et elektrisk felt. Når ioner fra ionekilden entrer det elektriske feltet vil de få en oscillerende<sup>10</sup> bevegelse, og kun ioner med bestemt  $m/z$  vil få stabile oscillasjoner som tillater dem å passere gjennom kvadrupolen. Ionene med ustabile oscillasjoner vil kollidere med kvadrupolen, eller passere ut til siden gjennom stavene, og dermed ikke nå frem til detektoren (53).

Ved fysisk sammenkobling av flere masseanalysatorer vil masseanalysen skje i minst to trinn. Denne teknikken kalles tandem massespektrometri (MS/MS). I det første trinnet selekteres et bestemt målion, som deretter fragmenteres til datterioner for videre analyse. Et eksempel på denne metoden er anvendelsen av tre kvadrupoler, kjent som en trippelkvadrupol (QqQ), se figur 1.9. I QqQ-systemet gjennomgår målionet først en masseanalyse i kvadrupol 1 (Q), deretter fragmenteres målionet til datterioner i kvadrupol 2 (q) og datterioner analyseres i kvadrupol 3 (Q) (53). Datterionene som analyseres i kvadrupol 3 kan kategoriseres som kvantifiseringsion (høyest signal) og kvalifiseringsion. Fordelen med MS/MS er økt selektivitet og bedre sensitivitet grunnet mindre støy (57).



**Figur 1.9.** Væskerkromatografi - tandem massespektrometri (HPLC-MS/MS) system med illustrert mobilfasereservoar, autosampler, pumpe og kolonne for HPLC. For ionisasjon og masseanalysator illustrert ved elektrosprayionisasjon (ESI) og trippelkvadrupol (QqQ). Ioner fra ESI blir selektert i kvadrupol 1, hvor ett målion blir selektert og videresendt til kvadrupol 2. Målionet gjennomgår fragmentering ved tilføring av energi, og datterioner videreføres til kvadrupol 3, hvor kvantifiserings- og kvalifiseringsioner sendes til detektor (Laget i BioRender).

<sup>10</sup> Oscillerende bevegelser betyr faste regelmessige svingninger, en jevn fast rytme

## Bruk av HPLC - MS/MS til å analysere BuChE

Ved analyse av proteiner eller proteinaddukter, som er lite flyktige, er LC-MS den mest utbredte metoden (51). Det er hovedsakelig to strategier som kan benyttes: top down eller bottom up. Top down tilnærmingen analyserer det intakte proteinet, mens bottom up tilnærmingen innebærer enzymatisk hydrolyse hvor proteinet blir brutt ned i mindre peptider i forkant av analysen. Ved begrenset prøvevolum, som ved DBS, og med et målprotein i lav konsentrasjon, vil en bottom up tilnærming gi bedre kvantifisering ved bruk av MS (58). For biologiske prøver som serum eller plasma vil enzymatisk hydrolyse generere en stor mengde peptider i ulike konsentrasjoner, som må separeres fra hverandre for optimal MS-analyse. Det er av den grunn nødvendig å kombinere MS med HPLC, for å separere peptidene før masseanalysen (58).

Ved binding til Serin<sub>198</sub><sup>11</sup> danner OPNA og BuChE adduktproteinet OP-BuChE. Etter isolering og enzymatisk hydrolyse av OP-BuChE med pepsin, vil aminosyresekvensen som inneholder Serin<sub>198</sub> alltid kløyves likt, og det vil dermed alltid ha en konstant molekylær masse (59, 60). Ved bruk av MS/MS er det mulig å selekttere målionet (peptid med Serin<sub>198</sub>) i kvadrupol 1, fragmentere i kvadrupol 2 og analysere datterionene i kvadrupol 3. Dette prinsippet, kjent som Multiple Reaction Monitoring (MRM), tillater både kvalitativ og kvantitativ analyse av BuChE og OP-BuChE i blodprøver, da OPNA konsekvent binder til Serin<sub>198</sub>.

## 1.7 Statistiske signifikanstester

Statistiske metoder benyttes i den hensikt å indikere sannsynligheten for at den observerte ulikheten mellom datasettene skyldes tilfeldigheter eller ikke. Dette omtales som statistisk signifikans (61). Det finnes flere ulike tester som kan benyttes ut fra antall replikater og type data som er tilgjengelig.

Ved sammenligning av to datasett med målinger kan det benyttes en student *t*-test. Den tar utgangspunkt i en nullhypotese som påstår at gjennomsnittet for datasettene er det samme. *t*-testen angir en *p*-verdi, som representerer sannsynligheten for at ulikheten mellom de to datasettene skyldes tilfeldigheter under antagelsen om at nullhypotesen er sann. En lavere *p*-verdi indikerer større sikkerhet i at opphavet til ulikhetene ikke er tilfeldig (61).

Ved sammenligning av tre eller flere datasett benyttes en «analysis of variance»-test (ANOVA). En ANOVA-test i seg selv vil kun angi om det er ulikheter mellom datasettene, men spesifiserer ikke mellom hvilke datasett. Dersom ANOVA-testen utviser statistisk signifikans vil det dermed være nødvendig å utføre ytterligere tester for å identifisere hvilke datasett som er signifikant ulike (61). En slik test kalles post hoc, og blant disse er Tukeys metode den mest brukte til å sammenligne datasett på tvers av grupper (62).

For begge overnevnte statiske metoder stilles følgende krav ved anvendelse; normalfordeling, kontinuerlig data, homogen varians, uavhengige observasjoner og randomisert prøvetaking (63, 64).

---

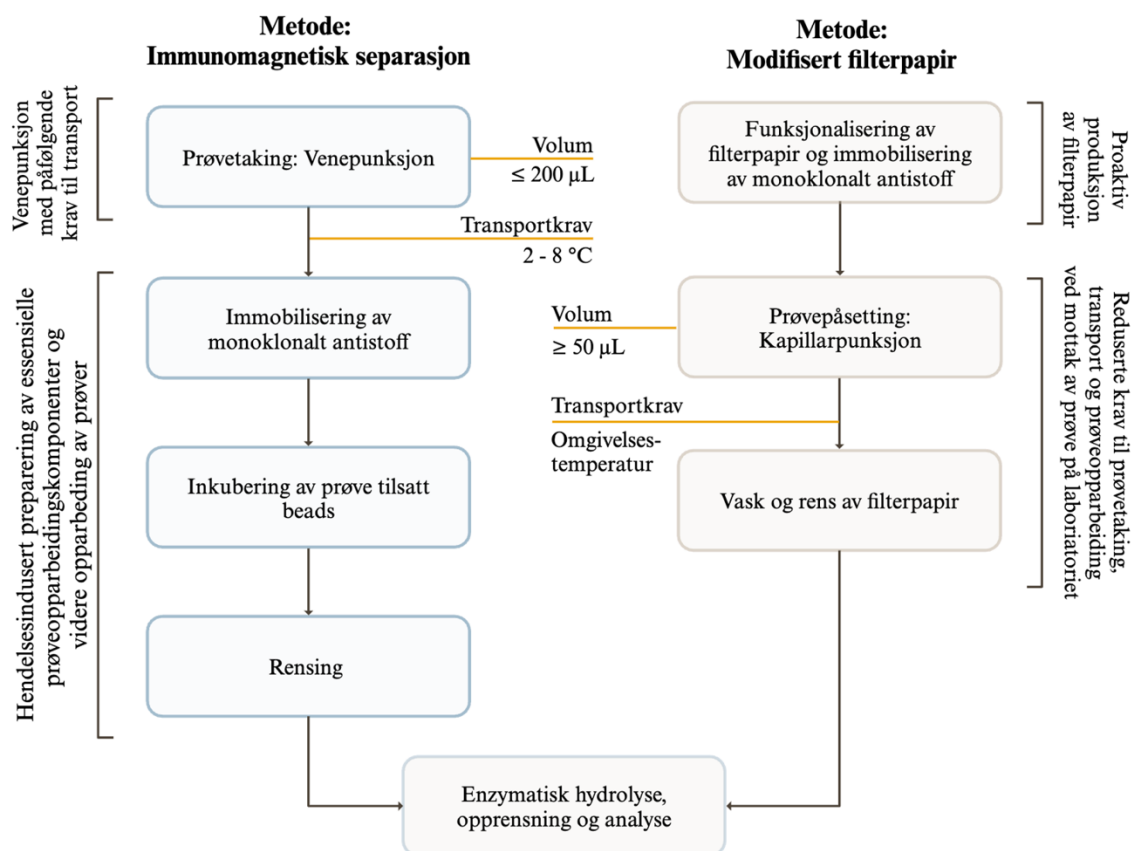
<sup>11</sup> Serin<sub>198</sub> er en aminosyre i butyrylkolinesterase

## 1.8 Hensikt med forsøket

Den stadig økende geopolitiske spenningen i verden, samt muligheten for bruken av OPNA, etablerer nødvendigheten av effektive metoder for påvisning ved OPNA-eksponering. Metodene som anvendes i dag for påvisning av OPNA ved bruk av BuChE som biomarkør, benytter serum og IMS. Serum som prøvemateriale stiller krav til prøvetaking, oppbevaring og transport. Dette begrenser muligheten til å innhente prøver så raskt som mulig ved mistanke om eksponering. Det er dermed av interesse å utvikle metoder som reduserer disse kravene og legger til rette for rask og enkel prøvetaking, uten at det går på bekostning av kvaliteten til prøven.

Denne oppgaven har til hensikt å undersøke om antistoff-antigenspesifisiteten som benyttes i IMS kan videreføres til filterpapir, ved å immobilisere BuChE-antistoff direkte på filterpapiret ved to ulike forankringsmetoder. Ved at ekstraksjonsprosessen av BuChE starter på filterpapiret, vil prøveopparbeiding i forkant av analysen reduseres, slik at analyseresultater kan innhentes raskere. Oversikt over metodespesifikke forhold, henholdsvis IMS og modifisert filterpapir, er illustrert i figur 1.10.

Forankringsmetodene som skal vurderes for modifikasjon av filterpapir ved immobilisering av antistoff er: streptavidin-biotin på filterpapir av grad 1 (41) og divinylsulfon på filterpapir av grad CF12 (42). Det skal undersøkes i hvilken grad de modifiserte filterpapirene evner å binde BuChE fra serum. Dersom det oppnås tilstrekkelig signal-til-støy forhold ( $S/N \geq 3$  for BuChE fra de modifiserte filterpapirene, er det ønskelig å teste effekten OPNA har på bindingen av BuChE til de modifiserte filterpapirene. For å vurdere ytelsen til de modifiserte filterpapirene, vil analyseresultater sammenlignes relativt til en etablert metode (DynaBeads™). Denne sammenligningen vil gi innsikt i hvorvidt de modifiserte filterpapirene kan være et effektivt alternativ til eksisterende metoder for ekstraksjon og analyse av BuChE.



**Figur 1.10.** Grafisk fremstilling av metodespesifikke forhold, henholdsvis immunomagnetisk separasjon ved bruk av magnetiske beads og immunoekstraksjon på modifisert filterpapir (Laget i BioRender).

## 2. Materialer og metode

I dette kapittelet oppgis materialer og metoder som er benyttet under prosjektet. Utstyr, reagenser og løsninger oppdrives i kapittel 2.1. Tillaging av løsninger oppdrives i vedlegg A. De anvendte metodene for det praktiske laboratoriearbeidet er angitt i kapittel 2.2.

### 2.1 Materialer

I dette kapittelet angis benyttet utstyr i tabell 2.1, benyttede reagenser i tabell 2.2 og tilleggde løsninger i tabell 2.3.

#### 2.1.1 Utstyr

**Tabell 2.1** Anvendt utstyr med produsent og modellnavn som er benyttet til prøveopparbeiding med DynaBeads™ og filterpapir.

Utstyr	Produsent	Modell
Analysevekt R1	Mettler Toledo	AE260 Delta Range ®
Analysevekt R2	Mettler Toledo	AT200 Bergman
Magnetisk prøveholder	Thermo Fischer Scientific	DynaMag-2 Magnet
Sentrifuge	VWR	Micro Star 21R
ThermoMixer C m/ ThermoTop	Eppendorf	ThermoMixer C (24 plasser)
Whirlmixer (vortexer)	Merck Eurolab	MELB1719 (EU)
Eksikator	Nalgene	5317-0180
Ristemaskin	Heidolph	Rotamax 120
Varmeblokk	Techne	Sample concentrator Dri block DB3
Pierce TM Antibody biotinylation kit for IP	Thermo Scientific	90407
pH meter	Hack	SensION+, PH31
MilliQ-vann systemet	Merck	Advantage A10 Millipore
<b>1290 infinity II LC System</b>	Agilent	
Multisampler	Agilent	
High speed pump	Agilent	
Coloum compartment 1290 MCT	Agilent	
6495 triple quadrupole LC/MS system	Agilent	
Mobilfase reservoar (1000mL)	Schott Duran	Youtility
Kolonne (2,1x100mm, 1,8µm)	Agilent	Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid resolution HD



**Tabell 2.1** Fortsetter

Utstyr	Produsent	Modell
<b>Pipetter</b>		
0,2-2 µL	Labsystems	Finnpipette 4500
5-40 µL	Labsystems	Finnpipette 4500
10-100 µL	Thermo Scientific	Finnpipette F2
40-200 µL	Labsystems	Finnpipette 4500
100-1000 µL	Thermo electron corporation	Finnpipette 4500
100-1000 µL	Thermo Scientific	Finnpipette F2
1-5 mL	Labsystems	Finnpipette 4500
1-10 mL	Thermo Scientific	Finnpipette F2
<b>Pipettespisser</b>		
< 200 µL	Thermo Scientific	Finntip flex 200
< 1000 µL	Thermo Scientific	Finntip flex 1000
5 mL	Thermo Scientific	Finntip 5 mL
10 mL	Thermo Scientific	Finntip 10 mL
Falcon tube	Sarstedt	50 mL og 15 mL
LoBind Eppendorfrør	Thermo Scientific	Low Protein binding microcentrifuge tubes, 1,5 mL
10 kDa Amicon Ultra Molecular Weight Cut-Off (MWCO) filter	Sigma Aldrich Merck Millipore	Amicon ultra - 0,5 mL centrifugal filters
Glass med insert 300 µL	Thermo Scientific	Chromacol 300 µL
Korker til glass med insert	Thermo Fischer Scientific	Chromacol
Filterpapirpuncher	Harris	Uni-core™ 6,0 mm
Whatman filterpapir	Sigma Aldrich Cytiva	903™ protein saver card
Whatman® qualitative filter paper	Sigma Aldrich Cytiva	Grade 1 (Ø 150 mm)
Whatman® qualitative filter paper	Sigma Aldrich Cytiva	Grade CF12 (size 210 x 297 mm)

## 2.1.2 Kjemikalier og løsninger

**Tabell 2.2.** Anvendte kjemikalier med produsentnavn, molarmasse (g/mol), renhet (%), konsentrasjon og produsent.

Produsentnavn	Molar masse (g/mol)	Renhet(%) Konsentrasjon Mengde	Produsent
Dynbeads protein G Størrelse: 2,8µm		30mg/mL	Thermo Fischer Scientific
Tris buffered saline (TBS) C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	121,136	10X	Sigma-Aldrich
Triethanolamine buffer solution (TEA) C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	149,19	0,2M TEA	Sigma-Aldrich

**Tabell 2.2.** Fortsetter

Produsentnavn	Molar masse (g/mol)	Renhet(%) Konsentrasjon Mengde	Produsent
Dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP) [CH <sub>3</sub> OC(=NH)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> · 2HCl	259,17	100 %	Sigma Aldrich
Natriumhydroksid NaOH	40		Merck
Divinylsulfon (DVS) (CH <sub>2</sub> =CH) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	118,15	≥ 96%	Sigma Aldrich
Natriumkarbonat Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,988	≥ 99%	Sigma Aldrich
Tris HCl (pH = 8) C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>3</sub>	157,594	1 M	Thermo Scientific
Saltsyre HCl	34,46	30 %	Merck
Ammonium hydrogen karbonat (ABC) CH <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	79,06	≥ 99,9%	VWR international
Maursyre (FA) HCOOH	46,03	100 %	Thermo Scientific FA LCMS-grade
Pepsin, <i>porcine gastric mucosa</i>	35000	≥ 3,200 U/mg	Sigma Aldrich
MilliQ vann H <sub>2</sub> O	18,02	4 ppb TOC	Merck Millipore
BuChE monoklonalt antistoff (3E8)		1000 mg/mL	Invitrogen by Thermo Fisher
Humant serum (BuChE)			Sigma Aldrich
Phosphate buffered saline (PBS) Cl <sub>2</sub> H <sub>3</sub> K <sub>2</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	411,04	10X	Sigma Aldrich
20X PBS Tween <sup>TM</sup> - 20 Fosfat, NaCl 0,15 M, 0,05% Tween-20		20X	Thermo Scientific
Emsure ® Acetic acid for analysis	96%		Merck
Metanol (LC-MS grade) CH <sub>4</sub> O	32,04		Sigma Aldrich
Acetonitrile for HPLC (LC-MS grade) H <sub>3</sub> CCN	41,05	100 %	VWR Chemicals
Isopropanol (2-propanol for HPLC) C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60,1		VWR Chemicals
Nitrogengass			Peak Scientific Solaris XE



