

Serum Array; En metode for høykapasitetsanalyser av serumprøver

Marte Sneeggen

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Per Bruheim, IBT

Biveileder(e): Arne Sandvik, NTNU

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norwegian Microarray Consortium (NMC), Institutt for kreft forskning og molekylær medisin, Det medisinske fakultet, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i perioden januar 2010 til mai 2011. Min faglige veileder har vært professor, dr.med. Arne K. Sandvik, Institutt for kreftforskning og molekylær medisin, Det medisinske fakultet, NTNU og min ansvarlige veileder var førsteamanuensis Per Bruheim, Institutt for bioteknologi, fakultet for naturvitenskap og teknologi, NTNU.

Jeg vil gi en stor takk til Arne K. Sandvik for god veiledning og støtte under oppgaven. Videre vil jeg takke Hallgeir Bergum for opplæring og veiledning vedrørende maskiner og programmer som ble benyttet.

Jeg vil også gi en stor takk til de jeg har delt kontor med, de ansatte ved Norwegian Microarray Consortium (NMC), Trondheim, overingeniør Sten Even Erlandsen, overingeniør Tone Christensen og avdelingsingeniør Tom Wheeler. De har stilt opp for meg hva enn det skulle være og holdt ut med meg under oppholdet.

Trondheim, 16. mai 2011.

Marte Sneeggen

Sammendrag

Bakgrunnen for prosjektet var behovet for å etablere en metode for høykapasitetsanalyser (mange prøver – få målinger) av proteiner, på innsamlet materiale fra norske biobanker. Norsk mikromatrisekonsortiums node ved NTNU har tidligere utført en serie piloteksperimenter for å avklare om mikromatriseformatet kan brukes til dette formålet. Resultatene var lovende, og gav et grunnlag for videreutvikling. Grunntanken var å trykke (“spotte”) serumprøver på mikromatriselides og deretter merke disse med et antistoff for å registrere dette med et reporter-molekyl. Dersom en på samme slide trykte prøver/standarder med kjent mengde antigen ville disse kunne fungere som en standardkurve og en fikk et kvantitativt mål på mengden av antigen i de ukjente serumprøvene. Målet var å kunne trykke opptil 20.000 serumprøver per mikromatrise og på denne måten analysere et stort antall prøver til en lav kostnad.

Det ble valgt å bruke Prostata spesifikt antigen (PSA) som serumprotein. Dette fordi PSA er viktig i sammenheng med screening for prostatakreft, og var en utfordring da det er såpass lite av proteinet i serumet til menn. Dersom en fikk etablert mikromatrisebaserte målinger av PSA ville svært mange andre proteiner som finnes i høyere konsentrasjoner sannsynligvis være lett tilgjengelig for metoden.

De nåværende resultatene viser en lineær kurve for gjennomsnittsverdiene av signal for hver PSA-konsentrasjon, men metoden er ikke presis nok. På dette tidspunktet er det ikke mulig å se forskjell på prøver med forhøyede PSA konsentrasjon og prøver med PSA konsentrasjon i normalområdet. Den dynamiske rangen må forbedres ved å minske egenfluorescensen og få sterkere prøvesignaler. For å få til dette er det ønskelig å fjerne amplifiseringstrinnene da amplifisering medfører en usikkerhet som gjør det vanskelig å vurdere resultatene. Metoder som kan gjøre dette mulig er bruk av flere antistoffer som er rettet mot forskjellige epitoper i en kombinasjon med for eksempel Quantum dots.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
1. Innledning	1
1.1 Generelt om mikromatrise-teknologien	1
1.2 Generelt om protein mikromatriser	2
1.2.1 Forward og reverse phase matriser	2
1.3 Produksjon av egne mikromatriser	3
1.3.1 Trykkteteknikk:	3
1.3.2 Overflatekjemi og prøvebehandling	4
1.3.3 Deteksjon av spesifikke proteiner på mikromatriser - antistoffer	5
1.3.4 Deteksjon av spesifikke proteiner på matriser – signalamplifikasjon:	6
1.4 Prostata spesifikt antigen	8
1.5 Hensikten med oppgaven	9
2. Materialer og Metode	10
2.1 Trykking	10
2.1.1 Reagenser og utstyr	10
2.1.2 Prosedyre	10
2.2 TSA Amplifisering	12
2.2.1 Reagenser og utstyr	12
2.2.2 Prosedyre	12
2.3 Metodeutvikling	14
2.3.1 Trykkepennene	14
2.3.2 Slides	14
2.3.3 Crosslinking	15
2.3.4 Blokkering	15
2.3.5 Tyramid inkubasjonstid	15
2.3.6 Antistoff fortynning	15
3. Resultater	17
3.1 Trykking av array	17
3.1.1 Utprøving av nåler	17
3.1.2 Andre problemer med trykking:	18
3.2 Valg av slide	19
3.2.1 Egenfluorescens	19
3.2.2 Proteinbinding til slide	20
3.2.3 Blokkering av uspesifikk binding	20