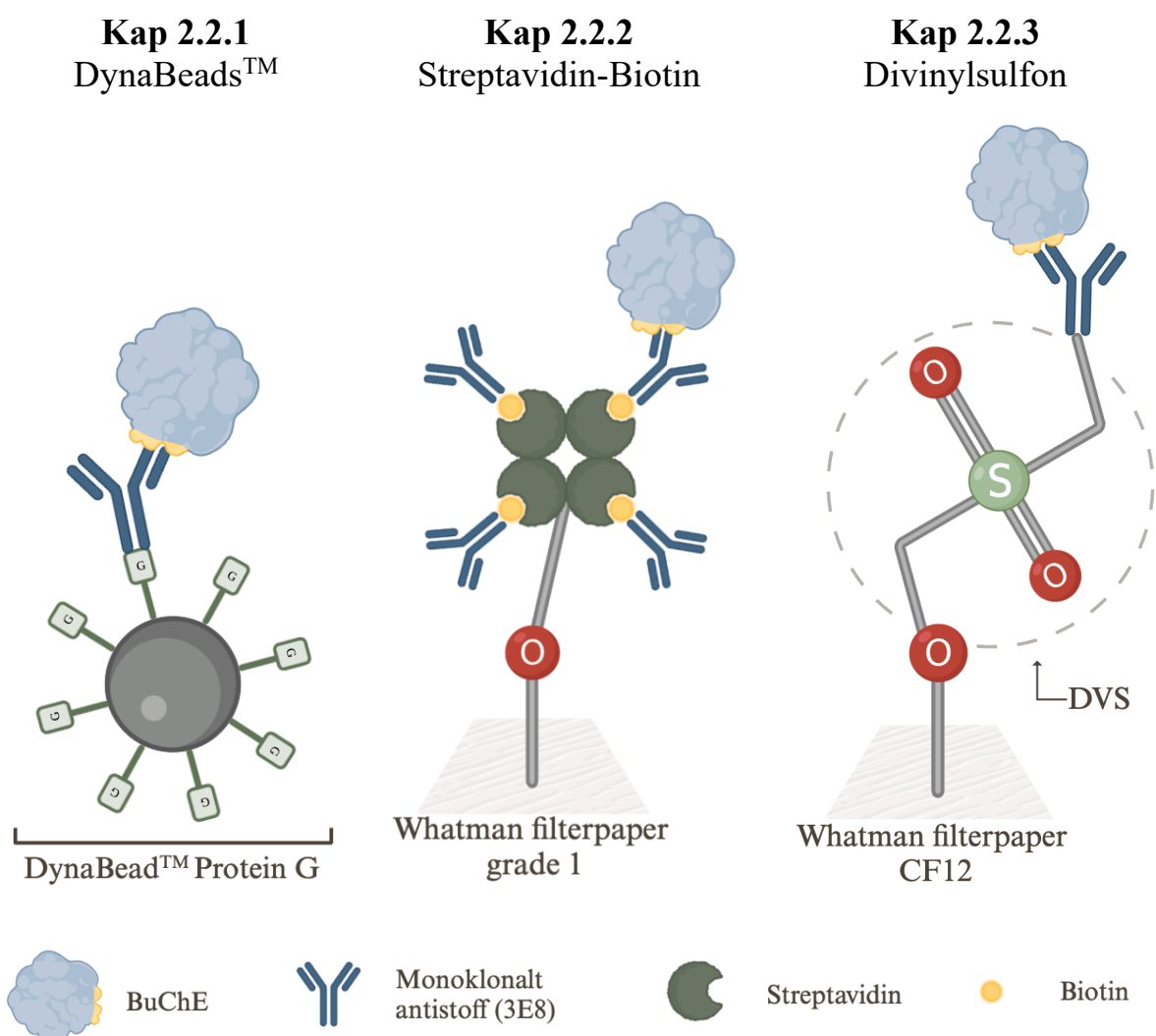
**Tabell 2.3.** Tillagde løsninger med produsentnavn, konsentrasjonsforhold (fordeling) og konsentrasjon

<b>Produsentnavn</b>	<b>Fordeling</b>	<b>Konsentrasjon</b>
VX-løsning	(v/v)	40 $\mu$ M VX i ACN
VX-eksponert humant serum (OP-BuChE)	(v/v)	1% VX-løsning i serum
PBS	(v/v)	1X
PBST	(v/v)	1X med 0,05% Tween
ABC løsning	(w/v)	50 mM
HCl	(v/v)	1M
HCl	(v/v)	1 mM
HCl	(v/v)	1,05 mM
TBS buffer	(v/v)	1X
DMP i TEA	(w/v)	5,4 mg/mL
Fortynnet DMP i TEA	(w/v)	0,54 mg/mL
Fortynnet Antistoffløsning i PBS (BEADS)	(w/v)	50 $\mu$ g/mL
Fortynnet serum i PBS	(v/v)	
Kaliumperjodat	(w/v)	0,018 M
Streptavidin (SA) i HCl løsning	(w/v)	2% SA i 1mM HCl
Biotinylert antistoffløsning i PBS	(w/v)	500 $\mu$ g/mL
Fortynnet antistoffløsning i PBS (grad1)	(w/v)	2,3 $\mu$ g/mL
BSA-PBS løsning	(v/v)	0,05% BSA
Natriumkarbonatløsning	(w/v)	0,1 M
Divinylsulfonløsning	(v/v)	10% DVS
Fortynnet antistoffløsning i HCl (CF12)	(w/v)	50 $\mu$ g/mL
Natriumhydroksidløsning	(w/v)	1 M
Tris-HCl buffer, ph justert til 7,4	(v/v)	10 mM
Tris-HCl buffer, ph justert til 9,0	(v/v)	50 mM
Maursyreløsning	(v/v)	5 %
Pepsin stamløsning i maursyre	(w/v)	2 mg/mL
Fortynnet pepsinløsning i MilliQ vann	(w/v)	250 $\mu$ g/mL
Seal Wash (90% H <sub>2</sub> O, 10% Isopropanol)	(v/v)	
Autosampler nålevask (70% MeOH 30% H <sub>2</sub> O)	(v/v)	

Tillaging av alle løsninger som er oppgitt i tabell 2.3 er beskrevet i vedlegg A.

## 2.2 Metode

For å måle konsentrasjonen av enzymet BuChE i serum ble det benyttet tre ulike metoder for immunoekstraksjon (figur 2.1). En veletablert metode for ekstraksjon av BuChE benytter IMS ved bruk av antistoff-preparerte DynaBeads™ i henhold til Noort et al. (24). De to andre metodene baserer seg på modifisert filterpapir med immobilisert monoklonalt antistoff (mAb) på overflaten. Metoden angitt i kapittel 2.2.2 benytter streptavidin-biotin binding til forankringen av antistoffet på Whatman qualitative filterpaper grade 1, som beskrevet av Johannsen et al. (41). Metoden i kapittel 2.2.3 benytter DVS som et bindeledd mellom filterpapiet og antistoffet på Whatman qualitative filterpaper grade CF12, som beskrevet av Mrsa et al. (42). Serum ble eksponert for OPNA VX som beskrevet i kapittel 2.2.4, og videre applisert DynaBeads™ og begge typer filterpapirprøver. Etter binding av BuChE gjennomgikk både serum- og OPNA-prøvene enzymatisk hydrolyse med pepsin og ultrafiltrering som beskrevet i kapittel 2.2.5. Prøvene ble analysert med LC-MS/MS som beskrevet i kapittel 2.2.6.



**Figur 2.1.** Grafisk fremstilling av de tre ulike metodene for immunoekstraksjon av BuChE, henholdsvis ved DynaBeads™ og to filterpapirmetoder hvor antistoffet er immobilisert ved streptavidin-biotin eller divinylsulfon (DVS) som forankringsteknikk (Laget i BioRender).

### 2.2.1. Immunomagnetisk separasjon av butyrylkolinesterase fra serum ved DynaBeads™

Metoden hentet fra Noort et al. (24) er justert etter anbefalinger fra samtale med forsker Alex Fidder (desember 2023). Prøveopparbeiding for å måle konsentrasjonen av enzymet BuChE i serum består av to trinn; binding av spesifikt BuChE-antistoff til DynaBeads™ og IMS av BuChE fra serum. Prosedyren i dette kapittelet gir 100 µL DynaBeads™, som tillater opparbeiding av fem serumprøver.

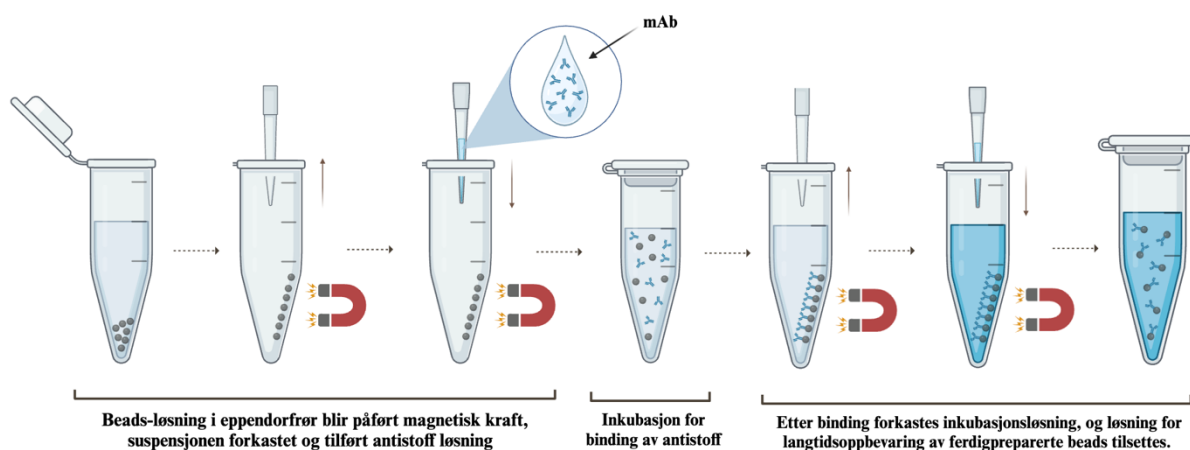
DynaBeads™ er magnetiske og kan pelletteres ved å holdes mot en magnet. I prosedyren under vil forkastning (avpipettering) av supernatant alltid utføres etter at beads i eppendorfrør har vært plassert på en magnetholder i 30 sekunder. Etter hver tilsetning av løsning, eller endt inkubasjon, er det viktig å homogenisere prøven ved mild/kort vortexing.

#### Binding av BuChE-antistoff til DynaBeads™

Ett eppendorfrør ble tilsatt 100 µL DynaBeads™ i løsning, og supernatant ble forkastet. For vask av beads ble 200 µL PBS [1X] tilsatt tre ganger, og supernatanten forkastet mellom hver tilsetning. DynaBeads™ ble tilsatt 400 µL antistoffløsning [50 µg/mL], og satt til inkubasjon over natt (16-18 timer) på ThermoMixer (22°C, 600 rpm). Prøven ble vortexet for homogenisering én gang i løpet av inkubasjonstiden.

Etter inkubasjon ble supernatanten forkastet, og prøven vasket to ganger med 200 µL TEA buffer [0,2 M]. Supernatanten ble forkastet. For kovalent binding av BuChE-antistoff til DynaBeads™, ble 200 µL fortynnet DMP i TEA [0,54 mg/mL] tilsatt beadsene, og inkubert i 30 minutter på ThermoMixer (22°C, 600 rpm). Etter inkubasjon ble supernatanten forkastet. DynaBeads™ ble tilsatt 200 µL TBS [1X] og inkubert i 15 minutter på ThermoMixer (22°C, 600 rpm) for å stoppe reaksjonen av DMP med antistoff-bundne beads. Supernatant ble forkastet og beads ble vasket med 200 µL PBST [1X PBS med 0.05% Tween] tre ganger.

Ferdig tillagde DynaBeads™ ble lagret i 100 µL PBST [1X PBS med 0.05% Tween] for oppbevaring ved 4°C frem til bruk. Metoden er illustrert i figur 2.2.

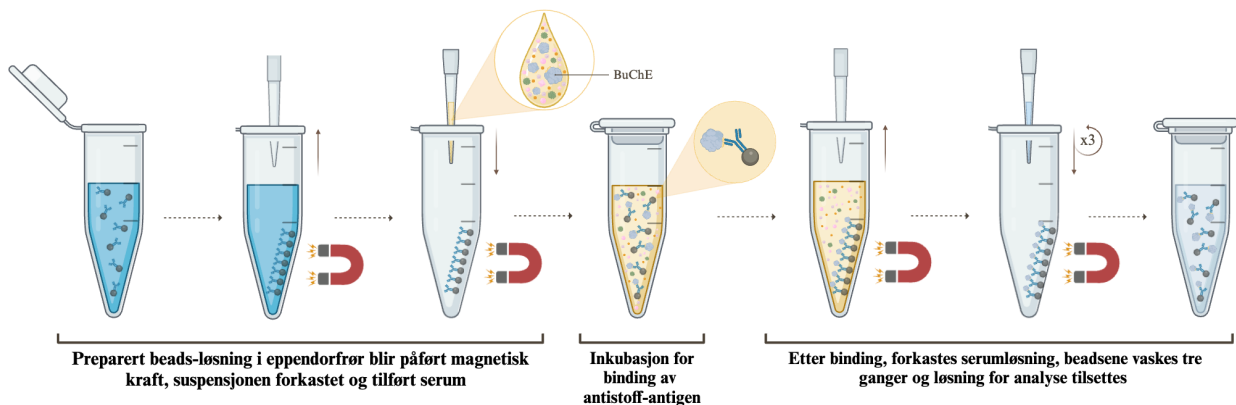


**Figur 2.2.** Enkel illustrasjon av funksjonalisering av DynaBeads™ ved binding av monoklonalt antistoff (mAb) (Laget i BioRender).

## IMS av enzymet BuChE fra serum

Ett eppendorfrør ble tilsatt 20  $\mu\text{L}$  romtemperert ferdig tillagde DynaBeads™. Supernatanten ble forkastet og 200  $\mu\text{L}$  fortynnet serum ble tilsatt. Prøven ble inkubert i 120 minutter på ThermoMixer (22°C, 1000 rpm). Etter inkubasjon ble supernatanten forkastet, og prøven vasket tre ganger med 500  $\mu\text{L}$  PBS [1X]. Supernatanten ble forkastet etter hver tilsetning. Metoden er illustrert i figur 2.3.

Videre prøveopparbeiding, som inkluderer enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering er beskrevet i kapittel 2.2.5.



**Figur 2.3.** Enkel illustrasjon av immunomagnetisk separasjon av butyrylkolinesterase (BuChE) ved bruk av DynaBeads™ (Laget i BioRender).

### 2.2.2. Biotinylert antistoff bundet til streptavidin på Whatman® qualitative filter paper grade 1

Metoden er hentet fra Johannsen et al. (41) og tar utgangspunkt i immunoekstraksjon av BuChE på modifisert Whatman® qualitative filter paper grade 1. Prøveopparbeidingen består av å oksidere filterpapiret, og deretter immobilisere streptavidin til det oksiderte filterpapiret, for videre å binde biotinylert mAb til streptavidin. Serum blir deretter tilsatt det modifiserte filterpapiret for binding av BuChE.

Ved overføring av diskene mellom beholdere, ble diskene blottet på lofritt tørkepapir for å fjerne overflødig væske.

#### Oksidering av Whatman® qualitative filter paper grade 1

Fem diskene (Ø 6,0 mm) Whatman® grade 1 ble overført til to glassvialer (3+2). Vialene ble tilsatt 3 mL kaliumperjodat [0,018 M] hver, for fullstendig nedsenking (immersjon) av diskene i løsning. Vialene ble satt til inkubasjon i 120 minutter på Dri-Block DB3 (65°C). Ved endt inkubasjon ble diskene enkeltvis dyppet i MilliQ vann, separert og lagt på lofritt tørkepapir i eksikator over natt.

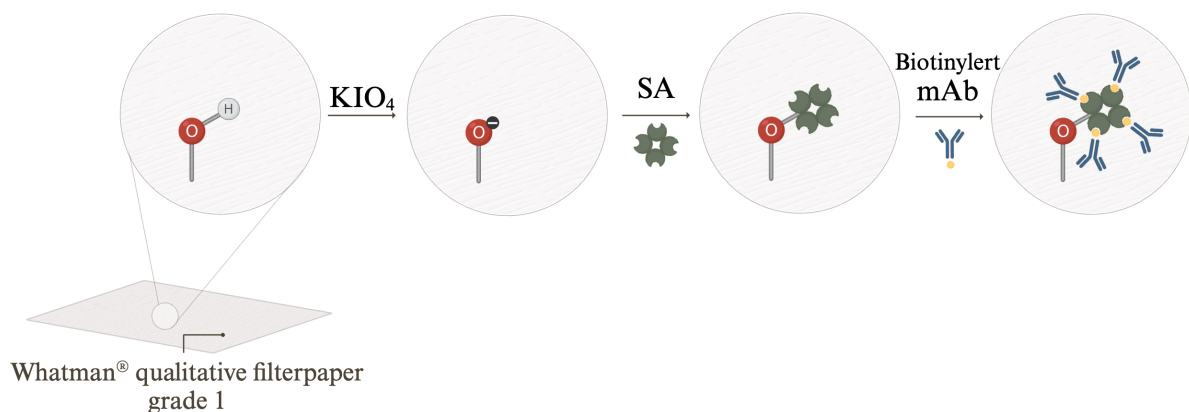
#### Immobilisering av streptavidin på oksidert Whatman® qualitative filter paper grade 1

Diskene ble plassert i hvert sitt eppendorfrør-lokk. Hver disk ble påført 5  $\mu\text{L}$  streptavidin-HCl løsning [2% (w/v) streptavidin i 1 mM HCl] for fullstendig spredning av streptavidin på diskens overflate. Eppendorfrørene ble lukket og satt til inkubasjon over natt ved romtemperatur.

Ved endt inkubasjon ble diskene overført til to nye vialer (3+2), tilsatt 1,5 mL HCl [10 mM] hver, og satt på risting i 5 minutter på Rotamax 120 (22°C, 200 rpm). Supernatant ble forkastet, og hver vial ble tilsatt 1,5 mL Tris-HCl [0,1 M] og satt på risting i 5 minutter på Rotamax 120 (22°C, 200 rpm). Diskene ble separert og lagt på lofritt tørkepapir i eksikator over natt (16-18 timer).

### Binding av biotinyllert antistoff til Whatman® qualitative filter paper grade 1 med immobilisert streptavidin

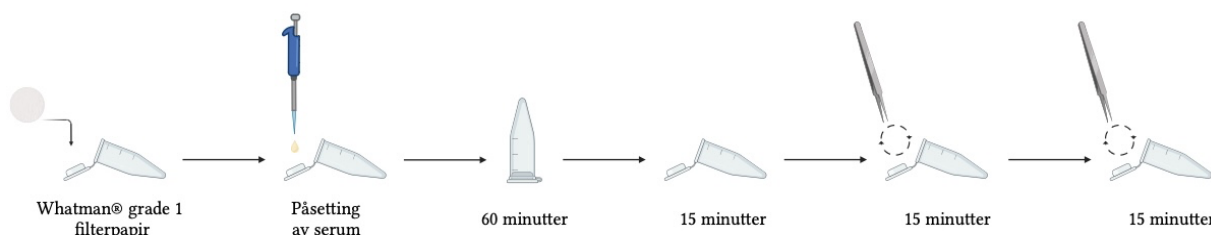
Tørre diskene med bundet streptavidin ble enkeltvis overført til hvert sitt eppendorfrør, og hvert eppendorfrør tilsatt 250 µL biotinyllert antistoffløsning [2,3 µg/mL]. Prøvene ble inkubert i 30 minutter på ThermoMixer (22°C, 1300 rpm). Ved endt inkubasjon ble diskene (3+2) overført til to vialer, og tilsatt 1,5 mL BSA-PBS [0,05% BSA (w/v) i 1X PBS] hver. Vialene ble plassert på risting i 5 minutter på Rotamax 120 (22°C, 200 rpm). Diskene ble separert og lagt på lofritt tørkepapir i eksikator i 120 minutter. Tillaging av modifisert grad 1 filterpapir er skjematisk illustrert i figur 2.4.



**Figur 2.4.** Visuell fremstilling av funksjonalisering av filterpapir grad 1 med kaliumperjodat ( $KIO_4$ ), binding av streptavidin (SA) til filterpapiret, og videre binding av biotinyllert antistoff (mAb) til SA (Laget i BioRender).

### Applisering av serum til modifisert filterpapir grad 1

Diskene ble plassert i hvert sitt eppendorfrør-lokk, tilsatt 20 µL serum, lukket, og inkubert ved romtemperatur i 60 minutter. Eppendorfrørene ble åpnet, og diskene stod til lufttørring i 45 min. Diskene ble vendt etter 15 og 30 minutter. Skjematisk fremstilling av prosessen er presentert i figur 2.5.