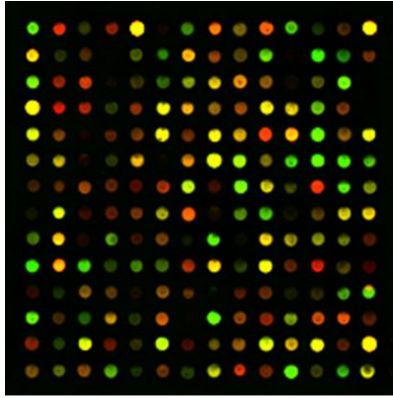
3.4 Monoklonale antistoffer	22
3.5 Polyklonalt antistoff	23
3.6 Tyramid signalamplifikasjon (TSA)	24
3.7 Variering av antistoff fortynninger	27
4. Diskusjon.....	29
5. Konklusjon	34
6. Referanser.....	35
Vedlegg 1: Reagensløsninger	38
Vedlegg 2: Gjennomsnitt av egenfluorescens	39
Vedlegg 3: Rådata polyklonalt og monoklonalt antistoff	41
Vedlegg 4: Rådata for tyramidinkuberingstid tjue minutter	43
Vedlegg 5: Rådata for tyramidinkuberingstid ti minutter	44
Vedlegg 6: Rådata for tyramidinkuberingstid ett minutt.....	45
Vedlegg 7: Rådata for tyramidinkuberingstid tre minutter	47
Vedlegg 8: Rådata for tyramidinkuberingstid fem minutter	49
Vedlegg 9: Rådata for tyramidinkuberingstid sju minutter.....	51
Vedlegg 10: Rådata for tyramidinkuberingstid 12,5 minutt	53
Vedlegg 11: Rådata for tyramidinkuberingstid femten minutter	55
Vedlegg 12: Rådata for tyramidinkuberingstid 17,5 minutt	57
Vedlegg 13: Rådata for antistoff fortynning 1:500	59
Vedlegg 14: Rådata for antistoff fortynning 1:1000	60

1. Innledning

1.1 Generelt om mikromatrise-teknologien

Mikromatrise teknologien kom fra solid fase analyser, som enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) og DNA/RNA dot blot. I disse metodene ble molekyler satt fast på en solid fase, det kunne enten være prøven som inneholdt ønsket molekyl, eller et “capture” molekyl som skulle binde molekylet som skulle kvantiteres (1). På 1990-tallet ble mikromatrise innført for fullt og ble fort en høykapasitetsanalyse for å måle ekspresjonsnivået til tusenvis av gener samtidig (2). Det hele startet med at en matrise av cDNA kopier som var korresponderende til mRNA ble trykket på en slide laget av glass. Miniaturiseringsteknikk gjorde det mulig å lage “spots” med tverrmål i mikrometerområdet, og disse matrisene ble kalt mikromatrise. Den største forskjellen fra andre solid-fase metoder er altså at miniaturiseringen gjør det mulig med svært mange målinger samtidig (3).

På midten av 90-tallet ble fluorescens tatt i bruk for å detektere signaler. Deteksjon med fluorescens gav tilgang til to-farge hybridiserings-metoder. Nå kunne mRNA fra to forskjellige biologiske prøver merkes med hvert sitt fluorokrom, og hybridiseres til en og samme probe (“spot”) (4). Det relative uttrykket av dette genet mellom de to prøvene kunne så bestemmes. En kunne sammenlikne for eksempel kreftceller med friske celler, og si noe om uttrykksmønsteret av svært mange gener samtidig. I praksis valgte en som oftest å konvertere fluorescenssignalet til synlig farge. I sammenlikninger ga en gjerne den “syke” prøven fargen rød og den “friske” prøven (eventuelt en kontrollprøve), fargen grønn. Var genet høyest uttrykt i frisk celle ville signalet bli overveiende grønt, i syk celle rødt og hvis genet var uttrykt likt i begge situasjoner ble signalet gult. Ved manglende genuttrykk i begge situasjoner ble det ikke noe signal og “spot” fremsto som svart (5).



Figur 1: Bildet viser tofarget mikromatrise der en klart ser de forskjellige fargene og hvilke gener som er aktive i begge prøver og ikke. Grønn: gen høyest uttrykt i frisk celle, rød: gen høyest uttrykt i syk celle, Gult: gen likt uttrykt i begge celler, svart: gen ikke uttrykt verken i frisk eller syk celle (6).

Fra tofargede matriser ble prinsippet utviklet videre med enfargematiser, hvor en matrise brukes i analysen av en enkelt prøve. Dette ble mulig på grunn av nøyaktig standardisering av matrisene, slik at prøver kunne sammenliknes over flere matriser (7). Disse ble lagd kommersielt, og Affymetrix var de første som kom med slike mikromatiser i 1994, fem år etter at de hadde laget den første “high density” mikromatrisen i 1989 (8). Affymetrix har blitt brukt i over 20 000 publiserte vitenskapsartikler. Affymetrix var altså pioneren når det gjelder enfargematiser og kommersielt tilgjengelige genuttrykksmatiser, og i dag er det flere selskaper på markedet (9).

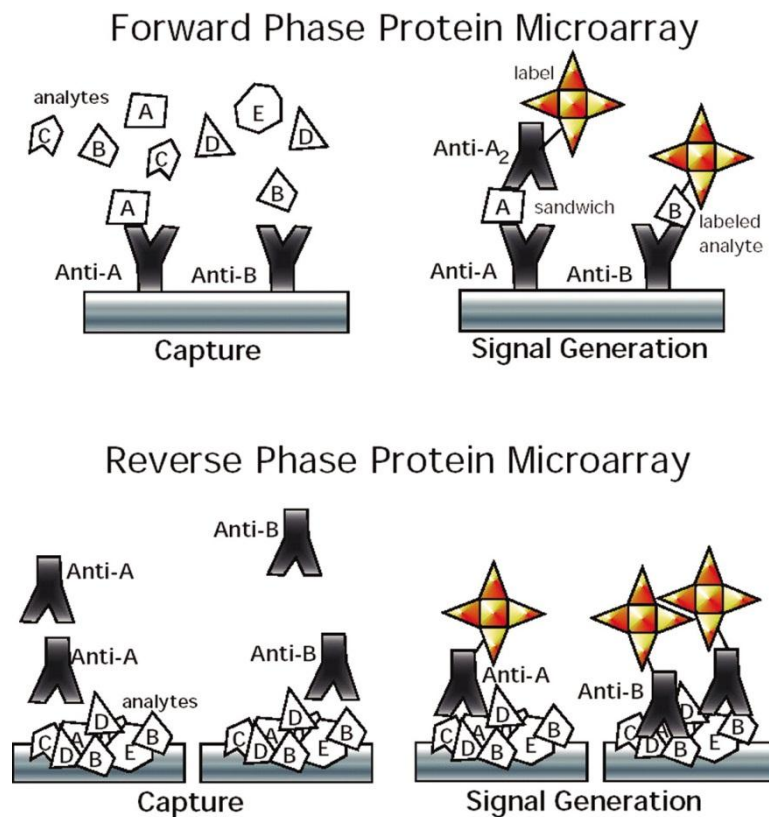
1.2 Generelt om protein mikromatiser

Det finnes to prinsipielt forskjellige proteinmatriser; forward phase matriser måler mange forskjellige proteiner i en prøve. Reverse phase matriser måler ett eller noen få proteiner i et stort antall prøver (10).

1.2.1 Forward og reverse phase matriser

I forward phase inneholder hver spot et molekyl som fanger ønsket protein, vanligvis er dette molekylet et antistoff. Slide inneholder mange forskjellige antistoffer, med en spot for hvert antistoff. Når prøven blir inkubert på slide vil dette tillate screening av mange forskjellige proteiner i en og samme prøve (10). I reverse phase matrise blir prøven spottet på en overflate av glass eller liknende, med en spot for hver prøve. Et molekyl som kan gjenkjenne ønsket molekyl i prøven blir tilsatt, antistoff er mest vanlig her også. Deteksjon skjer ved hjelp av fluorescens merking av antistoffet eller ved bruk av katalysert signal amplifikasjon. Denne metoden gir mulighet til å detektere flere biomarkører i prøven ved å bruk

monospesifikke antistoffer og forskjellige fluoroforer (11). Reverse phase mikromatrise gir en high throughput screening av tusenvis av prøver på en og samme slide (10).



Figur 2: Viser forskjellen mellom forward phase og reverse phase protein mikromatrise. I forward phase blir antistoff festet til overflaten og antigen fra prøven fester seg til antistoffet. I reverse phase er prøven festet til overflaten og antistoff mot ønsket antigen blir tilsatt og binder seg til antigenet og deretter detekteres antistoffet (12).

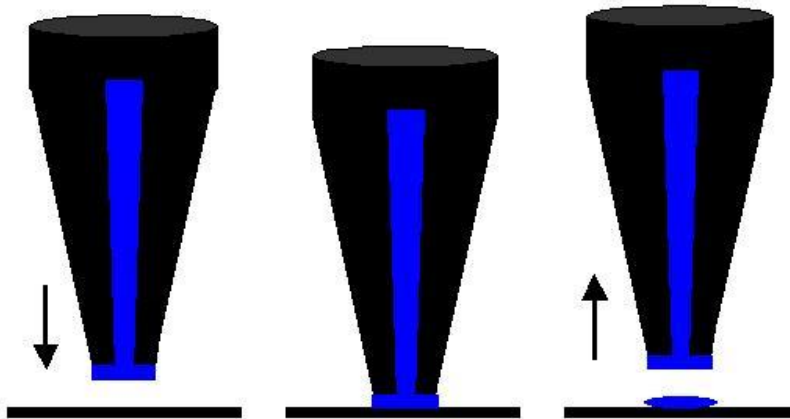
1.3 Produksjon av egne mikromatriser

1.3.1 Trykketeknikk:

Trykte mikromatriser var de første som kom på banen kommersielt. I disse matrisene ble probene trykt på en overflate, glass ble ofte foretrukket da materialet var relativt billig og stabilt i høye temperaturer (13). Det store fortrinnet med mikromatrisene var at en kunne immobilisere mange flere prøver på den solide fasen og i tillegg trengte en kun små volum av reagenser og prøver. På denne måten kunne det måles mange genuttrykk på en gang (1). I begynnelsen ble mikromatriser håndtrykt på en overflate men en fikk raskt konstruert trykkeroboter som kunne trykke matrisene. Presisjonen i dette gjorde det mulig å øke probetettheten radikalt (4).

Det er to metoder for trykking av mikromatriser, kontakt trykking og ikke-kontakt. I kontakt metoden påføres små dråper av prøven direkte på overflaten ved å bruke nåler med kapillær

spalte (14). Spotmorfologien avgjøres av blant annet prøvens viskositet, kontakt område til nålen og nålens overflate-egenskaper. Kapillærspalten som prøven dras opp i sørger for at det kan trykkes flere spotter for hver oppheving av probeløsning og gir dermed en høyere throughput i trykkeprosessen. Et mulig problem er at den mekaniske kraften under spottingen kan føre til at proteinstrukturer blir ødelagt (15).



Figur 3: Viser printemekanismen til nålene fra Arrayit. Printingen skjer i 3 steg: 1) nålhodet går ned mot overflaten, 2) nålen berører overflaten og legger igjen et lite volum av prøven. På grunn av den flate tuppen blir det igjen et tynt lag. 3) Nålen går opp og til neste posisjon for å lage ny spot (16).