**Figur 2.5.** Visuell fremstilling av applisering av serum til diskene av Whatman® qualitative filter paper grade 1, og påfølgende inkubering og tørkettrinn med vending av disk to ganger (Laget i BioRender).

Diskene ble overført til hvert sitt eppendorfrør. Diskene ble vasket med tre ulike vaskeløsninger á 1,5 mL i fem minutter på Rotamax 120 (22°C, 200 rpm) for hver vask. Vaskeløsningene var; PBST [1X PBS med 0,05% Tween], PBS [1X] og ABC [50 mM] i respektiv rekkefølge. Etter hver vask ble vaskeløsningen forkastet. Diskene ble lagt på lofritt tørkepapir i eksikator i 120 minutter.

Videre prøveopparbeiding, som inkluderer enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering er beskrevet i kapittel 2.2.5.

### 2.2.3. Monoklonalt antistoff bundet til divinylsulfon på Whatman® qualitative filter paper grade CF12

Metoden er hentet fra Mrsa et al. (42) og tar utgangspunkt i immunoekstraksjon av BuChE på modifisert Whatman® qualitative filter paper grade CF12. Prøveopparbeidingen består av å funksjonalisere filterpapiret med DVS, for deretter å binde mAb til DVS. Serum ble så applisert det modifiserte filterpapiret for binding av BuChE.

Ved overføring av disker mellom beholdere, ble diskene blottet på lofritt tørkepapir for å fjerne overflødig væske.

#### Aktivisering av filterpapir CF12 med DVS

Fem disker (Ø 6,0 mm) Whatman® grade CF12 ble overført til en glassvial og tilsatt 3 mL DVS-løsning [10% (v/v) DVS i 0,1 M natriumkarbonat, pH 11]. Vialen ble satt til risting i 120 minutter på Rotamax 120 (22°C, 200 rpm). Diskene ble overført til en vial inneholdende 3 mL MilliQ vann og vortexet i 30 sekunder for vasking. Dette ble gjentatt to ganger, med ny vial ved hver vask. Diskene ble separert og lagt til tork på lofritt papir i eksikator i 120 minutter.

#### Kovalent binding av mAb til filterpapir CF12 med immobilisert DVS

Tørre disker med DVS ble plassert i hvert sitt eppendorfrør, tilsatt 100 µL antistoffløsning [50 µg/mL] og inkubert i 120 minutter på ThermoMixer (37°C, 800 rpm).

Ved endt inkubering ble diskene overført til nye eppendorfrør inneholdende 1 mL PBST [1X PBS med 0,05% Tween] hver. For å blokkere ubundne DVS-grupper ble eppendorfrørene satt til risting i 60 minutter på Rotamax 120 (22°C, 200 rpm).

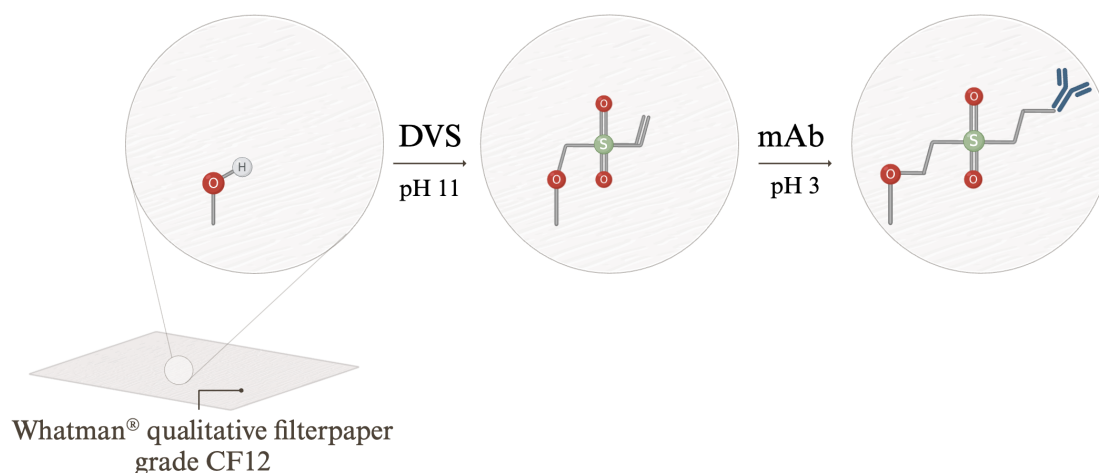
Diskene ble overført til nye eppendorfrør inneholdende 1 mL Tris-HCl [10 mM, pH 7,5]. Eppendorfrørene ble satt til risting i 10 minutter på ThermoMixer (22°C, 600 rpm) og lagt til tork på lofritt tørkepapir i eksikator i 120 minutter. Ved lengre oppbevaring ble diskene plassert i tett beholder med tilstedeværende tørkemiddel og lagret ved 4°C.

#### Binding av enzymet BuChE til filterpapir CF12 med immobilisert mAb

Diskene ble plassert i hvert sitt eppendorfrør-lokk, tilsatt 20 µL serum, og inkubert ved romtemperatur i 120 minutter. Ved endt inkubasjon ble alle diskene overført til ett eppendorfrør, og vasket med fire løsninger; 500 µL PBST [1X PBS med 0,05% Tween], 500 µL PBS [1X], 400 µL Tris-HCl [50 mM, pH 8,9] og 300 µL ABC-løsning [50 mM (w/v)]. For hver løsning ble diskene satt til risting i 1 minutt på ThermoMixer (22°C, 800 rpm). Diskene ble lagt på lofritt tørkepapir i eksikator i 120 minutter. Ved lengre oppbevaring ble diskene plassert i tett beholder med tilstedeværende tørkemiddel og lagret ved 4°C. Tillaging av CF12 filterpapir er skjematisk illustrert i figur 2.6.

Videre prøveopparbeiding, som inkluderer enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering er beskrevet i kapittel 2.2.5.





**Figur 2.6.** Visuell fremstilling av funksjonalisering av filterpapir grade CF12 med divinylsulfon (DVS) ved pH 11 og videre binding av antistoff (mAb) til DVS ved pH 3 (Laget i BioRender).

#### 2.2.4 Organofosfat nerveagenset VX-eksponering av serum

Serum ble eksponert for organofosfat nerveagenset VX i henhold til protokoll beskrevet i vedlegg C, og ble utført på FFI av ekstern veileder Ingvild C. Hvinden.

Det ble tillaget totalt femten prøver, fem replikater for hver metode, henholdsvis kapittel 2.2.1, 2.2.2 og 2.2.3.

#### 2.2.5. Enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering

Følgende prøveopparbeiding er felles for gjennomgåtte metoder av immunoekstraksjon av BuChE, som beskrevet i kapittel 2.2.1-2.2.3. Da peptider er enklere å separere på LC og analysere med MS, sammenlignet med intakte proteiner, blir prøvene enzymatisk hydrolysert med pepsin, for bedre analysebetingelser. BuChE brytes ned til flere peptider, hvorav ett vil være nonapeptidet som har nervestridsmiddelet bundet til seg (sekvens FGES<sub>198</sub>AGAAS). Prøvene ble deretter ultrafiltrert for å fjerne partikler fra prøvene.

Metodespesifikke forhold må videreføres, herunder magnetholder ved arbeid med beads, og fullstendig immersjon av diskene i løsning.

Denne delen av metoden inneholder momenter som er tidssensitive. Enzymet pepsin er autolytisk, og det var av den grunn viktig å tillage pepsin-løsningen nært forestående anvendelsen. Til hver prøve ble 100 µL fortynnet pepsinløsning [250 µg/mL i 0,625% maursyre] tilsatt for proteolyse av BuChE. Prøven ble inkubert i 90 minutter på ThermoMixer (37°C, 600 rpm).

Etter endt inkubasjon ble prøvene filtrert. Ettersom nye filter inneholder spormengder av glykol, som kan gi støy ved analyse, ble filterene vasket som følger;

Hvert 10 kDa Molecular Weight Cut-Off (MWCO) filter ble tilsatt 500 µL MilliQ vann, lagt i et mikrosentrifugerør, og sentrifugert i 25 minutter på MicroStar 21 R (4°C, 14,000 rpm). Ved endt sentrifugering ble restvann fjernet ved å banke filteråpningen mot et tørkepapir, deretter ble filteret overført til et nytt mikrosentrifugerør. Vasket filter ble brukt umiddelbart for å unngå uttørking.

Hele prøven ble overført til et vasket MWCO filter og sentrifugert i 25 minutter på MicroStar 21 R (4°C, 14,000 rpm). Filtratet (ca. 80 µL) ble overført til vial av glass med insert, og oppbevart ved 4°C i påvente av analyse. Ved lengre oppbevaring (>2 dager) ble prøven oppbevart ved minimum -20°C.

## 2.2.6 Analyse ved væskechromatografi - tandem massespektrometri

### Parametere for LC-MS/MS

HPLC-MS/MS instrumentet ble styrt med MassHunter LC-MS data Acquisition for Triple Quadrupole LC/MS (versjon 12.1).

Kolonnetemperaturen var 30°C. Mobilfase A bestod av 0,1% maursyre i MilliQ vann (v/v) og mobilfase B bestod av 0,1% maursyre i ACN (v/v). Mobilfasehastigheten var 0,3 mL/min. Gradienten var 0 min, 2% B; 5 min, 2% B; 20 min, 50% B; 22 min, 90% B; 25 min, 90% B; 25,5 min, 2% B; 28 min, 2% B. For multisamplere var injeksjonsvolumet 5 µL, opptrekk- og injeksjonshastighet var 200 µL/min og det var en ventetid på 1,2 sekunder etter opptrekk. Ionekilden var en Agilent Jet Stream ESI og MS opererte i positiv modus. Gasstrømmen hadde en hastighet på 12 L/min og temperatur på 290°C. Forstøver var på 40 psi. Kapillærspenning var 2500 V og dysespennings 0 V. Kappegassen hadde en hastighet på 12 L/min og en temperatur på 400°C. Kollisjonsspenningen var på 30 V.

Det ble benyttet tre ulike metoder: skann, MRM av BuChE og MRM av OP-BuChE. Felles for de tre metodene var at ioneformen var  $[M+H]^+$ , Ifunnel ble operert i standard modus og polariteten var positiv. Fragmenteringsspenning var 166 V og kollisjonsscelle akselerasjonsspenning var 5 V. I MRM metodene var dwell time 100 ms.

For fritt BuChE i serum ble det benyttet både skann og MRM. Det ble skannet over et område på 100 til 1000  $m/z$ . Den monoisotopiske massen til målionet var 796,3  $m/z$  og for MRM overgangene var produksjonene 620,3  $m/z$  og 691,3  $m/z$  (65).

For OP-BuChE var den monoisotopiske massen til målionet 902,3  $m/z$ . For MRM overgangene var produksjonene 673,2  $m/z$  og 778,3  $m/z$  (65).

### Ekstraksjon av rådata, signifikanstester og visualisering av data

Rådata ble prosessert med programvaren MassHunter Workstation Qualitative Analysis (versjon 10.0). MRM overgangene ble ekstrahert og manuelt integrert over retensjonstidene ( $R_t$ )  $8,98 \pm 0,02$  minutter (fritt BuChE) og  $10,17 \pm 0,03$  minutter (OP-BuChE) (vedlegg F).

S/N ble beregnet av programvaren hvorav et område på  $\pm 0,50$  minutter på hver side av BuChE-nonapeptid toppen i 1 ppb standarden ble markert for beregning.

Grafisk fremstilling av alle resultater og beregning ved ANOVA post hoc Tukey test er kodet i R-studio for R. De benyttede pakkene er; tidyverse, ggplot2, RCurl og rstatix. Koden er utarbeidet av Ingvild C. Hvinden og justert av Mirna Jarovic. Se vedlegg D for rådata og vedlegg E for R-kode.

Beregning ved  $t$ -test for fremstilte resultater ble utført på Graphpad.com (66). Se vedlegg G.



### 3. Resultater

Formålet med oppgaven var å utvikle to filterpapirmetoder for verifisering av eksponering for OPNA i serum. Det ble utført ved modifikasjon av filterpapir som utnyttet immunoekstraksjon, hvor mAb for biomarkør BuChE ble forankret på ulike måte på to ulike typer filterpapir. Ved å benytte modifisert filterpapir reduseres krav til prøvetaking og prøvevolum, i tillegg fjernes trolig krav til temperatur ved transport og oppbevaring. Ytterligere forenkles prøveopparbeidelse i forkant av analyse, slik at tid fra mottak av prøve til resultatet foreligger reduseres.

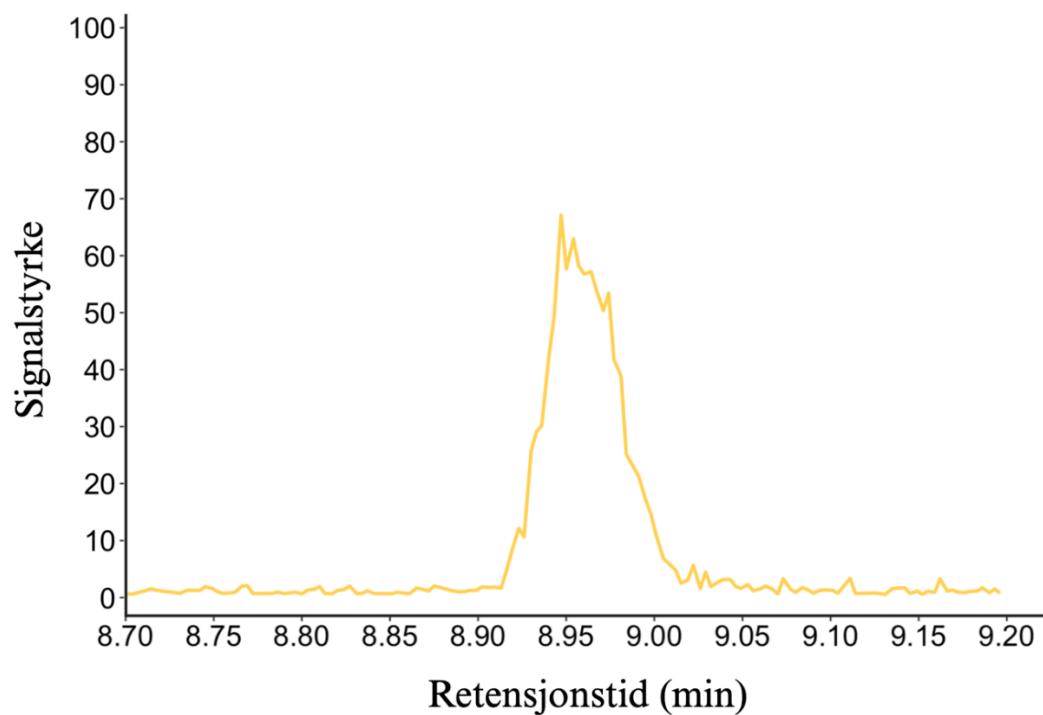
Det ble benyttet to ulike filterpapir (Ø 6 mm) med mAb forankret til papiret med hver sin metode. Filterpapirene var Whatman qualitative filter paper grade 1 og Whatman qualitative filter paper grade CF12, heretter kalt henholdsvis grad 1 og CF12. Forankring av mAb på filterpapiret av grad 1 ble utført via streptavidin-biotin binding, mens DVS ble benyttet som bindeledd mellom filterpapiret av grad CF12 og mAb.

Kapittelet beskriver resultatene fra forsøkene som er gjennomført i henhold til metodene angitt i kapittel 2.2. Forsøkene hadde til hensikt å undersøke nødvendigheten av forankringen av BuChE-antistoff til filterpapir, og videre undersøke om de modifiserte filterpapirene klarte å binde BuChE. Til slutt ble filterpapir med immobilisert BuChE-antistoff sammenlignet mot DynaBeads™, for å vurdere effektiviteten til papirene opp mot en etablert metode. Til dette ble det benyttet serum som var eksponert for nerveagenset VX med en konsentrasjon som sikret reaksjon med all BuChE til stede i serumet (vedlegg C).

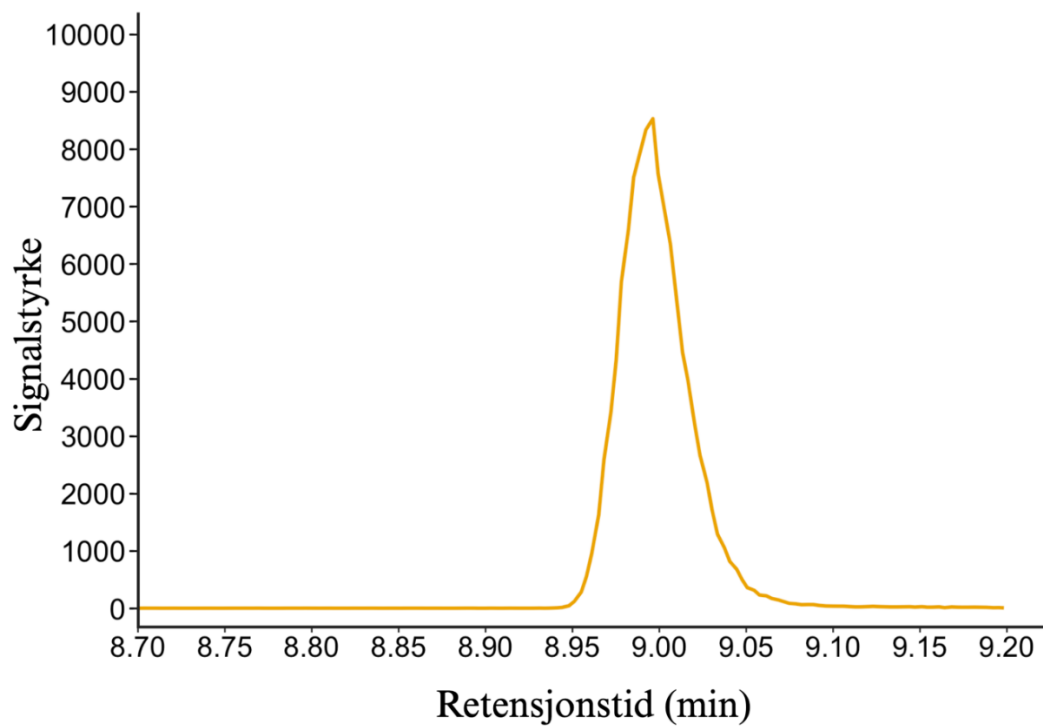
#### 3.1 Fastsettelse av retensjonstid og kvantifiseringsionet til BuChE nonapeptid

Når BuChE blir eksponert for OPNA vil det dannes et addukt ved spesifikk binding til S<sub>198</sub>. Ved enzymatisk hydrolyse med pepsin brytes BuChE ned til bestemte peptider, hvor S<sub>198</sub> er i nonapeptidet med sekvens FGES<sub>198</sub>AGAAS.