Ikke-kontakt trykkmotoden bruker teknikker som fotokjemi, laser og fluid dispense droplet. Disse teknikkene gjør at det blir lite kontaminasjon i prøvene og det gir en høyere throughput. At kontaminasjonen blir mindre ved ikke kontakt trykking kommer av at prøven og trykkeredskapet er adskilt til enhver tid (15).

1.3.2 Overflatekjemi og prøvebehandling

Overflate egenskapen til slidene har mye å si i protein mikromatriser. Overflatene må oppfylle visse kriterier som optimale binde betingelser og et miljø som fremmer funksjonaliteten til proteinet (14). I denne masteroppgaven benyttes det slides som er dekket med nitrocellulose. Disse overflatene binder proteinene i prøven ved hjelp av hydrofobiske bindinger (17). Det er ikke alltid at disse hydrofobiske bindingene er nok for å få proteinene til å holde seg på slideoverflaten. Ved sterke vaskeprosedyrer kan de løsne og forsvinne med vaskingen. For å få en sterkere binding kan en danne kovalente bindinger mellom slide og protein ved hjelp av crosslinking (18). Til dette kan en bruke for eksempel UV lys eller formaldehyd (18, 19). Proteinene blir arrangert tilfeldig på overflaten (14). Når små volum pipetteres på overflaten er det også fare for denaturering, inaktivering av proteinet og fordampning. På grunn av dette er det viktig at temperaturen og fuktigheten under trykking er riktig (20).

1.3.3 Deteksjon av spesifikke proteiner på mikromatriser - antistoffer

Mennesker og dyr kan danne antistoffer mot kroppsfremmede substanser (21), eksempel bakterier, virus eller medikamenter. Disse kroppsfremmede substansene kalles i denne sammenhengen antigener. Antistoffene fester seg med høy affinitet til små deler av antigenet kalt epitoper (22).

Forskere kan lage gitte antistoff ved å immunisere et forsøksdyr med antigen. Dette aktiverer B-lymfocytene hos verten og antistoffproduserende plasmaceller blir utviklet mot antigenet. Det dannes som oftest flere antistoffer, da forskjellige B-lymfocytter kan binde seg til ulike epitoper på antigenet. Serumet fra forsøksdyret sies da å være polyklonalt da det inneholder flere antistoffer med ulik bindingsstyrke til antigenet (21, 23).

Siden 1980 har det også vært mulig å isolere og dyrke enkelte antistoffproduserende celler, og på denne måten får antistoffene identisk spesifisitet. Disse antistoffene rettes mot bare en enkelt epitop hos antigenet, og kalles monoklonale antistoffer (21).

Forståelsen av antistoff og dens funksjoner har vært svært viktig for forskning og diagnostikk. Antistoffene brukes i følsomme og spesifikke målemetoder som radioimmunoassay og ELISA (21). Monoklonale antistoffer har også blitt brukt til pasientbehandling. De gis intravenøst og binder seg til proteiner som deltar i en sykdomsprosess slik at prosessen bremser eller stanser opp (24, 25).

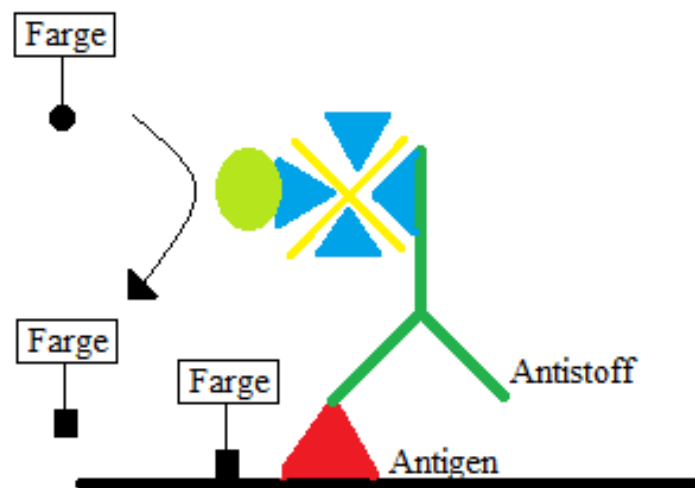
Som nevnt tidligere brukes antistoff til å finne og måle molekyler av interesse, spesielt proteiner som finnes i små mengder slik som visse hormoner og liknende (21, 26). Antigen-antistoff interaksjonen skjer på lik måte som når et enzym binder et substrat. Bindingene er nonkovalente slik som hydrogen bindinger, Van der Waals interaksjoner, ionebindinger og hydrofobiske interaksjoner. Siden alle disse er svake bindinger må det være høy affinitet for at antigenet og antistoffet skal danne et kompleks (22).

Deteksjonen av proteiner er vanskeligere enn med DNA da de ikke har komplementærbinding til gitte molekyler slik som nitrogenbasene i DNA. På grunn av at proteinene mangler denne komplementære partneren kan antistoffer kryssreagere med andre proteiner enn det ønskede. Dette fører til falske positive svar (27). Særlig i ELISA metoden gir kryssreagering mange falske positive svar. Blokkering av endogene molekyler kan dempe disse uspesifikke bindingene (20).

Et annet alternativ i stede for antistoffer er protein bindende RNA molekyler kalt aptamerer. De er lette å syntetisere og bruke i mikromatrise sammenheng (28). Dobbel- og singeltrådet DNA kan også fungere som aptamerer, men RNA har lettere for å lage forskjellige tredimensjonale strukturer enn DNA slik at RNA aptamerer er lettere å bruke. Det er denne tredimensjonale foldingen som fører til at aptameren kan binde til målmolekylet. Også peptider kan brukes som aptamerer, disse er små enkle peptider som har en variabel loop region men er begrenset til “scaffold” proteiner, noe som gjør de mindre fleksible enn RNA og DNA aptamerer (29).

1.3.4 Deteksjon av spesifikke proteiner på matriser – signalamplifikasjon:

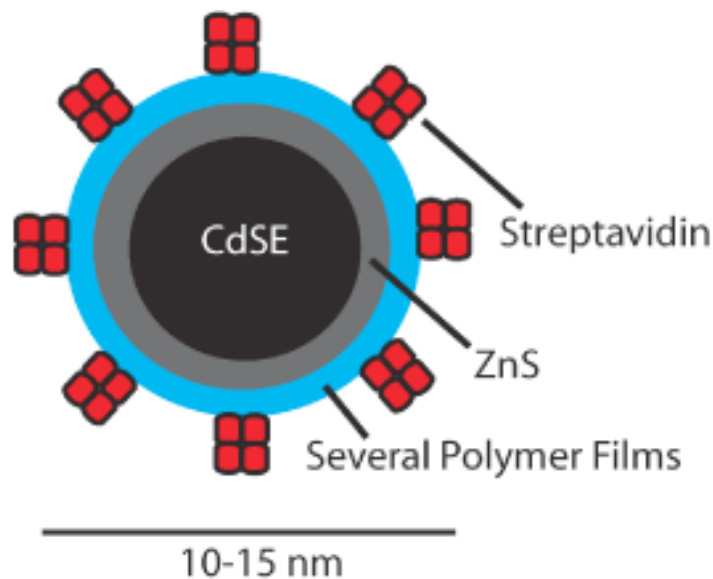
For å kunne oppdage et bestemt protein i prøven kan det være nødvendig å amplifisere signalet. Dette gjøres ofte med tyramid signal amplifikasjon (TSA) som er en enzym mediert deteksjon. TSA benytter seg av den katalytiske aktiviteten til horseradish peroksidase (HRP), der HRP oksiderer phenol enheten til tyramid. Oksidert tyramid kan binde kjapt og kovalent til celleassosierte proteiner som er nær eller på antistoffet med HRP. Tyramidet er merket med fluorofor-konjugert streptavidin. TSA metoden øker sensitiviteten ved immunofluorescens i forhold til tradisjonell fluorescens, men TSA kan ikke gjøre noe med fotostabiliteten til fluorokromene, så lave signaler på grunn av fotobleking er fortsatt et problem (30).



Figur 4: Tyramid signal amplifikasjon (TSA), Antistoffet er bitoinylert (blå trekant) slik at streptavidin (gult kryss) kan feste seg og flere biotin molekyler kan feste seg til de fire bindingssetene. Perokidasen (grønn runding) fester seg til komplekset og katalyserer reaksjonen med tyramide. Tyramiden er uaktivert (Runding med farge hengende på) når den blir tilsatt, men peroksidasen aktiverer tyramide (firkant med farge hengende på) til en reaktiv form som binder seg til elektronrike proteiner i nærheten. Basert på illustrasjon fra (31).

TSA metoden bruker avidin og biotin for amplifisering. Det er derfor viktig at slide blir blokkert for endogent biotin for å forhindre høy uspesifikk bakgrunn. For å blokkere brukes avidin- og biotin-reagenser og dette trinnet må utføres før slide inkuberes med antistoff som er biotinyllert (32). Avidin blokkeringsreagenset blir brukt for at avidin skal kunne binde til alle biotinmolekyler som er i prøven fra før av. Avidin har fire bindingssteder for biotin slik at etter avidin er tilsatt blir biotin blokkeringsreagens tilsatt for å tette igjen alle bindingssetene (33).

Fluorokromer som Alexa er svært utsatt for fotobleking under sterk illuminering. Quantum dots (Qdots) er fotostabile fluoroforer og har et smalt emisjonsspekter, de er derfor ikke utsatt for fotobleking. Qdots er nanokrystaller med en kjerne av kadmium selenid med et lag zink sulfid. I tillegg kan en ha et lag med polymerer over Qdots. Dette laget fører til konjugering med streptavidin eller IgG. Bruk av TSA sammen med Qdots har vist seg å øke sensitiviteten og fotostabiliteten til prøver som gjennomgår fluorescens deteksjon (30).



Figur 5: Viser strukturen til en Qdot. Med kadmium selenid innerst også et lag med Zink sulfid. For å gjøre den vannløselig lager en et lag med polymerer. Da kan også streptavidin binde seg til den (34).

1.4 Prostata spesifikt antigen

Prostata spesifikt antigen (PSA) er et enzym som dannes av prostata-kjertelen, enzymet blir dannet av genet ved navn kallikrein relatert peptidase 3 (KLK3) (35). PSA katalyserer nedbrytning av sædvæskekoagel (36). ProPSA består av 244 aminosyrer og ved aktivering fjernes sju av aminosyrene fra N-terminus. Rundt 70 – 90 % av PSA er bundet i komplekser i serum, med α_1 -anti-chymotrypsin (ACT)/Serpin A3, α_2 -macroglobulin eller α_1 -antitrypsin/serpin A1. Det resterende (10 – 30 %) er ubundet inaktivt PSA, altså fritt. Bare fritt PSA eller PSA-ACT kan i dag måles ved hjelp av immunoassay (37). Proteinet blir i dag brukt i kliniske analyser som en tumormarkør. For menn er det normalt å ha små mengder PSA i blodet, men ved sykdommer vil konsentrasjonen i blod kunne stige (38). Forhøyede verdier sees ved alle sykdommer i prostata, inklusive cancer og benign hypertrofi (36). Tumormarkøren brukes til kontroll av pasienter med kjent kreft i prostata, men også i diagnostikk ved mistanke om denne sykdommen (36).