For å fastsette retensjonstiden ( $R_{t-BuChE}$ ) til nonapeptidsekvensen FGES<sub>198</sub>AGAAS ble det benyttet to BuChE-standarder, henholdsvis 100 ppb og 1 ppb i MilliQ vann. Det ble benyttet MRM med følgende overganger; 796,3  $m/z$  → 620,3  $m/z$  (BuChE MRM 1) og 796,3  $m/z$  → 691,3  $m/z$  (BuChE MRM 2) (65, 67). Kvantifiseringsionet (datterionet med størst toppareal) for samtlige injeksjoner ble observert ved overgang BuChE-MRM 2 (796,3  $m/z$  → 691,3  $m/z$ ). Resultatene som presenteres, tilhører den gitte kvantifiseringsovergangen. Retensjonstiden til BuChE ble beregnet til 8,98 min ± 0,02 min på en Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid resolution HD kolonne (vedlegg F). Kromatografisk fremstilling av begge standarder (kvantifiseringsionet for BuChE nonapeptid) er gjengitt i figur 3.1 og figur 3.2.



**Figur 3.1.** Kromatogram for standard av butyrylkolinesterase (BuChE) nonapeptid FGES<sub>198</sub>AGAAS med konsentrasjon 1 ppb. Signalstyrken er gitt som en funksjon av retensjonstiden i minutter.

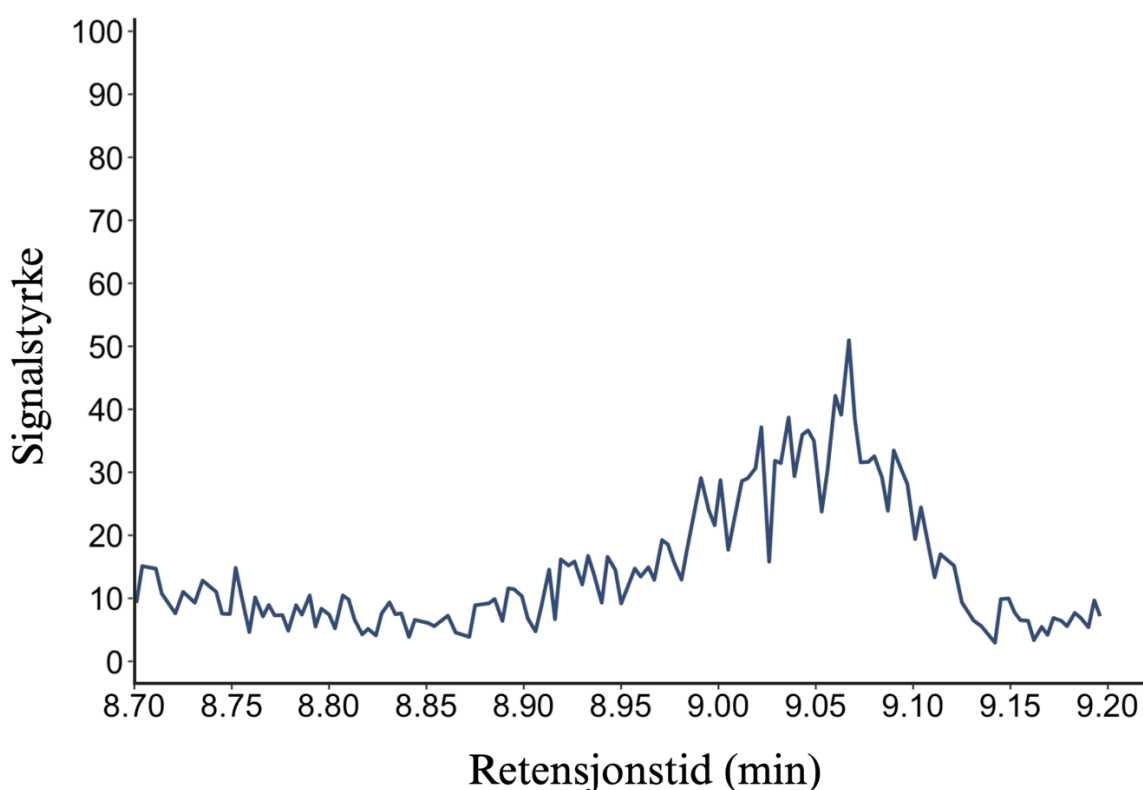


**Figur 3.2.** Kromatogram for standard av butyrylkolinesterase (BuChE) nonapeptid FGES<sub>198</sub>AGAAS med konsentrasjon 100 ppb. Signalstyrken er gitt som en funksjon av retensjonstiden i minutter.

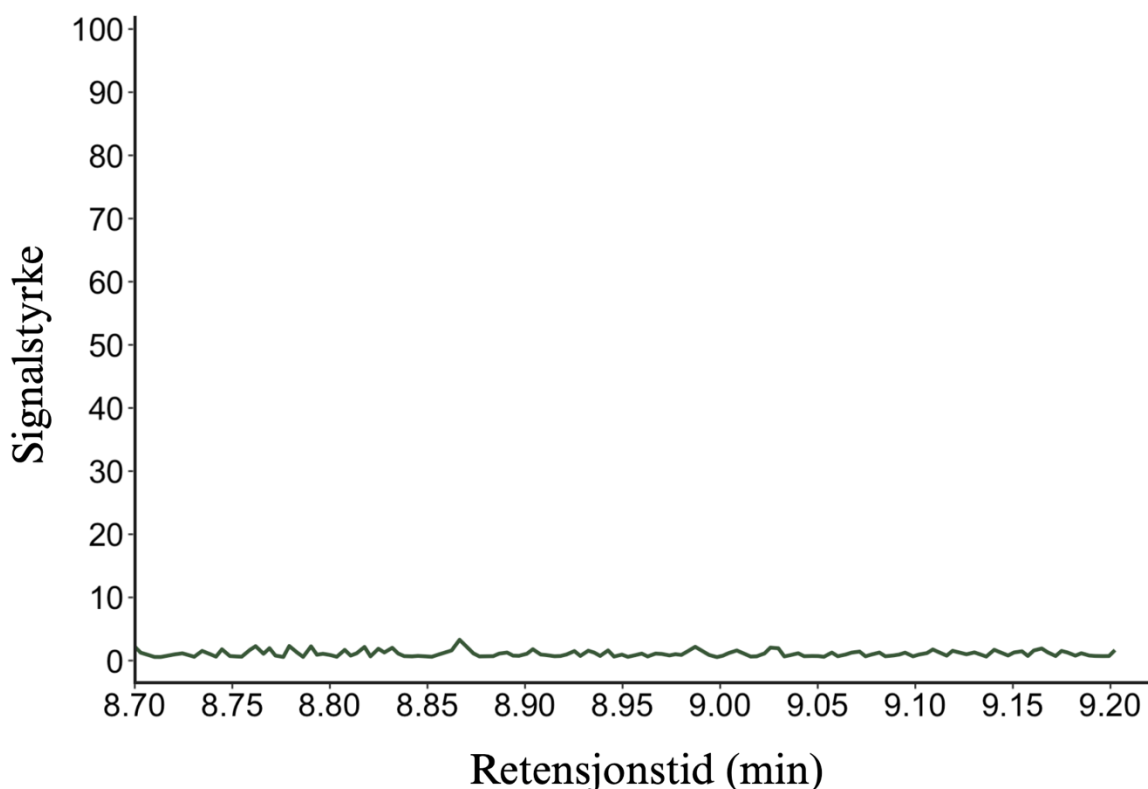
### 3.2 Butyrylkolinesterase nonapeptid detekteres ikke fra ikke-modifisert filterpapir

For å undersøke nødvendigheten for modifisering av filterpapir, eller om filterpapir kan binde fritt BuChE i serum tilstrekkelig i seg selv, ble filterpapir av grad 1 og CF12 påført serum (20  $\mu$ L). Deretter gjennomgikk filterpapirprøvene ( $n = 5$ ) rens- og ekstraksjonsprosedyre, herunder enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering som beskrevet i kapittel 2.2.5.

Prøvene ble analysert med LC-MS/MS som beskrevet i kapittel 2.2.6. Kromatogrammene viste ingen nevneverdig topp ( $S/N > 3$ ) ved  $R_t$ -BuChE ved kvantifiseringsovergangen ( $796,3\ m/z \rightarrow 691,3\ m/z$ ). Kromatogrammene til kvantifiseringsionet for BuChE nonapeptidet er presentert i figur 3.3 og figur 3.4.



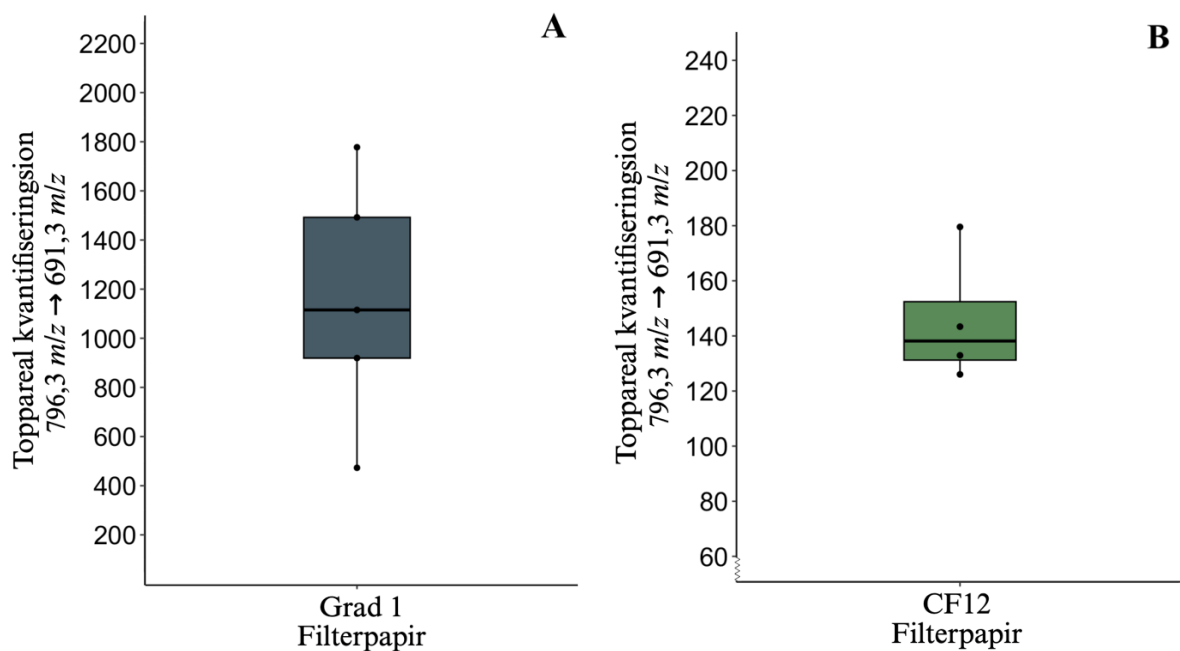
**Figur 3.3.** Kromatogram for ikke-modifisert filterpapir av type grad 1. Kromatogrammet utviser ikke signal med  $S/N > 3$  for bundet butyrylkolinesterase (BuChE) ved retensjonstid ( $8,98 \pm 0,02$  minutter) med MRM overgang  $796,3\ m/z \rightarrow 691,3\ m/z$ . Signalstyrken er gitt som en funksjon av retensjonstiden i minutter.



**Figur 3.4.** Kromatogram for ikke-modifisert filterpapir av type CF12. Kromatogrammet utviser ikke signal med  $S/N > 3$  for bundet butyrylkolinesterase (BuChE) ved retensjonstid ( $8,98 \pm 0,02$  minutter) med MRM overgang  $796,3\ m/z \rightarrow 691,3\ m/z$ . Signalstyrken er gitt som en funksjon av retensjonstiden i minutter.

### 3.3 Butyrylkolinesterase nonapeptid detekteres fra modifisert filterpapir

To ulike metoder for immobilisering av mAb på filterpapir ble undersøkt for å vurdere spesifikk bindingsevne til fritt BuChE i serum. Det ble tillaget fem replikater av grad 1 med immobilisert mAb ved hjelp av streptavidin-biotin, og fire replikater av CF12 med immobilisert mAb ved hjelp av DVS. Immobiliseringsmetodene er beskrevet i henholdsvis kapittel 2.2.2 og 2.2.3. Filtrepapirene ble applisert serum ( $20\ \mu\text{L}$ ) og etter tørking ble rens- og ekstraksjonsprosedyre, herunder enzymatisk hydrolyse og ultrafiltrering, utført som beskrevet i kapittel 2.2.5. Prøvene ble analysert med LC-MS/MS, som beskrevet i kapittel 2.2.6. Immobilisering med DVS hadde kun fire replikater på grunn av en feilinjeksjon under analyse med LC-MS/MS. Topparealene til kvantifiseringsionet for BuChE nonapeptidet er presentert i boksplott figur 3.5.



**Figur 3.5.** Boksplott hvor toppareal for kvantifiseringsion (MRM overgang 796,3  $m/z \rightarrow 691,3 m/z$ ) er angitt for henholdsvis filterpapir grad 1 (A) med fem replikater og filterpapir CF12 (B) med fire replikater.

Replikatene for grad 1 filterpapiret hadde et gjennomsnitt i toppareal på  $1155 \pm 506$ . Filterpapir CF12 hadde et gjennomsnitt i toppareal på  $145 \pm 24$ . Ved sammenligning av gjennomsnitt i toppareal observeres det at grad 1 filterpapiret binder BuChE 7,94 ganger mer enn CF12. Det relative standardavviket for grad 1 filterpapir ble beregnet til 44 %, mens det for CF12 ble beregnet til 16 %. Ved sammenligning av de relative standardavvikene observeres det at grad 1 er 2,68 ganger større enn CF12, hvilket betyr at det er nevneverdig ulikhet i spredning mellom replikatene for de to metodene (vedlegg F).

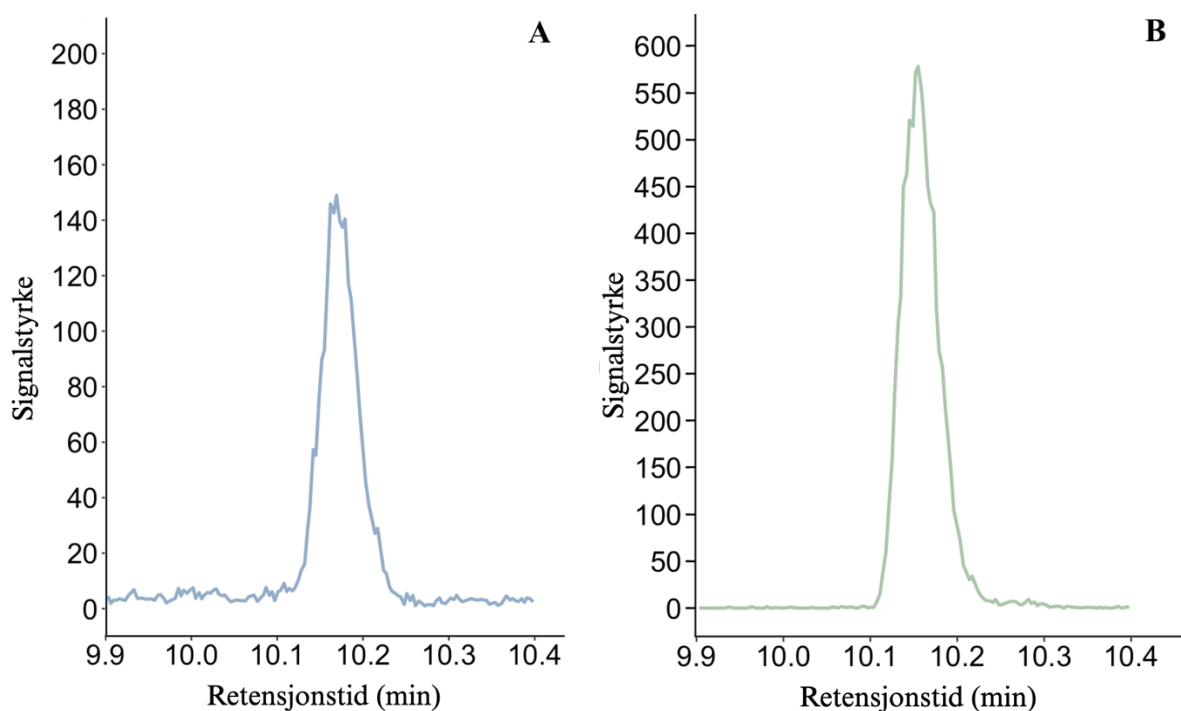
For å vurdere i hvilken grad den ulike bindingsevnen til filterpapirene var tilfeldig, ble det utført en uparet student  $t$ -test (vedlegg G). Nullhypotesen ble satt til at det ikke fantes noen signifikant forskjell mellom filterpapirene i evnen til å binde fritt BuChE i serum. Den beregnende  $p$ -verdien ble 0,0056, som er mindre enn den satte  $p$ -verdi grensen for signifikans ( $p > 0,05$ ). Dermed var det målt signifikant mer fritt BuChE nonapeptid i serum fra modifisert filterpapir av grad 1 enn fra CF12.

### 3.4 Deteksjon av organofosfat bundet butyrylkolinesterase nonapeptid og sammenligning av modifisert filterpapir mot DynaBeads™

For analyse av OP-BuChE, ble VX benyttet som eksponeringsagens på grunn av lav volatilitet og lang aldringstid (11, 25). Det ble benyttet MR med følgende overganger; 902,3  $m/z \rightarrow 673,3 m/z$  (OP-BuChE MRM 1) og 902,3  $m/z \rightarrow 778,3 m/z$  (OP-BuChE MRM 2) (65, 67). For å kunne sammenligne DynaBeads™ og filterpapirmetodene, ble likt volum eksponert serum brukt for alle metodene. BuChE i det eksponerte serumet var mettet med OPNA'et VX.