Tabell 1: Viser referanseområdet for PSA i menn som er avhengig av alder (36).

År	$\mu\text{g/L}$
0 – 49	0 – 2,5
50 – 59	0 – 3,5
60 – 69	0 – 4,5
> 69	0 – 6,5

1.5 Hensikten med oppgaven

Målet med oppgaven var å etablere en metode for høykapasitetsanalyser av proteiner i serum, på innsamlet materiale fra norske biobanker. Hvis en slik metode blir etablert kan en trykke opptil 20.000 serumprøver per mikromatrise og dermed analysere et stort antall prøver til lav kostnad. PSA ble valgt som protein i disse forsøkene siden det er klinisk viktig, også i screeningsammenheng. Dessuten finnes PSA i ganske små mengder i blod, og dersom PSA kunne måles med mikromatriser ville mange andre proteiner med høyere konsentrasjon i serum sannsynligvis være lett tilgjengelig for metoden.

I dette prosjektet ble det valgt å trykke serumprøver på mikromatriser for så å merke disse med antistoff mot PSA og bruke bundet antistoff og et reporter-molekyl til å måle mengde PSA. For å kunne få et kvantitativt mål på mengden av antigen i ukjente prøver ble kvinne-serum tilsatt PSA i kjente konsentrasjoner for å lage en standardkurve. Norsk mikromatrise-konsortiums node ved NTNU hadde allerede utført piloteksperimenter for å se om mikromatrise lot seg bruke i denne sammenhengen, resultatene var lovende og ga grunnlag for videreutvikling.

I piloteksperimentene ble tilsatt PSA brukt som antigen også i "ukjent" prøve. Grunnen til at PSA ble tilsatt var at konsentrasjonen i serum hos friske menn er svært lav, og det var nødvendig med mer PSA i prøven for å kunne detektere ved de første eksperimentene.

Under piloteksperimentene klarte man å forbedre sensitiviteten fra 500 $\mu\text{l/L}$ til 20 $\mu\text{l/L}$. Målet for dette prosjektet er å måle PSA i serum i hvertfall for å kunne skille normale fra forhøyede verdier, og om mulig kvantitere PSA i normalområdet (6,5 $\mu\text{l/l}$)

2. Materialer og Metode

2.1 Trykking

2.1.1 Reagenser og utstyr

- MicroGrid TAS spotter and print-head, Biorobotics, serienummer: 14538
- FAST™ PAK trykkebuffer (2x), Whatman, katalognummer: 10485331
- Nexterion Spot PB (2x), Schott Nexterion, katalognummer : 1178050
- 384 Well Microarray/High Sample Recovery Plate, Genetix, katalognummer: X7022
- Prostata spesifikt antigen (1,06 mg/ml), Fitzgerald, katalognummer: 30-AP16
- Kvinne serum
- Absolutt etanol, Kemetyl
- 16 Well incubation chambers, Whatman, katalognummer: 10486046
- FAST Frame Multi-Slide Plate, Whatman, katalognummer: 10486001

2.1.2 Prosedyre

Det kommersielle spesifikke antigenet (PSA) har en konsentrasjon på 1.060.000 µg/l noe som er langt over hva som er normalt i serum hos menn (6,9 µg/l) (36). For å lage en standardkurve som inkluderer normalområdet (6,9 µg/l) ble antigenet fortynnet i serum fra kvinne (uten endogent PSA) i henhold til tabell 2. Videre ble de elleve konsentrasjonene samt en blankprøve fortynnet 1:10 med PBS og trykkebuffer (FAST eller Nexterion). Prøvene ble så pipettert over til 384 well microarray/high sample recovery plate tilpasset mikromatriseprinterens med laveste konsentrasjon i den første brønnen også videre.

Tabell 2: Viser fortynningsrekken av Prostata-spesifikt antigen (PSA) i kvinneserum.

	Fortynning	PSA konsentrasjon
1	5 µl PSA + 4995 µl serum	1060 µg/L
2	200 µl av nr. 1 + 200 µl serum	530 µg/L
3	200 µl av nr. 2 + 200 µl serum	265 µg/L
4	200 µl av nr. 3 + 200 µl serum	132,5 µg/L
5	200 µl av nr. 4 + 200 µl serum	66,25 µg/L
6	200 µl av nr. 5 + 200 µl serum	33,13 µg/L
7	200 µl av nr. 6 + 200 µl serum	16,56 µg/L
8	200 µl av nr. 7 + 200 µl serum	8,28 µg/L
9	200 µl av nr. 8 + 200 µl serum	4,14 µg/L
10	200 µl av nr. 9 + 200 µl serum	2,07 µg/L
11	200 µl av nr. 10 + 200 µl serum	1,04 µg/L

Arrayene ble trykt i 16 områder (“subarrayer”) med en MicroGrid TAS mikromatriseprinter og ArrayIt trykkepennner på nitrocellulose slides med 16 områder (Whatman og Gentel). Strukturene i de 16 subarrayene på hver slide ble konstruert i standard programvare for MicroGrid TAS. Innenfor hvert subarray ble prøvene plassert tilfeldig i mønsteret vist i figur 6 og hver konsentrasjon inkludert blank ble replikert fem eller seks ganger. Maskinen var innstilt for å trykke 28 spoter før den hentet prøve på nytt og mellom de forskjellige prøvene ble pennene vasket i etanol (70 %) for å unngå kontaminasjon mellom spoter med forskjellig PSA konsentrasjon.