### 3.4.1 Organofosfat bundet butyrylkolinesterase nonapeptid detekteres fra modifisert filterpapir

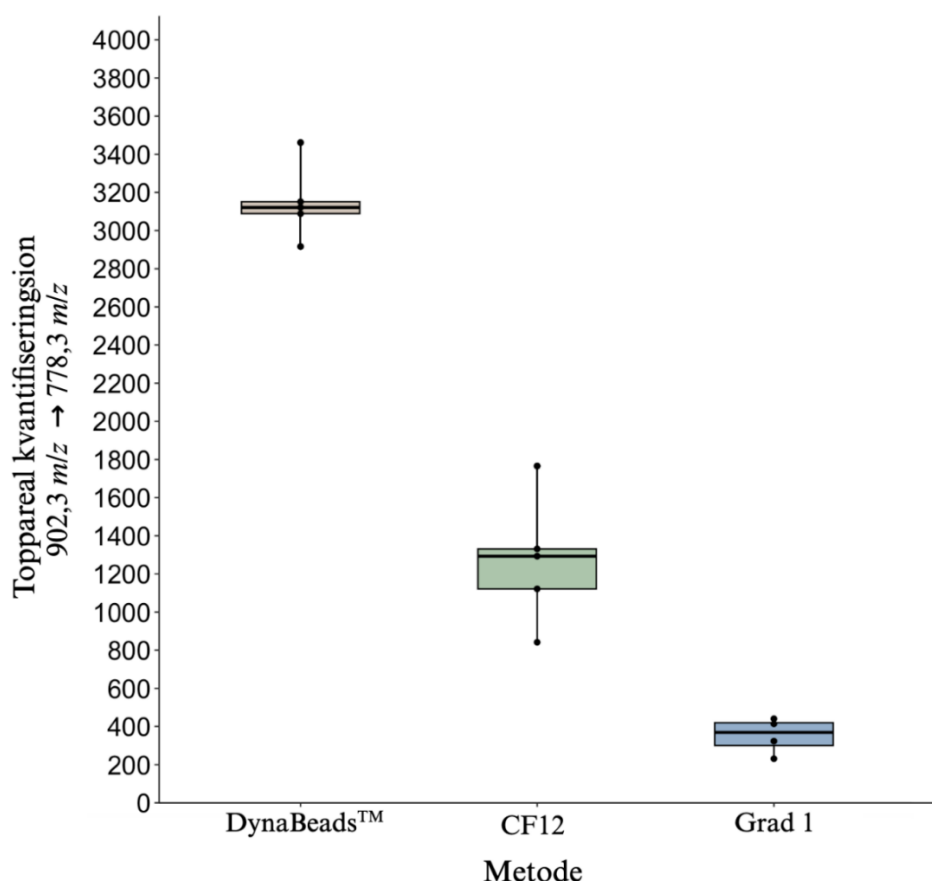
Da det var etablert at filterpapirene evnet å binde BuChE, ble deres evne til å binde OP-BuChE undersøkt. Det ble tillaget fem replikater for hver filterpapirmetode, totalt 10 prøver. Retensjonstiden ( $R_{tOP-BuChE}$ ) for OP-BuChE ble beregnet til  $10,17 \pm 0,03$  minutter på en Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid resolution HD kolonne (vedlegg F). Kvantifiseringsion for samtlige injeksjoner ble observert ved overgang OP-BuChE MRM 2 ( $902,3 \text{ m/z} \rightarrow 778,3 \text{ m/z}$ ). Kromatogram og boksplokk som presenteres er fra kvantifiseringsovergangen. Kromatogrammene for OP-BuChE nonapeptid for begge typer filterpapir er presentert i figur 3.6.



**Figur 3.6.** Kromatogram for modifiserte filterpapir av type grad 1 (A) og CF12 (B). Kromatogrammene utviser individuelle signal, begge med  $S/N > 3$  for BuChE nonapeptid med bundet nerve agens (VX) ved retensjonstid ( $10,17 \pm 0,03$  minutter) med MRM overgang  $902,3 \text{ m/z} \rightarrow 778,3 \text{ m/z}$ . Signalstyrken er gitt som en funksjon av retensjonstiden i minutter.

### 3.4.2 Sammenligning av filterpapirmetoder mot DynaBeads™ for deteksjon av organofosfat bundet butyrylkolineserese

For å vurdere filterpapirenes kapasitet for binding av OP-BuChE, ble de sammenlignet med DynaBeads™. Det ble opparbeidet fem replikater utsatt for eksponert serum med DynaBeads™ som beskrevet i kapittel 2.2.1. DynaBeads™ og filterpapirprøvene ble analysert med LC-MS/MS, metoden er beskrevet i kapittel 2.2.6. Topparealene for OP-BuChE nonapeptidet i prøvene fra DynaBeads™, filterpapir grad 1 og CF12 er presentert i figur 3.7.



**Figur 3.7.** Boksplott hvor toppareal for kvantifiseringsion (MRM overgang 902,3  $m/z \rightarrow 778,3 m/z$ ) er angitt for henholdsvis DynaBeads™, filterpapir grad 1 og filterpapir CF12, med fem replikater hver.

For replikatene til de tre metodene er beregnet gjennomsnittet til topparealene med tilhørende standardavvik og relativt standardavvik angitt i tabell 3.1 (vedlegg F).

**Tabell 3.1.** Gjennomsnitt til toppareal, standardavvik og relativt standardavvik for fem replikater i tre metoder, DynaBeads™, filterpapirmetode CF12 og filterpapirmetode grad 1 for deteksjon av OP-BuChE på LC-MS/MS med MRM overgang 902,3  $m/z \rightarrow 778,3 m/z$ .

	DynaBeads™	CF12	Grad 1
Gjennomsnitt toppareal kvantifiseringsion (902,3 $m/z \rightarrow 778,3 m/z$ )	3148	1271	311
Standardavvik	198	338	124
Relativt standardavvik (%)	6	27	40

Ved sammenligning av gjennomsnitt i toppareal observeres det at CF12 filterpapiret binder OP-BuChE 4,09 ganger mer enn grad 1. Det bemerkes at resultatene for OP-BuChE er motsatt for de observerte resultatene for fritt BuChE (punkt 3.3). Ved sammenligning av de relative standardavvikene observeres det at grad 1 filterpapir har 1,50 ganger større variasjon enn CF12, hvilket betyr at det er nevneverdig ulikhet i spredning mellom replikatene for de to metodene (vedlegg F). Større variasjon mellom replikatene ble observert for grad 1 filterpapir enn for fritt BuChE (punkt 3.3).

Ved sammenligning av filterpapirmetodene mot DynaBeads™, observeres det at DynaBeads™ binder OP-BuChE 2,48 ganger mer enn CF12, og 10,13 ganger mer enn grad 1 filterpapir (vedlegg F). Ved sammenligning av de relative standardavvikene observeres det henholdsvis at variasjonen for grad 1 filterpapir er 6,36 ganger større, og CF12 er 4,23 ganger større, enn DynaBeads™. Dette indikerer en betydelig ulikhet i spredning mellom replikatene for de to metodene sett opp mot DynaBeads™.

Det ble utført en ANOVA post hoc Tukey test for å undersøke om de observerte ulikhetene var av signifikans, og identifisere mellom hvilke metoder denne ulikheten lå. De beregnende *p*-verdiene er angitt i tabell 3.2.

**Tabell 3.2.** ANOVA post hoc Tukey test for tre ulike ekstraksjonsmetoder for organofosfat nerveagens (VX) bundet butyrylkolinesterase (OP-BuChE). De ulike metodene er modifiserte filterpapir av type grad 1 og CF12, og immunomagnetisk separasjon med DynaBeads™. De interne gruppene er angitt med nummer 1, 2 og 3, med tilhørende justert *p*-verdi.

Gruppe	Metode	Metode	Justert <i>p</i> -verdi
1	CF12	DynaBeads™	$8,3 \cdot 10^{-8}$
2	CF12	Grad 1	$9,3 \cdot 10^{-5}$
3	DynaBeads™	Grad 1	$8,3 \cdot 10^{-10}$

Det observeres at alle *p*-verdiene er mindre enn den satte *p*-verdi grensen for signifikans ( $p > 0,05$ ). De justerte *p*-verdiene fra tabell 3.2 understøtter at de presenterte verdiene i tabell 3.1 ikke skyldes tilfeldigheter, men metodespesifikke egenskaper. Dermed er det signifikant forskjell i mengden OP-BuChE nonapeptid som detekteres fra eksponerte serumprøver som opparbeides med DynaBeads™, modifisert grad 1 filterpapir eller modifisert CF12 filterpapir.



## 4. Diskusjon

Fra resultatene fremkommer det at filterpapir (grad 1 og CF12) i seg selv ikke binder enzymet BuChE slik at det kan detekteres, ved de analysebetingelsene som ble benyttet. Ved bruk av modifisert filterpapir, ble fritt BuChE fra serum detektert. BuChE nonapetid hadde signifikant høyere toppareal i grad 1-enn CF12-prøver, med en beregnet  $p$ -verdi ( $t$ -test) på 0,0056. Ved deteksjon av OP-BuChE fremkommer det i figur 3.7 at CF12 filterpapirprøver leder til et signifikant høyere toppareal enn grad 1, med en beregnet justert  $p$ -verdi (ANOVA Tukey) på 0,000093.

Den signifikante forskjellen observert mellom grad 1 og CF12 for fritt BuChE i serum, med tilhørende  $p$ -verdi på 0,0056 indikerer at den store differansen i gjennomsnittet til topparealene (signalstyrken) for BuChE nonapeptid, mest sannsynlig skyldes metodespesifikke egenskaper og ikke tilfeldigheter. Dette observeres også ved OP-BuChE ved tilhørende  $p$ -verdi på 0,000093, som indikerer at den store differansen i gjennomsnittet til topparealene, ikke er tilfeldig, men skyldes metodespesifikke egenskaper.

Det observeres et bytte i størst toppareal fra grad 1 til CF12 ved fritt BuChE mot OP-BuChE. Årsaken til dette kan ikke fastslås på grunn av oppgavens forsøksdesign. Det er for få replikater ( $n = 5$ ) per metode ( $n = 2$ ), per serie ( $n = 1$ ), samt for få serier per metode ( $n = 1$ ). Av den grunn forblir det ukjent om skiftet skyldes metodespesifikke egenskaper, tilfeldigheter eller kontaminasjon. Det vil i et videre arbeid være nødvendig å undersøke metodenes reproduserbarhet, for å fastslå om byttet er gjentakende. Ytterligere vil det være nødvendig å identifisere påvirkningen av den kjemiske konformasjonsendringer av BuChE ved binding av OPNA og dets potensielle innvirkning på binding til mAb på modifisert filterpapir.

I artiklene til de to benyttede metodene (Johannsen et al. og Mrsa et al.) ble det observert en gjenfinningsgrad av proteinet hCG i serum på 33% (streptavidin-biotin funksjonalisert på grad 1 filterpapir) og 50% (DVS funksjonalisert på CF12 filterpapir) i spikedte prøver (41, 42). I denne oppgaven er det ikke gjennomført spiking av serumprøver. Det er dermed ikke mulig å si noe om gjenfinningsgraden av BuChE, men det bør bestemmes i et videre arbeid.

For å vurdere sensitiviteten til instrumentet ser man på deteksjonsgrensen (LOD) til biomarkøren man måler på, som beregnes fra  $S/N$ . I metoden som benyttet forankring ved streptavidin-biotin (Johansen et al.) ble det konstruert en fire-punkts kalibreringskurve for biomarkør hCG over konsentrasjonsintervallet 200-1000 pg/mL ( $R^2 = 0,981$ ) (41). I metoden som benyttet forankring ved DVS (Mrsa et al.) ble det konstruert en fem-punkts kalibreringskurve for hCG over konsentrasjonsintervallet 2,5-50 ng/mL ( $R^2 = 0,9995$ ) (42). Forutsatt at  $S/N = 3$  for begge metoder ved LOD, er de oppgitte grenseverdiene henholdsvis 0,065 ng/mL og 2,5 ng/mL for streptavidin-biotin og DVS. Analysebetingelsene i begge metoder er tilnærmet lik, men det bemerkes en differanse i injeksjonsvolum (5  $\mu$ L (41), 10  $\mu$ L (42)). Dette indikerer at forankringsmetoden med streptavidin-biotin er betydelig mer sensitiv sammenlignet med forankring ved DVS for deteksjon av hCG, med en faktor på 38 (vedlegg F).

Ettersom LOD er et mål på instrumentets sensitivitet, er det avgjørende å beregne metodens deteksjonsgrense (MDL) da matrikskomponenter vil påvirke flere parametere i analysen som LOD ikke tar høyde for. LOD er av den grunn ikke et tilstrekkelig mål ved analyse av fullverdige prøver.

I denne oppgaven ble det ved analyse av BuChE-standard (1 ppb) beregnet  $S/N = 28,1$  (796,3  $m/z \rightarrow$  691,3  $m/z$ ) ved bruk av MassHunter Workstation Qualitative Analysis (v10.0). Ved ekstrapolering til  $S/N \approx 3$ , kan det antas at LOD for metoden vil være ved 0,11 ng/mL

(vedlegg F). Det vil i det videre arbeidet være nødvendig å identifisere MDL for begge metoder, slik at påvirkningen fra matrikskomponenter kan vurderes.

Da det fremkommer i artiklene (41, 42) at analysemetoden for streptavidin-biotin er vesentlig mer sensitiv, er det av interesse at denne funksjonaliseringsmetoden har en gjenfinningsgrad på 33%, men DVS har en gjenfinningsgrad på 50%. Ytterligere bemerkelsesverdig er det at mengden hCG applisert streptavidin-biotin filterpapirprøvene er 2,5 høyere enn for DVS (vedlegg F). På bakgrunn av dette, i kombinasjon med at analysemetodene var tilnærmet like, er det naturlig å anta en høyere absolutt binding av hCG i metoden som benytter streptavidin-biotin. Dette korrelerer med de observerte resultatene for fritt BuChE i serum (kapitel 3.3), hvor filterpapir grad 1 binder 7,9 ganger så mye BuChE sammenlignet med CF12 (vedlegg F).

Ett ytterligere mulig sammenligningsgrunnlag for de presenterte resultatene er å se på filterpapir relativt til DynaBeads™, da den anvendte metoden baserer seg på MDL. Ved å normalisere modifisert filterpapirresultater relativt til DynaBeads™, observeres det for OP-BuChE at grad 1 binder 9,9% og CF12 40,4% relativt til hva DynaBeads™ binder. For de relative standardavvikene, observeres det spredning á 6% for DynaBeads™, 40% for grad 1 og 27% for CF12 (Vedlegg F). Dette indikerer at de modifiserte filterpapirene er mindre effektive enn DynaBeads™ til å binde OP-BuChE fra samme volum serum. Den eksakte årsaken vites ikke, men da inkubasjonstiden ved applisering av serum for de ulike metodene er tilnærmet lik (90 – 120 minutter), er det sannsynlig at DynaBeads™ har bundet en større andel antistoff og klarer å feste mer OP-BuChE fra serum. Høyere grad av variasjon mellom DynaBeads™ og filterpapirene skyldes trolig at DynaBeads™ er en validert metode, i motsetning til modifisering av filterpapir som kan ha opparbeidingssteg som påvirker reproduserbarheten.

## 4.1 Videreutvikling av prøveoppbehandling og optimalisering av parametere

De fremlagte resultatene tilsier at de utprøvde metodene evner å binde OP-BuChE, men det gjenstår mye arbeid før det kan konkluderes med at metodene er praktisk anvendbare. I denne oppgaven er det benyttet serum som biologisk materiale, slik at det vites ikke om resultatene er overførbare for blod ved kapillarpunktering. Det vil være nødvendig å optimalisere metoden for blod. Dette kan gi utfordringer blant annet på grunn av erytrocyttene (røde blodceller), og den biologiske variansen i nivåer av hematokrit (HCT) og BuChE mellom ulike individer.

Blodets viskositet påvirkes av HCT nivået (34) og det vil videre ha en innvirkning på blodets spredning på filterpapiret. Blod med høyt nivå av HCT vil typisk ha redusert spredning, noe som kan resultere i ulik konsentrasjon av analytt i filterpapiret. Videre kan et høyt nivå av HCT medføre interferens under selve analysen. Derom det oppstår hemolyse av erytrocyttene vil de intracellulære komponentene som frigjøres gi en rekke interferenser. En kritisk interferens er påvirkning av ionisering i ESI-kilden, som videre er utslagsgivende for kvantifiseringen (68). Det er usikkert om et høyt HCT-nivå kan påvirke effektiviteten av ekstraksjonsprosessen av modifisert filterpapir. Ytterligere varierer konsentrasjonen av BuChE i blod mellom individer (2-5 mg/L) (26, 27). Det vil dermed i det videre arbeidet være nødvendig å utvikle en metode som tar hensyn til blant annet varierende HCT- og BuChE nivåer i populasjonen (69). Metoden må tilpasses slik at disse faktorene ikke innvirker på reproduserbarheten og nøyaktigheten til analysen.

Andre faktorer som kan påvirke metodenes reproduserbarhet er antall opparbeidelsestrinn. Det kan være av interesse å undersøke betingelser som inkubasjonstid, temperatur, oksidasjonsgrad, pH, konsentrasjonsforhold og vaskeløsninger for å vurdere deres utslag ved eventuelle justeringer for begge metoder.

Ved funksjonalisering av filterpapiret med DVS ble det observert gule flekker på papiret. Dette indikerer polymerisering av DVS. Det er usikkert hvordan en eventuell polymerisering påvirker overflateinteraksjonen på filterpapiret, og videre analyseresultatet. For metoden som benytter streptavidin-biotin, er den kovalente bindingen av streptavidin til filterpapiret essensiell for immobiliseringen av biotinylert mAb. Det vil av den grunn være viktig å kartlegge for begge metoder når fullstendig funksjonalisering av filterpapirene oppnås, samt optimal inkubasjonstid.

I det praktiske laboratoriearbeidet ble det observert at filterpapir av type grad 1 var lett mottakelig for rifter under prøveopparbeiding til tross for skånsom behandling. Denne problematikken ble ikke observert ved håndtering av filterpapir CF12. Filterpapirene har en tykkelse på henholdsvis 180  $\mu\text{m}$  og 508  $\mu\text{m}$ , hvilket betyr at CF12 filterpapiret er nesten tre ganger så tykt som grad 1 (35). Det er usikkert hvorvidt rifter påvirker modifikasjonen av filterpapiret.

Tidligere arbeid har sammenlignet grad 1 og CF12 filterpapir med DVS-forankring av mAb, og konkludert med at CF12 filterpapiret har en høyere evne til å binde mAb grunnet dets tykkelse, som tillater at det kan absorbere et større volum (35). På dette grunnlaget ville det vært interessant å undersøke om forankringsmetoden med streptavidin-biotin på filterpapir CF12 er utslagsgivende mot grad 1 og i hvilket omfang.

For å kunne optimalisere modifisert filterpapir som metode vil det være nødvendig å undersøke i hvor stor grad forankringsmetodene for antistoff binder til andre filterpapir. Det vil være spesielt interessant å modifisere Whatman 903<sup>TM</sup> protein saver card og PerkinElmer 226 filter paper, da disse er de standardiserte filterpapirene som er godkjent til bruk ved DBS-screening i dag (34). En tilnærming for å kartlegge forankringen av mAb på tvers av ulike modifiserte filterpapir, vil være å måle mengden mAb. Dette kan gjøres ved enzymatisk hydrolyse av forankret mAb, etterfulgt av analyse av tilhørende biomarkører. Dette gjør det mulig å identifisere filterpapiret som binder mest mAb og dermed er det optimale for de ulike metodene.

Det er nødvendig å identifisere stabilitet for de modifiserte filterpapirene ved lagring og bruk. Det vites svært lite om stabiliteten til de organiske kompleksene som funksjonaliserer filterpapirene. Det vil av den grunn være nødvendig å kartlegge innvirkningen av ytre parametere, eksempelvis temperatur og luftfuktighet, over tid. En fordel med metoden som utnytter bindingsspesifisiteten til streptavidin-biotin, er muligheten til å funksjonalisere papiret med kun streptavidin før prøveapplisering. Antistoff har en lav lagringsstabilitet ved romlig temperatur og det forventes at dette vil utgjøre en svakhet i levetiden til modifisert filterpapir med applisert mAb (70). Streptavidin er et lite protein, og det antas bedre lagringsstabilitet sammenlignet med mAb. Et modifisert filterpapir med streptavidin, applisert blod, vil kunne reløses i en løsning inneholdende biotinylert mAb. Forankringen av mAb og binding av BuChE vil dermed kunne gjøres etter at prøven ankommer laboratoriet og man er mindre utsatt for degradering av antistoffet. I det videre arbeidet er det viktig å undersøke eventuelle justeringer av filterpapiromodifikasjon som kan foretas for økt stabilitet, men som samtidig beholder metodens enkelhet og spesifisitet.

Analyse av prøvene ble utført på et nyoppført LC-MS/MS system. Prøvene som ble analysert var blant de første på systemet, dette i seg selv er suboptimalt, da det ikke foreligger noen referanseprøver som kan være styrende for hvorvidt analysebetingelsene er korrekt innstilt, eller at instrumentet hadde maksimal ytelse.

Da det gjelder analysebetingelsene, kan en rekke justeringer undersøkes for ytterligere økt sensitivitet. Et naturlig utgangspunkt er å sørge for at analytten blir tilstrekkelig separert fra matriksen. For å oppnå dette må matrikskomponentene i filtratet etter ultrafiltrering

identifiseres, slik at eventuelle analytter som gir ionesuppresjon avdekkes. Dermed vil det være nyttig å undersøke ulike valg av kolonner, kolonnedimensjoner, mobilfasesammensetning og andre separasjonsbetingelser da en tilstrekkelig opprensning vil kunne gi interferenseffekter i elektrospøyen. De valgte ESI-parameterne er optimaliserte for metoden slik den er idag, ved eventuell endring i kromatografien, kan det være nødvendig å re-optimalisere parameterne. De viktigste er gasstemperatur, gasstrøm og kapillærspenning da disse har stor effekt på ioneproduksjonen.

De valgte MRM-overgangene baserer seg på publisert litteratur (65, 67). I et videre arbeid vil det være av interesse å undersøke om innstillinger i ionekilden og analysebetingelsene for MRM-overgangene kan forbedres for optimal ioneproduksjon og ionegjennomgang, slik at høyest mulig signal oppnås. Spesifikt for optimalisering av betingelser for MRM-overgangene i en QqQ fra Agilent kan programmet Optimizer forsøkes.

## 5. Konklusjon

Forsøkene har vist at det er mulig å immobilisere antistoff på filterpapir av grad 1 ved å benytte forankring ved streptavidin-biotin, og til filterpapir CF12 ved å benytte forankring med DVS. På bakgrunn av  $S/N = 28,1$  for BuChE standard ved 1 ppb, kan det konkluderes med at sensitiviteten var tilstrekkelig.

Ved applisering av serum til begge typer modifisert filterpapir, ble det etter analyse på LC-MS/MS detektert signal ( $S/N > 3$ ), hvilket betyr at begge typer modifisert filterpapir evner å binde fritt BuChE i serum. Resultatene antyder at metoden som anvender filterpapir grad 1 evner å binde mer fritt BuChE, sammenlignet med metoden som anvender CF12. Grunnet forsøkets design og skala, er det ikke belegg for å konkludere med at det er en bedre metode for gitt formål.

Ved applisering av VX-eksponert serum ble det registrert signal for begge typer filterpapir, hvilket betyr at begge filterpapir evner å binde OP-BuChE. I motsetning til de observerte resultatene for fritt BuChE i serum, ga CF12 filterpapir høyere signal for binding av OP-BuChE. Ved sammenligning av ytelsen til modifisert filterpapir relativt opp mot DynaBeads™, konkluderes det med at filterpapirmetodene ikke evner å binde like mye OP-BuChE slik metodene er i dag.

Begge forankringsmetodene utviser stort potensiale, og det burde av den grunn utforskes i større grad. Videre arbeid bør vektlegge evalueringen av ulike forankringsmetoders stabilitet på tvers av filterpapir, samt en påfølgende vurdering av reproduserbarheten til den valgte metoden.

# Litteraturliste

1. Frischknecht F. The history of biological warfare. EMBO reports. 2003;4(S1):S47-S52-S.
2. Tucker J. War of Nerves: Chemical Warfare from World War I to Al-Qaeda: Knopf Doubleday Publishing Group; 2007. s. 11-12, 24-41, 143-157.
3. Kaszeta D. Toxic - A History of Nerve Agents, From Nazi Germany to Putin's Russia: C Hurst & Co Publishers Ltd; 2020. 408 s, s. 1-6.
4. Valdez CA, Leif RN. Analysis of Organophosphorus-Based Nerve Agent Degradation Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS): Current Derivatization Reactions in the Analytical Chemist's Toolbox. Molecules [Internett]. 2021; 26(15).
5. Suleiman AH. 'Foaming at the mouth': 10 years since chemical attacks in Syria's Ghouta. Aljazeera. 21. Aug 2023.
6. Human Rights Watch. Attacks on Ghouta - Analysis of alleged use of chemical weapons in Syria [internett]. Human Rights Watch; 2013 [hentet 21.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.hrw.org/report/2013/09/10/attacks-ghouta/analysis-alleged-use-chemical-weapons-syria>.
7. Knispel S. Why did Russian opposition leader Alexei Navalny have to die? [internett]. News Center: University of Rochester; [oppdatert 19.02.2024; hentet 22.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.rochester.edu/newscenter/alexei-navalny-russian-soviet-opposition-movements-putin-593362/>.
8. OPCW. Article I - General obligations [internett]. [hentet 16.04.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/articles/article-i>.
9. OPCW. Annex on Chemicals [internett]. [hentet 20.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/annex-chemicals>.
10. Ganesan K, Raza SK, Vijayaraghavan R. Chemical warfare agents. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2010;2(3).
11. Pohanish RP. V. I: Pohanish RP, red. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens (Seventh Edition): William Andrew Publishing; 2017. s. 3232-3272.
12. Pohanish RP. S. I: Pohanish RP, red. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens (Seventh Edition): William Andrew Publishing; 2017. s. 2827-3011.
13. Institute of Medicine (US) Forum on Drug Discovery, Development, and Translation. Emerging Safety Science: Workshop Summary. Chapter 7. Qualifying Biomarkers: National Academies Press (US); 2008. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4041/>.
14. Rønning PO. Prøvetaking og prøveopparbeiding. Canvas KJVE3510 Analytisk Kjemi II: OsloMet; 2021. s. 29-34
15. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. PLoS One. 2011;6(2):e16957.
16. Milani DAQ, Ishwarla J. Urinalysis [internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [hentet 20.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557685/>.
17. Lin Y, Chen J, Yan L, Guo L, Wu B, Li C, et al. Determination of nerve agent metabolites in human urine by isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase supported derivatization. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014;406(21):5213-20.

18. Lockridge O, Quinn DM, Radić Z. Esterases. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2023.
19. Kapalka GM. Chapter 4 - Substances Involved in Neurotransmission. I: Kapalka GM, red. Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents. San Diego: Academic Press; 2010. s. 71-99.
20. Wexler P. Encyclopedia of Toxicology, volume 3: Academic Press; 1998. s. 41-42, volume 6: Academic Press; 1998. s 712.
21. Allgardsson A, Berg L, Akfur C, Hörnberg A, Worek F, Linusson A, et al. Structure of a prereaction complex between the nerve agent sarin, its biological target acetylcholinesterase, and the antidote HI-6. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(20):5514-9.
22. Lockridge O. Chapter Five - Noncholinesterase Protein Targets of Organophosphorus Pesticides. I: Fishbein JC, Heilman JM, red. Advances in Molecular Toxicology. 7: Elsevier; 2013. s. 179-205.
23. Park S-J, Kim D-H, Yoo J, Hwang EY, Shin M-S, Lee N-T, et al. Detection of organophosphate bound butyrylcholinesterase using a monoclonal antibody. Applied Biological Chemistry. 2017;60(3):233-40.
24. Noort D, Fidder A, van der Riet-van Oeveren D, Busker R, van der Schans MJ. Verification of Exposure to Novichok Nerve Agents Utilizing a Semitargeted Human Butyrylcholinesterase Nonapeptide Assay. Chemical Research in Toxicology. 2021;34(8):1926-32.
25. Wiercinski A, Jackson JP. Nerve Agents [internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [hentet 21.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493158/>.
26. Jońca J, Żuk M, Wasąg B, Janaszak-Jasiecka A, Lewandowski K, Wielgomas B, et al. New Insights into Butyrylcholinesterase Activity Assay: Serum Dilution Factor as a Crucial Parameter. PLoS One. 2015;10(10):e0139480.
27. Holland KE, Solano MI, Johnson RC, Maggio VL, Barr JR. Modifications to the Organophosphorus Nerve Agent-Protein Adduct Refluoridation Method for Retrospective Analysis of Nerve Agent Exposures. Journal of Analytical Toxicology. 2008;32(1):116-24.
28. Zeng X, Bai G, Sun C, Ma B. Recent Progress in Antibody Epitope Prediction. Antibodies [Internett]. 2023; 12(3).
29. Levernæs MCS, Farhat B, Oulie I, Abdullah SS, Paus E, Reubsaet L, et al. Immunocapture sample clean-up in determination of low abundant protein biomarkers – a feasibility study of peptide capture by anti-protein antibodies. RSC Advances. 2019;9(60):34902-11.
30. Belul N. Use of Immunocapture Techniques to Enable Efficient Sample Preparation for LC-MS/MS Analysis of Oxytocin in Human Plasma [masteroppgave]. Lund, SE: Lund Universitet; 2015. s 10-17.
31. Thermo Fisher Scientific. Dynabeads and Immunoprecipitation: Your Questions Answered [internett]. Oslo, NO: Thermo Fisher Scientific Inc; [oppdatert 09.05.2022; hentet 04.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/blog/life-in-the-lab/dynabeads-and-immunoprecipitation-your-questions-answered/>.
32. Thermo Fisher Scientific. Dynabeads Magnetic Beads [internett]. Oslo, NO: Thermo Fisher Scientific Inc; [hentet 20.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/product-brand/dynal.html>.
33. Osteresch B, Viegas S, Cramer B, Humpf H-U. Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots and dried serum spots. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2017;409(13):3369-82.

34. Skogvold HB, Rootwelt H, Reubsaet L, Elgstøen KBP, Wilson SR. Dried blood spot analysis with liquid chromatography and mass spectrometry: Trends in clinical chemistry. *Journal of Separation Science*. 2023;46(15):2300210.
35. Ishaq R. Metodeoptimalisering og evaluering av papirbasert immunoekstraksjon av proteiner i biologiske prøver [masteroppgave]. Oslo, NO: Universitetet i Oslo; 2023.
36. Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots-preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *J Vis Exp*. 2015(97).
37. Ackermans MT, de Kleijne V, Martens F, Heijboer AC. Hematocrit and standardization in DBS analysis: A practical approach for hormones mainly present in the plasma fraction. *Clinica Chimica Acta*. 2021;520:179-85.
38. Oslo Universitetssykehus. Nyfødtscreening [oppdatert 03.11.2023; hentet 04.05.2024 ]. . Tilgjengelig fra: <https://www.oslo-universitetssykehus.no/avdelinger/barne-og-ungdomsklinikken/nyfodtscreeningen/nyfodtscreening/>.
39. Freeman JD, Rosman LM, Ratcliff JD, Strickland PT, Graham DR, Silbergeld EK. State of the Science in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry*. 2018;64(4):656-79.
40. de Bruin-Hoegée M, Fidler A, van Groningen T, van der Schans MJ, Noort D, van Asten AC. On-site detection and laboratory verification of the presence of nerve agent biomarkers using dried blood spots. *Forensic Chemistry*. 2023;35:100526.
41. Johannsen C, haq Au, Reubsaet L, Halvorsen TG. On the spot immunocapture in targeted biomarker analysis using paper-bound streptavidin as anchor for biotinylated antibodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(19):5979-89.
42. Mrsa A, Nardini G, Halvorsen TG, Thiede B, Reubsaet L. One-step functionalization of paper and simplifies antibody immobilization for on-the-spot immunocapture from dried serum in liquid chromatography-tandem mass spectrometry based targeted protein determination. *Journal of Mass Spectrometry*. 2024;59(1).
43. Hansen SH, Pedersen-Bjergaard S. *Bioanalysis of pharmaceuticals : sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry*. West Sussex, England: Wiley; 2015. s. 242.
44. Matheus P, Vinícios P, Ademir JZ. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. I: Theo van de V, Louis G, red. *Cellulose*. Rijeka: IntechOpen; 2013. s. Ch. 2.
45. Kong F, Hu YF. Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(1):7-13.
46. Jarujamrus P, Tian J, Li X, Siripinyanond A, Shiowatana J, Shen W. Mechanisms of red blood cells agglutination in antibody-treated paper. *Analyst*. 2012;137(9):2205-10.
47. Yu A, Shang J, Cheng F, Paik BA, Kaplan JM, Andrade RB, et al. Biofunctional Paper via the Covalent Modification of Cellulose. *Langmuir*. 2012;28(30):11265-73.
48. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(21):9343-53.
49. Thermo Fisher Scientific. Avidin-Biotin Interaction [internett]. Oslo, NO: Thermo Fisher Scientific Inc; [hentet 04.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html>.
50. Bults P, Spanov B, Olaleye O, van de Merbel NC, Bischoff R. Intact protein bioanalysis by liquid chromatography – High-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2019;1110-1111:155-67.



51. Witkiewicz Z, Neffe S. Chromatographic analysis of chemical warfare agents and their metabolites in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020;130:115960.
52. Harris DC. Quantitative chemical analysis. Tenth edition. utg. Lucy CA, Harris DC, red. New York, NY: Macmillan International Higher Education; 2020. s. 462-463, 707-711.
53. Rønning PO. Innføring i massespektrometri. Canvas KJVE3510 Analytisk Kjemi II: OsloMet; 2021. s. 20-26.
54. Gross JH. Mass Spectrometry 3utg. Heidelberg, DE: Springer International Publishing AG; 2017. 968 s, s.745.
55. Shimadzu. Why Does MS Require High Vacuum? [internett]. [hentet 12.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/gcms/fundamentals/vacuum/ms\\_require\\_high\\_vacuum.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/gcms/fundamentals/vacuum/ms_require_high_vacuum.html).
56. de Hoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry - Principles and applications. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd; 2007. 489 s.
57. Gleave M. The Strengths of Mass Spectrometry are Not Just Sensitivity and Selectivity. *Bioanalysis*. 2011;3(3):245-7.
58. Halvorsen TG, Reubsaet L. Determination of Very Low Abundance Diagnostic Proteins in Serum Using Immunocapture LC-MS/MS. *LCGC Supplements*. 2017;15(3):16-22.
59. van der Schans MJ, Fidder A, van Oeveren D, Hulst AG, Noort D. Verification of exposure to cholinesterase inhibitors: generic detection of OPCW Schedule 1 nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase. *J Anal Toxicol*. 2008;32(1):125-30.
60. Mirbabaei F, Mohammad-Khah A, Naseri MT, Babri M, Faraz SM, Hosseini SE, et al. Unambiguous identification and determination of A234-Novichok nerve agent biomarkers in biological fluids using GC–MS/MS and LC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(11):3429-42.
61. Helbæk M. Statistikk for kjemikere. Godejord PA, red. Trondheim: Tapir; 2001. 296 s, s. 76-114.
62. Frost J. Using Post Hoc Tests with ANOVA [internett]. Statistics by Jim [hentet 14.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://statisticsbyjim.com/anova/post-hoc-tests-anova/>.
63. The t-Test [internett]. jmp statistical discovery; [hentet 22.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: [https://www.jmp.com/en\\_ca/statistics-knowledge-portal/t-test.html](https://www.jmp.com/en_ca/statistics-knowledge-portal/t-test.html).
64. ANOVA (Analysis of Variance) [internett]. statisticssolutions [hentet 22.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/anova/>.
65. Pantazides BG, Watson CM, Carter MD, Crow BS, Perez JW, Blake TA, et al. An enhanced butyrylcholinesterase method to measure organophosphorus nerve agent exposure in humans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014;406(21):5187-94.
66. T test calculator [internett]. GraphPad; [hentet 14.05.2024 ]. Tilgjengelig fra: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>.
67. Graham LA, Johnson D, Carter MD, Stout EG, Erol HA, Isenberg SL, et al. A high-throughput UHPLC–MS/MS method for the quantification of five aged butyrylcholinesterase biomarkers from human exposure to organophosphorus nerve agents. *Biomedical Chromatography*. 2017;31(4):e3830.
68. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(17):4879-92.
69. Brown TJ, Hammers M, Taylor M, Dugdale HL, Komdeur J, Richardson DS. Hematocrit, age, and survival in a wild vertebrate population. *Ecol Evol*. 2021;11(1):214-26.

70. Thermo Fisher Scientific. Antibody Support - Getting Started [internett]. Oslo, NO: Thermo Fisher Scientific Inc; [ 22.05.2024]. Tilgjengelig fra:  
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/technical-resources/technical-reference-library/antibodies-immunoassays-support-center/antibodies-support/antibodies-support-getting-started.html>.

## Vedlegg

### Vedlegg A. Beskrivelse av tillaging av løsninger

Vedlegget inneholder beskrivelse for tillaging av løsninger benyttet i metoder angitt i kapittel 2.2. Alle volumoverføringer er utført med pipetter, og alle innveieringer ble utført på analysevekt.

#### A.1. Generelle løsninger

##### **PBS [1X]**

PBS [1X] ble tillaget fra en stamløsning [10X]. Dette ble utført flere ganger og i variable volum.

##### **PBST [1X PBS med 0,05% Tween]**

PBST [1X] ble tillaget fra en stamløsning [20X]. Dette ble utført flere ganger og i variable volum.

##### **ABC løsning (w/v) [50 mM]**

ABC [50mM] ble tillaget ved å veie inn 0,0982g Ammonium hydrogen karbonat, overført til en 25 mL målekolbe og fortynnet til merket med MilliQ-vann.

##### **HCl [1M]**

HCl-løsning [1M] ble tillaget ved å overføre 0,53 mL HCl [9,45M] og 4,47 mL MilliQ-vann til en falcon tube.

#### A.2 Løsninger tilhørende DynaBeads™ kapittel 2.2.1

##### **TBS [1X] (v/v)**

1 mL TBS [1X] ble tillaget ved å overføre 100 µL Tris buffered saline [10X] og 900 µL MilliQ-vann til ett eppendorfrør.

##### **DMP i TEA stamløsning [5,4 mg/mL] (w/v)**

500 µL DMP i TEA [5,4 mg/mL] ble tillaget ved å veie ut 2,7 mg dimetyl pimelimidate dihydrogenklorid (DMP), overført til ett eppendorfrør, og løst i 500 µL trietanolamin bufferløsning [0,2 M]. Løsningen må lages dagsfersk.

##### **Fortynnet DMP i TEA [0,54 mg/mL] (v/v)**

1 mL fortynnet DMP i TEA [0,54 mg/mL] ble tillaget ved å overføre 100 µL DMP i TEA [5,4 mg/mL] til ett eppendorfrør, og løst i 900 µL trietanolamin bufferløsning [0,2 M],

##### **Fortynnet antistoffløsning [50 µg/mL] i PBS (v/v)**

4 mL fortynnet antistoffløsning [50 µg/mL] ble tillaget ved å overføre 3,8 mL PBS [1X] og 200 µL monoklonalt antistoff [1000µg/mL] til en falcon tube.