0	16,56	530	8,28	1,04	0	4,14	132,5
1060	265	33,13	132,5	1060	66,25	2,07	66,25
0	2,07	265	1,04	8,28	0	530	16,56
66,25	16,56	4,14	132,5	4,14	265	33,13	1,04
4,14	0	530	2,07	8,28	530	132,5	1060
33,13	132,5	1060	2,07	0	1060	265	16,56
16,56	8,28	1,04	4,14	2,07	33,13	1,07	4,14
2,07	66,25	33,13	530	8,28	66,25	265	1,07

Figur 6: Viser posisjonen til de elleve konsentrasjonene samt blankprøven i subarrayet.

For å adskille subarray fra hverandre ble inkubasjonskammer og i tillegg en ramme brukt for å holde fast slidene. Dette gjorde det mulig å variere hybridiserings- og deteksjonsvariablene mellom hvert subarray på samme slide.

2.2 TSA Amplifisering

2.2.1 Reagenser og utstyr

- Titramax 101, Heidolph, serienummer: 011013577
- Fosfat bufret saline (PBS), Oxoid, katalognummer: BR0014
- Hydrogen peroksid (H₂O₂), Merck, katalognummer: 1072980250
- Biotin blokkering system, Dako, katalognummer: X0590
- TSA Kit#26, Invitrogen, katalognummer: T20936
- Tyramid med Alexa fluorokrom 647
- Dimethylsulfoksid (DMSO)
- Streptavidin, Horseradish peroksidase konjugat
- Blokkerings reagens
- Amplifikasjon buffer (inneholder 0,02 % thimerosal)
- Hydrogen peroksid (H₂O₂), 30 %
- Anti PSA biotinyllert (polyklonalt, 50 µg/ml), R&D systems, katalognummer: BAF1344
- Anti PSA biotinyllert (monoklonalt, 1 mg/ml), LS-Bio, katalognummer: LSB-2580
- Anti PSA biotinyllert (monoklonalt, 0,9 mg/ml epitop 4), Hytest, katalognummer: 4P33B
- Tween 20, Sigma-Aldrich, katalognummer: P1379
- Tecan LS reloaded (Tecan mikroarrayscanner), Tecan, Serienummer: 605000004
- Genepix Pro 5.1
- Trykkluft, Würth

2.2.2 Prosedyre

2.2.2.1 Blokkering:

For å redusere muligheten for falskt positivt signal ble det utført en rekke blokkeringstrinn. Først ble slide blokkert med H₂O₂ fortynnet i PBS (10 %), og videre med avidin og biotin. Inkuberingstiden var på ti minutter for hver av disse løsningene. Mellom hvert trinn ble det utført en vaskeprosedyre for å fjerne reagensene. For å vaske ble det brukt PBS tre ganger i fem minutter per gang. Etter trinnet med biotin ble det også vasket med PBS-Tween 20 (0,01 %) i fem minutter før det ble vasket med PBS tre ganger. Som en avsluttende blokkeringsreaksjon ble det brukt TSA blokker (10 mg/ml i PBS) i 45 minutter.

Antistoff ble fortynnet i TSA blokker (1:100) og slide ble satt i kjøleskap for inkubering over natt.

2.2.2.2 Amplifisering:

Neste dag ble slide vasket med PBS-Tween 20 (0,01 %) i fem minutter og tre ganger PBS i fem minutter. Denne vaskeprosedyren ble gjentatt mellom hvert inkuberingstrinn og helt tilslutt. Streptavidin horseradish peroksidase konjugatet ble fortynnet i TSA blokker (1:100) og slide ble inkubert med denne i 45 minutter. Neste trinn var å inkubere med tyramid med fluorokromet Alexa 647. Amplifiseringsbufferen ble tilsatt H₂O₂ (30 %) til en fortynning på 0,0015 %. Til fortynningen ble tyramid med Alexa fluorokrom 647 (1 µl) tilsatt. Videre ble fortynningen med 0,0015 % H₂O₂ og tyramid (13 µl) overført til et eppendorfrør med amplifiseringsbuffer (1300 µl), slik at tyramidløsningen ble fortynnet 1:10 000. Etter at tyramidløsningen ble tilsatt på slide var det viktig at sliden ikke ble utsatt for lys da fluorokromet er sensitivt for lys. Det ble derfor brukt sølvfolie for å stenge ut lys.

Under alle trinnene i prosedyren var slide på Titramax 101 (orbitalrister) for å få sirkulasjon i reagensene.

2.2.2.3 Deteksjon:

Slide ble tørket med trykkluft, for så å bli scannet i mikromatrisescanneren (Tecan LS reloaded). Laseren var innstilt på bølgelengden 633, mens filteret på bølgelengden 692. Det ble hentet ut en Gal fil fra trykkeroboten. Denne filen gir opplysning om hver enkelt spot, i dette tilfellet konsentrasjon av PSA. Etter scanning ble bildene behandlet i programvaren Genepix som lager en liste over spots og bestemmer spotintensiteten ut fra målt fluorescens. Data som kommer ut fra bildebehandlingen ble deretter eksportert til Excel regneark for videre behandling.