### **Fortynnet serum i PBS [1X]**

Fortynnet serum ble tillaget ved å blande 180 µL PBS [1X] og 20 µL serum i ett eppendorfrør.

### **A.3 Løsninger tilhørende filterpapir grad 1 med streptavidin-biotin anker kapittel 2.2.2**

#### **Kaliumperjodat [0,018 M] (w/v)**

KIO<sub>4</sub> [0,018 M] ble tillaget ved å veie ut 0,2030 g Kaliumperjodat, overført til en 50 mL målekolbe og fortynnet til merket med MilliQ-vann.

#### **HCl [1mM]**

HCl [1mM] ble tillaget ved å overføre 10 µL HCl [1M] og 9,99 mL MilliQ-vann til en falcon tube.

#### **Streptavidin i HCl løsning [2% SA i 1 mM HCl] (w/v)**

Streptavidin i HCl [2% SA i 1mM HCl] ble tillaget ved å tilsette 250 µL HCl [1mM] til beholder inneholdende 5 mg Streptavidin.

#### **Biotinylert antistoffløsning [500 µg/mL] (w/v) i PBS**

Antistoff ble biotinylert i henhold til prosedyren fra ThermoFisher Scientific *Pierce Biotin Quantitation kit* (vedlegg B) ble utført på FFI av veileder Ingvild C. Hvinden

#### **Fortynnet antistoffløsning [2,3 µg/mL] (v/v) i PBS [1X]**

Fortynnet antistoffløsning [2,3 µg/mL] ble tillaget ved å overføre 11,5 µL biotinylert antistoff [500 µg/mL] og 2488,5 µL PBS [1X] til en falcon tube.

#### **BSA-PBS løsning [0,05% BSA i 1X PBS] (v/v)**

BSA-PBS [0,05% BSA i 1X PBS] ble tillaget ved å veie ut 0,0126 g Albumin from human serum, overført til en falcon tube og tilsatt 25,2 mL Phosphate buffered saline [1X].

### **A.4 Løsninger tilhørende filterpapir CF12 med divinylsulfonanker kapittel 2.2.3**

#### **Natriumkarbonat (w/v) [0,1 M], pH = 11,32**

Natriumkarbonat [0,1 M] ble tillaget ved å veie ut 1,0600g natriumkarbonat, overført til en 100 mL målekolbe og fortynnet til merket med MilliQ-vann. pH ble målt på SensION+ til 11,32.

#### **Divinylsulfon løsning (v/v) – 10% DVS i 0,1 M natriumkarbonat**

3 mL 10% divinylsulfon (DVS) løsning ble laget ved å overføre 0,3 mL DVS og 2,7 mL natriumkarbonat [0,1 M] til en 3 mL glassvial.

#### **HCl [1,05 mM]**

10 mL HCl [1,05 mM] ble tillaget ved å overføre 10,5 µL HCl [1M] og 9,9895 mL MilliQ-vann til en falcon tube.

### **Fortynnet antistoffløsning [50 µg/mL] i HCl [1 mM] (v/v)**

1100 µL fortynnet antistoffløsning [50 µg/mL] i HCl [1 mM] ble tillaget ved å overføre 55 µL antistoffløsning [1000 µg/mL] og 1045 µL HCl [1,05 mM] til ett eppendorfrør.

### **NaOH [1 M] til justering av Tris-HCl**

NaOH [1 M] ble tillaget ved å veie ut en pellet natriumhydroksid. Basert på pelletvekt ble volum MilliQ-vann beregnet i henhold til likning 1 for sluttkonsentrasjon 1M.

$$Volum\ MilliQ\ (L) = \frac{pellet\ (g)}{1.0M \times 39,996 \frac{g}{mol}} \quad \text{Likning 1}$$

### **Tris-HCl buffer [10 mM] pH justert til 7,4**

10 mL Tris-HCl [10 mM] ble tillaget ved å overføre 1 mL Tris-HCl [1 M] til 9 mL MilliQ-vann i en falcon tube. pH ble målt til 8 og justert ned til 7,4 på SensION+, med dråpevis tilsetning av HCl [1 M].

### **Tris-HCl buffer [50 mM] pH justert til 9,0**

10 mL Tris-HCl [50 mM] ble tillaget ved å overføre 0,5 mL Tris-HCl [1 M] til 9,5 mL MilliQ-vann i en falcon tube.

pH ble målt til 8 og justert opp til 9 på SensION+, med dråpevis tilsetning av NaOH [1 M].

## **A.5 Løsninger til enzymatisk hydrolyse av prøver kapittel 2.2.5**

### **Maursyreløsning [5% maursyre i vann] (v/v)**

2 mL maursyreløsning [5%] ble tillaget ved å overføre 100 µL maursyre og 1900 µL MilliQ-vann til en 3 mL glassvial.

### **Pepsin stamløsning (2 mg/ml) i 5 % maursyreløsning (w/v)**

Denne løsningen ble laget flere ganger. Det var tilgjengelig alikvoter av pepsin i ulik vekt. For å lage en pepsin stamløsning [2 mg/ml] ble pepsinalikvotens vekt delt på ønsket konsentrasjon, for å finne volum av maursyreløsningen [5%] som måtte overføres til alikvoten, i henhold til likning 2.

$$\frac{pepsinalikvot\ (mg)}{2,0 \frac{mg}{mL}} = volum\ 5\% \text{ maursyreløsning}\ (mL) \quad \text{Likning 2}$$

### **Fortynnet Pepsinløsning [250 µg/mL i 0,625 % maursyre] i vann (v/v)**

Denne løsningen ble laget flere ganger, i variable volum. Eksempelberegning følger;

For å lage 1 mL fortynnet pepsin stamløsning [250 µg/mL], ble 125 µL pepsin stamløsning [2 mg/mL] og 875 µL MilliQ-vann overført til ett eppendorfrør.

### **A.6 Løsninger for væskekromatografi kapittel 2.2.6**

Løsninger for HPLC systemet ble tillaget av veileder Ingvild C. Hvinden.

Mobilfase A bestod av 0,1% maursyre i MilliQ Vann. Mobilfase B bestod av 0,1% maursyre i acetonitril. Seal wash bestod av 90% MilliQ vann og 10% isopropanol. Nålevask bestod av 70% metanol og 30% MilliQ vann.

## Vedlegg B. Protokoll for biotinylering av antistoff

Understående protokoll ble benyttet for biotinylering av antistoff, som ble anvendt i metode angitt i kapittel 2.2.2. Biotinyleringen ble utført av veileder Ingvild C. Hvinden på FFI.

### INSTRUCTIONS

**Thermo**  
SCIENTIFIC

## Pierce Antibody Biotinylation Kit for IP

Pub. No. MAN0016152  
Pub. Part No. 2162590.1  
Rev. A.0

90407

### Number

90407

### Description

**Pierce Antibody Biotinylation Kit for IP**, sufficient reagents for 8 labeling reactions, each containing 50-200µg of antibody in 100µL reaction volumes

#### Kit Contents:

**EZ-Link NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin, No-Weigh Format**, 8 × 0.5mg microtubes

Molecular Weight: 588.67

Spacer Arm: 29Å

**20X Phosphate Buffered Saline**, 15mL

**Zeba Spin Desalting Column (7K MWCO), 0.5mL**, 8 columns, for 30-130µL samples

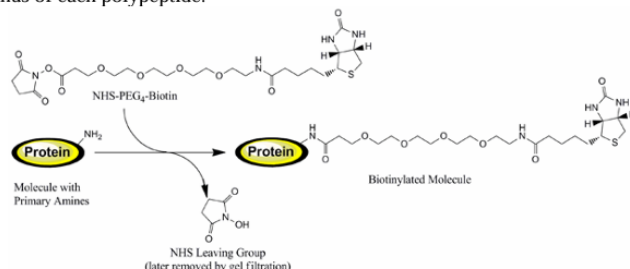
**Storage:** Upon receipt store at 4°C. Product is shipped with an ice pack.

### Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ Antibody Biotinylation Kit for IP provides optimized reagents for labeling antibodies and desalting columns for purifying the labeled molecule. Each reaction is sufficient for labeling 50-200µg of antibody in 100µL reaction volumes. The hydrophilic polyethylene oxide (PEO), also called polyethylene glycol (PEG), spacer arm imparts water solubility that is transferred to the biotinylated molecule. Consequently, antibodies labeled with NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin exhibit less aggregation when stored in solution compared to antibodies labeled with reagents having only hydrocarbon spacers. This kit is specifically optimized to label antibodies for downstream immunoprecipitation (IP) applications involving streptavidin magnetic or agarose supports while having little to no effect on antigen binding. The NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin is provided in Thermo Scientific™ No-Weigh™ Format as convenient single-use microtubes, eliminating difficulties associated with weighing small quantities of reagent.

Biotin is a small, naturally occurring vitamin that binds with high affinity to avidin and avidin-like proteins. Biotinylated antibodies typically retain biological activity because the biotin group is relatively small. An antibody conjugated with several biotin molecules can interact rapidly and tightly with streptavidin, making this a good platform for IP applications.

N-Hydroxysuccinimide (NHS) esters are the most popular biotinylation reagents. In pH 7-9 buffers, NHS esters react efficiently with primary amino groups (-NH<sub>2</sub>) by nucleophilic attack, forming an amide bond and releasing the NHS (Figure 1). Proteins typically have many sites for labeling, including the primary amine in the side chain of lysine (K) residues and the N-terminus of each polypeptide.



**Figure 1. Reaction of NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin with primary amine on an antibody.** The leaving group and any non-reacted biotin reagent are removed during the desalting step.



## Important Product Information

- Use reconstituted NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin immediately. The NHS-ester moiety readily hydrolyzes and becomes non-reactive; therefore, do not prepare solutions for storage. Discard any unused reconstituted reagent.
- NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin is moisture-sensitive. Immediately before use, puncture the microtube foil with a pipette tip, add solvent and mix by pipetting up and down. After use, cut off the used microtube and discard. Store the microtube strip at 4°C in the foil pouch provided.
- Avoid buffers containing primary amines (e.g., Tris or glycine), as these will compete with the intended reaction (Figure 1). If necessary, dialyze or desalt to exchange the antibody into phosphate-buffered saline (PBS).
- Antibodies must be carrier-free (i.e., free of BSA and/or gelatin). Any carrier will compete with the intended reaction. To remove carrier, Protein A, G, or A/G resins may be used, as well as other commercially available antibody clean-up kits.
- This kit has been successfully used to label multiple mouse IgG<sub>1</sub>, mouse IgG<sub>2</sub>, rabbit monoclonal and polyclonal antibodies without impairing antigen binding. The number of biotin groups per antibody molecule ranges from 3-7, as determined by the Thermo Scientific™ Fluorescence Biotin Quantitation Kit (Product No. 46610).

## Procedure for Biotinylating Antibodies

**Note:** The maximum total reaction volume must not exceed 110µL; this is the volume limit on the Thermo Scientific™ Zeba™ Spin Desalting Column.

### A. Calculations

1. Calculate millimoles of NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin to add to the reaction for a 40-fold molar excess:

$$\mu\text{g IgG} \times \frac{1\text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mmol IgG}}{150,000 \text{ mg IgG}} \times \frac{40 \text{ mmol Biotin}}{1 \text{ mmol IgG}} = \text{mmol Biotin}$$

- 40 = Recommended molar fold excess of biotin per protein sample
- 150,000 = Molecular weight of IgG

2. Calculate microliters of 8.5mM NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin (prepared in Step B.3) to add to the reaction:

$$\text{mmol Biotin} \times \frac{589 \text{ mg}}{1 \text{ mmol Biotin}} \times \frac{100 \mu\text{L}}{0.5 \text{ mg}} = \mu\text{L Biotin Solution}$$

- 589 = Molecular weight of NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin
- 100 = Microliters of solvent in which 0.5mg of NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin is dissolved to make 8.5mM

**Example:** For 85µg of a 1mg/mL IgG (150,000 MW) solution, 2.7µL of 8.5mM NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin will be added.

$$85 \mu\text{g IgG} \times \frac{1\text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mmol IgG}}{150,000 \text{ mg IgG}} \times \frac{40 \text{ mmol Biotin}}{1 \text{ mmol IgG}} = 0.000023\text{mmol Biotin}$$

$$0.000023\text{mmol Biotin} \times \frac{589 \text{ mg}}{1 \text{ mmol Biotin}} \times \frac{100 \mu\text{L}}{0.5 \text{ mg}} = 2.7 \mu\text{L Biotin Solution}$$

3. Calculate the volume of 1X PBS to bring the total reaction to 100µL:  
100µL — (volume of antibody + volume of biotin) = volume of 1X PBS

## B. Biotin-labeling Reaction

**Note:** The antibody must be in an amine-free buffer (preferably PBS) without carrier to perform this labeling reaction (see Important Product Information).

1. Dilute the 20X PBS to 1X (10mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH 7.5) with ultrapure water. The 1X PBS will be used to equilibrate the Zeba Spin Desalting Column.  
**Note:** If precipitate formed in the 20X PBS, warm solution to 37°C in a water bath and vortex before use. The PBS can be stored at 1X if desired.
2. Cut off one microtube of NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin from the No-Weigh Microtube Strip. Return the unused strip of microtubes to its pouch and store desiccated at 4°C.
3. With a pipette tip, puncture the foil top on the biotin reagent microtube. To prepare 8.5mM solution, add 100µL of 1X PBS to the tube and mix by pipetting up and down several times.
4. Combine antibody, 1X PBS and NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin (as calculated in Section A) and mix by gently pipetting up and down.
5. Incubate the reaction at room temperature for 30 minutes.

## C. Buffer Exchange and Excess Biotin Removal

1. Remove bottom closure of Zeba Spin Desalting Column and loosen cap (do not remove cap).
2. Place column in a 1.5-2.0mL collection tube. Centrifuge at 1,500 × *g* for 1 minute to remove storage solution.
3. Place a mark on the side of the column where the compacted resin is slanted upward. Place column in the microcentrifuge with the mark facing outward in all subsequent centrifugation steps.
4. Add 300µL of 1X PBS on top of the resin bed. Centrifuge at 1,500 × *g* for 1 minute to remove buffer.
5. Repeat Step 4 two additional times, discarding buffer from the collection tube.
6. Place column in a new collection tube, remove cap and apply labeling reaction sample (from Section B) to the top of the compact resin bed.
7. Centrifuge at 1,500 × *g* for 2 minutes to collect the sample. Discard desalting column after use.
8. Store biotinylated antibody at 4°C for < 1 month. For longer periods, store at -20°C or -80°C.

## Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
Low or no biotinylation	Buffer contained primary amines	Buffer exchange the antibody into a non-amine-containing buffer such as the PBS provided by desalting columns or dialysis
	NHS-PEG <sub>4</sub> -Biotin was hydrolyzed	Use reagent immediately upon reconstitution
	Carrier protein was present in the antibody solution	Remove carrier protein before biotinylation by using Protein A, G or A/G resin or an antibody clean-up kit. This will reduce competition for labeling

## Additional Information

Please visit our website for additional information including the following:

- Tech Tip #43: Protein stability and storage

---

**Related Thermo Scientific Products**

<b>90408</b>	<b>Pierce™ MS-Compatible Magnetic IP Kit (Streptavidin)</b>
<b>88816</b>	<b>Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads, 1mL</b>
<b>89882</b>	<b>Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 0.5mL</b>
<b>69570</b>	<b>Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device, 10K MWCO, 0.1mL</b>
<b>46610</b>	<b>Fluorescence Biotin Quantitation Kit</b>
<b>20423</b>	<b>Pierce™ Protein A/G Plus Agarose Resin</b>

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS.

Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to humans or animals.

Current product instructions are available at [thermofisher.com](http://thermofisher.com). For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

## Vedlegg C. Protokoll for eksponering av serum med VX

Understående protokoll ble benyttet for eksponering av serum med organofosfat nerveagens VX som beskrevet i kapittel 2.2.4. Eksponeringen ble utført av Ingvild C. Hvinden på FFI.

### Eksponering av serum med VX

Mål: Eksponere serum for VX slik at ulike DBS samplere kan testes med en mer «reell» prøve.

Utgangspunktet er en stamløsning av VX i ACN på 1.01 mg/mL. Den molekylære massen til VX er 267,37 g/mol. Det gir en konsentrasjon på 3.778 mM.

Metoden er basert på anbefalinger fra forsker Alex Fidder, TNO (Netherlands Organization for Applied Scientific Research).

#### Fremgangsmåte

1. Stamløsningen med VX fortynnes til 40 µM med ACN:

$$V_1 = \frac{40 \mu\text{M} \times 1000 \mu\text{L}}{3778 \mu\text{M}} = 10,6 \mu\text{L}$$

Dvs. 10,6 µL med stamløsningen overføres til 989,4 µL ACN.

2. Serum eksponeres for 400 nM VX (ca.  $5 \times$  BuChE konsentrasjon i blod) ved å blande 10 µL med 40 µM VX inn i 990 µL serum.
3. Blankprøve lages på tilsvarende vis, dvs. 10 µL ACN blandes med 990 µL serum.
4. Prøvene settes på ThermoMixer ved 22 °C over natt.
5. Hvis prøvene ikke skal brukes umiddelbart dagen etterpå, alikvoterer de i 200 µL av gangen og lagres ved -20 °C.

## Vedlegg D. Rådata fra analyse ved LC-MS/MS

I dette vedlegget presenteres data fra analyse ved LC-MS/MS som har blitt benyttet til utarbeidelse av boksplott og ANOVA post hoc Tukey test i tabell D1, D2 og D3.

**Tabell D1.** Toppareal (QuantIon) for fem replikater av modifisert filterpapir grad 1 påsatt serum for MRM overgang  $796,3\ m/z \rightarrow 691,3\ m/z$ .

Number	Name	Gruppe	RT	QuantIon
1	JN_mrm_1	Joh_MRM2	9	1777.5
2	JN_mrm_2	Joh_MRM2	9	1115.27
3	JN_mrm_3	Joh_MRM2	9	472.89
4	JN_mrm_4	Joh_MRM2	9	919.41
5	JN_mrm_5	Joh_MRM2	9	1492.3

**Tabell D2.** Toppareal (QuantIon) for fire replikater av modifisert filterpapir CF12 påsatt serum for MRM overgang  $796,3\ m/z \rightarrow 691,3\ m/z$ .

Number	Name	Gruppe	RT	QuantIon
1	AGO_mrm_1	AGONG_MRM2	10	143.37
2	AGO_mrm_2	AGONG_MRM2	10	126.05
3	AGO_mrm_3	AGONG_MRM2	10	179.55
4	AGO_mrm_4	AGONG_MRM2	10	132.93

**Tabell D3.** Toppareal for femten prøver utsatt for VX eksponert serum ved tre metoder, henholdsvis filterpapir type grad 1 (Joh), filterpapir type CF12 (AgoNG) og DynaBeads™, (Beads) for MRM overgang 902,3  $m/z$  → 778,3  $m/z$ .

Number	Name	Gruppe	RT	QuantIon
1	Joh_VX_mrm3_1	VX_Johansen	10	144.61
2	Joh_VX_mrm3_2	VX_Johansen	10	413.69
3	Joh_VX_mrm3_3	VX_Johansen	10	323.54
4	Joh_VX_mrm3_4	VX_Johansen	10	231.35
5	Joh_VX_mrm3_5	VX_Johansen	10	440.99
1	AgoNG_VX_mrm3_1	B_VX_Ago	10	1292.89
2	AgoNG_VX_mrm3_2	B_VX_Ago	10	841.66
3	AgoNG_VX_mrm3_3	B_VX_Ago	10	1331.18
4	AgoNG_VX_mrm3_4	B_VX_Ago	10	1765.79
5	AgoNG_VX_mrm3_5	B_VX_Ago	10	1121.44
1	Beads_VX_mrm3_1	A_VX_Bead	10	3121.3
2	Beads_VX_mrm3_2	A_VX_Bead	10	3088.92
3	Beads_VX_mrm3_3	A_VX_Bead	10	3151.35
4	Beads_VX_mrm3_4	A_VX_Bead	10	2916.26
5	Beads_VX_mrm3_5	A_VX_Bead	10	3461.38

## Vedlegg E. R-kode for kromatogram, boksplott og ANOVA post hoc Tukey test

I dette vedlegget presenteres R-kode som er benyttet til utførelsen av en ANOVA post hoc Tukey test, samt presentasjon av kromatogram og boksplott. All R-kode er skrevet av veileder Ingvild C. Hvinden og justert av Mirna Jarovic.

Rådata som er benyttet til utarbeidelsen av boksplott og ANOVA test kan oppdrives i vedlegg D. Rådata for kromatogramutarbeidelse er lagret på ekstern enhet. Ta kontakt med forfattere for oversendelse.

### E.1 ANOVA post hoc Tukey test

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse, ggplot2)
library(rstatix)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table
df_data <- read.csv("240513_VX_Anova.csv", sep = ";")

# Which variable do you want to perform the significance test on?
outcome_var = "QuantIon"

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT THIS###
# Just a little adjustment to make the code work
grouping_var = "Group"

# Perform ANOVA on specified groups
df_ANOVA <- df_data %>%
  select(!sym(grouping_var), !sym(outcome_var)) %>%
  anova_test(., reformulate(grouping_var, outcome_var))

# Perform Tukey's HSD, a post hoc test on ANOVA. Provides p-values of specific comparisons
THSD_posthoc <- aov(reformulate(grouping_var, outcome_var), data = df_data) %>%
  tukey_hsd()

# Save the Tukey HSD results as a .csv
write_csv2(THSD_posthoc, file = "TukeyHSD_VX_alle.csv")
```



## E.2 Kromatogram

### Kromatogram av standarder 1 ppb og 100 ppb

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse, ggplot2)
library(rstatix)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read_csv("240513_Kromatogram_9190.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_CHromatogramPlot
col_gnm = "Sample_2"

# File name for chromatogram to be saved to
lifilnm1 = "Chromatogram1Plot9190.png"
lifilnm2 = "Chromatogram2Plots9190.png"

## Aesthetic stuff ##

# Select colours for line plot(s)
# Single chromatogram
cl1 = "#ECA400"
# Multiple chromatograms -- note that the palette MUST have the same number of colours and plotted chromatograms
palette1 = c("#4B4237", "#ECA400")

# CHromatogram line plot thickness (0.6 is pretty okay)
sz = 1.0

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
xmin = 8.7; xmax = 9.2; xtic = 10
ymin = 0; ymax = 10000; ytic = 10

# Define font size for axis titles
axT = 18
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate xtic and ytic to an actual useful value
xtic = xmax/xtic
ytic = ymax/ytic

# RUN THIS BEFORE PERFORMING LINE/CHROMATOGRAM PLOTS #
# Ensure data is numeric for chromatogram plots
df_data <- df_data %>%
  mutate_if(is.character, as.numeric)

# Make line plot of one or more chromatograms
df_long <- df_data %>%
  pivot_longer(-Minutes, names_to = "Sample", values_to = "Ion.Counts")

# Make line plot of a single chromatogram
p <- ggplot(df_data) +
  # Make a line plot
  geom_line(aes(x = Minutes, y = !!sym(col_gnm)), color = cl1, size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm1, dpi = 300, width = 4, height = 3)

# Plots multiple line plots
p2 <- ggplot(df_long) +
  # Make line plots
  geom_line(aes(x = Minutes, y = Ion.Counts, colour = Sample), size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Set colours for lines
  scale_color_manual(values = palette1) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p2

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm2, dpi = 300, width = 4, height = 3)
```

## Kromatogram for ikke-modifisert filterpapir påsatt serum grad 1 og CF12

```
### Load necessary libraries ###
library(kiddyverse, ggplot2)
library(rstatix)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read.csv("240513_Kromatogram_3973.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_CHromatogramPlot
col_gnm = "Sample_2"

# File name for chromatogram to be saved to
lifilnm1 = "Chromatogram1Plot3973.png"
lifilnm2 = "Chromatogram2Plots3973.png"

## Aesthetic stuff ##

# Select colours for line plot(s)
# Single chromatogram
c1 = "#385737"
# Multiple chromatograms -- note that the palette MUST have the same number of colours and plotted chromatograms
palette1 = c("black", "red")

# CHromatogram line plot thickness (0.6 is pretty okay)
sz = 1.0

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
xmin = 8.7; xmax = 9.2; xtic = 4
ymin = 0; ymax = 100; ytic = 10

# Define font size for axis titles
axT = 18
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate xtic and ytic to an actual useful value
xtic = xmax/xtic
ytic = ymax/ytic

# RUN THIS BEFORE PERFORMING LINE/CHROMATOGRAM PLOTS #
# Ensure data is numeric for chromatogram plots
df_data <- df_data %>%
  mutate_if(is.character, as.numeric)

# Make line plot of one or more chromatograms
df_long <- df_data %>%
  pivot_longer(~Minutes, names_to = "Sample", values_to = "Ion.Counts")

# Make line plot of a single chromatogram
p <- ggplot(df_data) +
  # Make a line plot
  geom_line(aes(x = Minutes, y = !!sym(col_gnm)), color = c1, size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm1, dpi = 300, width = 6, height = 3)

# Plots multiple line plots
p2 <- ggplot(df_long) +
  # Make line plots
  geom_line(aes(x = Minutes, y = Ion.Counts, colour = Sample), size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Set colours for lines
  scale_color_manual(values = palette1) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p2

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm2, dpi = 300, width = 4, height = 3)
```

## Kromatogram for modifisert filterpapir med VX eksponert serum på filterpapir grad 1

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse, ggplot2)
library(rstatix)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read.csv("240513_Kromatogram_3952.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_CHromatogramPlot
col_gnm = "Sample_2"

# File name for chromatogram to be saved to
lifilnm1 = "Chromatogram1Plot3952.png"
lifilnm2 = "Chromatogram2Plots3952.png"

## Aesthetic stuff ##

# Select colours for line plot(s)
# Single chromatogram
cl1 = "#93ADC8"
# Multiple chromatograms -- note that the palette MUST have the same number of colours and plotted chromatograms
palettet1 = c("#475A67", "#93ADC8")

# CHromatogram line plot thickness (0.6 is pretty okay)
sz = 1.0

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
xmin = 9.9; xmax = 10.4; xtic = 4
ymin = 0; ymax = 200; ytic = 10

# Define font size for axis titles
axT = 18
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate xtic and ytic to an actual useful value
xtic = xmax/xtic
ytic = ymax/ytic

# RUN THIS BEFORE PERFORMING LINE/CHROMATOGRAM PLOTS #
# Ensure data is numeric for chromatogram plots
df_data <- df_data %>%
  mutate_if(is.character, as.numeric)

# Make line plot of one or more chromatograms
df_long <- df_data %>%
  pivot_longer(-Minutes, names_to = "Sample", values_to = "Ion.Counts")

# Make line plot of a single chromatogram
p <- ggplot(df_data) +
  # Make a line plot
  geom_line(aes(x = Minutes, y = !!sym(col_gnm)), color = cl1, size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm1, dpi = 300, width = 4, height = 3)

# Plots multiple line plots
p2 <- ggplot(df_long) +
  # Make line plots
  geom_line(aes(x = Minutes, y = Ion.Counts, colour = Sample), size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Set colours for lines
  scale_color_manual(values = palettet1) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p2

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm2, dpi = 300, width = 4, height = 3)
```

## Kromatogram for modifisert filterpapir med VX eksponert serum på filterpapir grad CF12

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse, ggplot2)
library(rstatix)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read.csv("240513_Kromatogram_7387.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_CHromatogramPlot
col_gnm = "Sample_2"

# File name for chromatogram to be saved to
lifilnm1 = "Chromatogram1Plot7387.png"
lifilnm2 = "Chromatogram2Plots7387.png"

## Aesthetic stuff ##

# Select colours for line plot(s)
# Single chromatogram
cl1 = "#acc5ab"
# Multiple chromatograms -- note that the palette MUST have the same number of colours and plotted chromatograms
palette1 = c("#3B5850", "#a6bdb3")

# CHromatogram line plot thickness (0.6 is pretty okay)
sz = 1.0

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
xmin = 9.9; xmax = 10.4; xtic = 4
ymin = 0; ymax = 600; ytic = 10

# Define font size for axis titles
axT = 18
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate xtic and ytic to an actual useful value
xtic = xmax/xtic
ytic = ymax/ytic

# RUN THIS BEFORE PERFORMING LINE/CHROMATOGRAM PLOTS #
# Ensure data is numeric for chromatogram plots
df_data <- df_data %>%
  mutate_if(is.character, as.numeric)

# Make line plot of one or more chromatograms
df_long <- df_data %>%
  pivot_longer(-Minutes, names_to = "Sample", values_to = "Ion.Counts")

# Make line plot of a single chromatogram
p <- ggplot(df_data) +
  # Make a line plot
  geom_line(aes(x = Minutes, y = !!sym(col_gnm)), color = cl1, size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm1, dpi = 300, width = 4, height = 3)

# Plots multiple line plots
p2 <- ggplot(df_long) +
  # Make line plots
  geom_line(aes(x = Minutes, y = Ion.Counts, colour = Sample), size = sz) +
  # Set y scale values
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Set x scale values
  scale_x_continuous(limits = c(xmin, xmax), breaks = scales::breaks_pretty(n = xmax/xtic)) +
  # Set colours for lines
  scale_color_manual(values = palette1) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black")) +
  # Add correct y-axis title
  labs(y = "Ion Count")

# Show plot in RStudio
p2

# Save plot to working directory
ggsave(filename = lifilnm2, dpi = 300, width = 4, height = 3)
```

## E.3 Boksplott

### Boksplott for fem replikater modifisert filterpapir grad 1 påsatt serum

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse)
library(ggplot2)
library(RCurl)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read.csv("JOH_MRM2.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "QuantIon" in 240510_ExampleData and "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_CHromatogramPlot
col_gnm = "QuantIon"

# File name for box plot to be saved to
# Box plot file name
bpfilnm = "JOH_MRM2.png"

## Aesthetic stuff ##
# Select colours for box plot fill (NB! must be the same number as individual groups)
palette1 = c("#475A67")

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
ymin = 100; ymax = 2200; ytic = 10

# Define font size for axis titles
axT = 12
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate ytic to an actual useful value
ytic = ymax/ytic

### PART 3: PLOT CODE, RUN AS YOU NEED IT ###

# Box plot with lots of adjustable stuff
p <- ggplot(df_data) +
  # Make the box plot with adjusted width
  geom_boxplot(aes(x = Gruppe, y = !!sym(col_gnm)), fill = palette1, colour = "black", width = 0.3) +
  # Add individual data points
  geom_point(aes(x = Gruppe, y = !!sym(col_gnm)), fill = "black") +
  # Set number of y ticks and y scale
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white", colour = "black"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        panel.grid.minor = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black"))

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = bpfilnm, dpi = 300, width = 3, height = 8)
```

## Boksplott for fire replikater modifisert filterpapir grad CF12 påsatt serum

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse)
library(ggplot2)
library(RCurl)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read.csv("AG0_MRM2.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "QuantIon" in 240510_ExampleData and "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_ChromatogramPlot
col_gnm = "QuantIon"

# File name for box plot to be saved to
# Box plot file name
bpfilnm = "AG0_MRM2.png"

## Aesthetic stuff ##
# Select colours for box plot fill (NB! must be the same number as individual groups)
palette1 = c("#598b58")

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
ymin = 60; ymax = 250; ytic = 10

# Define font size for axis titles
axT = 12
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate ytic to an actual useful value
ytic = ymax/ytic

### PART 3: PLOT CODE, RUN AS YOU NEED IT ###

# Box plot with lots of adjustable stuff
p <- ggplot(df_data) +
  # Make the box plot with adjusted width
  geom_boxplot(aes(x = Gruppe, y = !!sym(col_gnm)), fill = palette1, colour = "black", width = 0.3) +
  # Add individual data points
  geom_point(aes(x = Gruppe, y = !!sym(col_gnm)), fill = "black") +
  # Set number of y ticks and y scale
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white", colour = "black"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        panel.grid.minor = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black"))

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = bpfilnm, dpi = 300, width = 3, height = 8)
```

Boksplott for femten prøver VX eksponert serum med 3 metoder; DynaBeads, og filterpapir type grad 1 og CF12

```
### Load necessary libraries ###
library(tidyverse)
library(ggplot2)
library(RCurl)

### PART 1: SETTING UP PARAMETERS -- FEEL FREE TO EDIT ###
# Set working directory. Remember, NO backslashes!
setwd("/Users/mirnajarovic/Desktop/BSc FFI/BSc FFI R/MirnaR")

# Load data into a table (change this for plotting box plots or line plots, see example data)
df_data <- read.csv("VX_alle_MRM4.csv", sep = ";")

# Select group to plot in line plot of chromatogram (if you want to plot a single chromatogram)
# "QuantIon" in 240510_ExampleData and "Sample_1" (or "Sample_2") in 240510_CHromatogramPlot
col_gnm = "QuantIon"

# File name for box plot to be saved to
# Box plot file name
bpfilnm = "VX_alle_MRM4.png"

## Aesthetic stuff ##
# Select colours for box plot fill (NB! must be the same number as individual groups)
palette1 = c("#CEC2B6", "#acc5ab", "#93ADC8")

# Define x and y min and max values, as well as number of breaks/ticks in each axis
ymin = 190; ymax = 4000; ytic = 16

# Define font size for axis titles
axT = 12
# ... and axis values
axV = 18

### PART 2: EXECUTION OF CODE -- DO NOT EDIT UNLESS YOU KNOW WHAT YOU'RE DOING ###
# Translate ytic to an actual useful value
ytic = ymax/ytic

### PART 3: PLOT CODE, RUN AS YOU NEED IT ###

# Box plot with lots of adjustable stuff
p <- ggplot(df_data) +
  # Make the box plot with adjusted width
  geom_boxplot(aes(x = Gruppe, y = !!sym(col_gnm)), fill = palette1, colour = "black", width = 0.5) +
  # Add individual data points
  geom_point(aes(x = Gruppe, y = !!sym(col_gnm)), fill = "black") +
  # Set number of y ticks and y scale
  scale_y_continuous(limits = c(ymin, ymax), breaks = scales::breaks_pretty(n = ymax/ytic)) +
  # Sort out background colour, font size etc
  theme(panel.background = element_rect(fill = "white", colour = "black"),
        panel.grid.major = element_line(colour = "white"),
        panel.grid.minor = element_line(colour = "white"),
        axis.title = element_text(size = axT),
        axis.text = element_text(size = axV, colour = "black"))

# Show plot in RStudio
p

# Save plot to working directory
ggsave(filename = bpfilnm, dpi = 300, width = 8, height = 8)
```



## Vedlegg F. Beregninger og sammenligninger

Beregnet retensjonstid for BuChE og OP-BuChE

Beregninger og sammenligning for prøveresultater av BuChE og OP-BuChE, herav: gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik og deteksjonsgrense, samt sammenligninger mellom filterpapir- og DynaBeads™ prøver.

Beregning av mengde hCG for anvendt litteratur (Johannsen et al. og Mrsa et al.)

	A	B	C	D	E	F
1	Utrekning retensjonstid (Rt) OP-BuChE			Utrekning retensjonstid (Rt) BuChE		
2	Rt	Hva	Verdi	Rt	Hva	Verdi
3	10,1250	gjennomsnitt = SUMMER(A3:A29)/27		8,9510	gjennomsnitt = SUMMER(D3:D17)/15	
4	10,1280	STD = STDAV.S(A3:A29)		8,9550	STD = STDAV.S(D3:D17)	
5	10,1320			8,9580		
6	10,1350			8,9610		
7	10,1390			8,9650		
8	10,1420			8,9680		
9	10,1450			8,9720		
10	10,1490			8,9750		
11	10,1520			8,9790		
12	10,1560			8,9820		
13	10,1590			8,9850		
14	10,1620			8,9890		
15	10,1660			8,9920		
16	10,1690			8,9960		
17	10,1730			8,9990		
18	10,1760					
19	10,1800					
20	10,1830					
21	10,1860					
22	10,1900					
23	10,1930					
24	10,1970					
25	10,2000					
26	10,2040					
27	10,2070					
28	10,2100					
29	10,2140					
30						

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													
24													
25													
26													
27													
28													
29													
30													
31													
32													
33													
34													
35													
36													
37													
38													
39													
40													
41													
42													
43													
44													
45													
46													
47													
48													
49													
50													
51													
52													
53													
54													
55													
56													
57													
58													
59													
60													

## Vedlegg G. Student $t$ -test for modifisert filterpapir grad 1 og CF12 påført serum

Det ble utført en uparet student  $t$ -test for sammenligning av modifisert filterpapir av type grad 1 og CF12 applisert serum. Testen ble utført ved hjelp av en gratis  $t$ -test kalkulator fra [graphpad.com](https://graphpad.com)

Topparealene for replikatene ble lagt inn i tabell, hvor filterpapir type grad 1 er gruppe 1, og filterpapir CF12 er gruppe 2.

### 1. Choose data entry format

Caution: Changing format will erase your data.

- ☒ Enter up to 50 rows
- ☐ Enter or paste up to 2000 rows
- ☐ Enter mean, SEM and N
- ☐ Enter mean, SD and N

### 2. Choose a test

[Help me choose](#)

- ☒ Unpaired  $t$  test
- ☐ Welch's unpaired  $t$  test (used rarely)
- ☐ Paired  $t$  test

### 3. Enter data

[Help me arrange the data](#)

Label:

	Group 1	Group 2
1	1777.5	143.37
2	1115.27	126.05
3	472.89	179.55
4	919.41	132.93
5	1492.3	

### 4. View the results

[Calculate Now](#)

[Clear Form](#)

# Unpaired *t* test results

## P value and statistical significance:

The two-tailed P value equals 0.0056

By conventional criteria, this difference is considered to be very statistically significant.

## Confidence interval:

The mean of Grad 1 minus CF12 equals 1009.9990

95% confidence interval of this difference: From 402.9113 to 1617.0867

## Intermediate values used in calculations:

$t = 3.9340$

$df = 7$

standard error of difference = 256.738

## Review your data:

Group	Grad 1	CF12
Mean	1155.4740	145.4750
SD	505.8734	23.8065
SEM	226.2335	11.9032
N	5	4