I vedlegg 1 (s. 42) finnes reagensoppskrifter.

2.3 Metodeutvikling

Denne masteroppgaven gikk ut på å utvikle en metode for bruk av mikromatrise til å måle PSA i normalområdet i blod hos menn. Ved metodeutvikling må en rekke trinn optimaliseres. Dette kapitlet gir en oversikt over hva som ble testet og hvordan det ble gjort.

2.3.1 Trykkepennene

Det ble prøvd ut fire forskjellige penner fra ArrayIt: SMP4 (katalognummer: SMP4), SMP5 (katalognummer: SMP5), SMP5b (katalognummer SMP5b) og SMP15 (katalognummer: SMP15). Disse pennene gir ulike egenskaper til spottene de avsetter på slides. For å se hvilken som ga den beste spotmorfologien ble det blandet kvinneserum (10 µl) med PBS (40 µl) og tilslutt FAST™ PAK trykkebuffer (50 µl) som gav en 1:10 fortykning av serum. Spotter fra alle nålene ble trykt på en slide og visualisert med fluorokromet Alexa 647 (2µl) som var tilsatt i blandingen med serum og trykkebufferen og tilslutt ble slide scannet med Tecan LS Reloaded.

Tabell 3: Viser egenskapene til de forskjellige trykkepennene som ble prøvd ut (16).

Trykkepenn	Spot diameter (µm)	Opptaksvolum (µl)	Volum avsatt på slide (nl)	Minimum avstand mellom spotter (µm)
SMP4	135	0,25	1,1	160
SMP5	165	0,25	1,5	200
SMP5b	185	0,60	2,0	215
SMP15	500	0,25	7,0	600

2.3.2 Slides

Det ble prøvd ut forskjellige slides for å finne den som ga best signal og lavest egenfluorescens. De slides som ble sjekket for egenfluorescens var Pathplus (Gentel, katalognummer: 2-1125), FAST (Whatman, katalognummer: 10485323) og NC-C (Schott Nexterion, katalognummer: 1247134) og NC-N (Schott Nexterion, katalognummer: 1178059). Disse ble scannet på Tecan LS Reoladed uten trykking eller forbehandling, på forskjellige PMT, henholdsvis 100, 150 og 190. Dette ga muligheten til å sjekke egenfluorescensen til de forskjellige slidene og bestemme hvilken slide som ga minst mulig støy.

2.3.3 Crosslinking

Proteinene fester seg til sliden ved hjelp av hydrofobiske bindinger, ved sterk vasking vil en kunne vaske bort proteinene og det ble derfor gjort en utprøving med å crosslinke proteinene til sliden ved hjelp av formaldehyd (bufret 4 %, VWR, Katalognummer: 1.00496.9011) i fem, ti, femten og tjue minutter. Formaldehyden ble fortynnet til 1 % i PBS.

2.3.4 Blokkering

Før amplifisering benyttes er det viktig at endogene substanser som kan gi falske positive signaler blir blokkert. Det blokkeres blant annet for hydrogenperoksidase og biotin som finnes i serum.

For å være sikker på at blokkeringen var tilstrekkelig ble det gjort forandringer i den opprinnelige protokollen fra piloteksperimentene. På den ene enden av sliden ble blokkeringstrinnene med H₂O₂, avidin og biotin fordoblet i tid, fra ti minutter til tjue minutter. På den andre enden ble det valgt å beholde tidene på blokkeringstrinnene, men legge til et ekstra trinn på begynnelsen med SuperBlock (Thermo Scientific, Katalognummer: 37515) i ti minutter. Resten av protokollen ble fulgt som normalt.

Etter amplifisering og scanning ble resultatene behandlet i bildebehandlingsprogrammet Genepix. Etter behandling var det mulig å ta tjue av målingene å beregne bakgrunnens gjennomsnitt.

2.3.5 Tyramid inkubasjonstid

For å få brukbare resultater må tyramid inkubasjonstiden optimaliseres. Ved for lang tid vil reaksjonen ha nådd så langt at signalet blir jevnt høyt uansett konsentrasjon i prøven. Ved for kort tid vil de laveste konsentrasjonene ikke få signal. Det ble forsøkt å variere tiden fra 1-20 minutter.

2.3.6 Antistoff fortynning

Den siste parameteren som ble forandret på i denne oppgaven var fortynningen av antistoffet. Under piloteksperimentene ble det brukt en 1:100 fortynning av antistoffet. Denne var optimalisert for nettopp det antistoffet som ble brukt da. Siden det nå ble brukt et nytt antistoff måtte fortynningen på nytt optimaliseres. Under forsøkene blir det tilsatt antistoff som binder seg til alle antigenene som er tilgjengelige. Etter denne reaksjonen vaskes overflødige antistoffmolekyler bort, men på grunn av at det blir tilsatt mer antistoff enn det som trengs for

å oppdage antigenene, kan det være at antistoffet kryssreagerer med andre molekyler som likner på epitopen på antigenet. Dette medfører uspesifikke (og dermed “falske”) signaler. Derfor er det viktig at fortynningen av antistoffet er optimal.

Antistoffet ble fortynnet til 1:100, 1:500 og 1:1000. Dette betyr at 1 μ l antistoff blir tilsatt for eksempel 99 μ l TSA blokker for å gi en 1:100 fortynning.

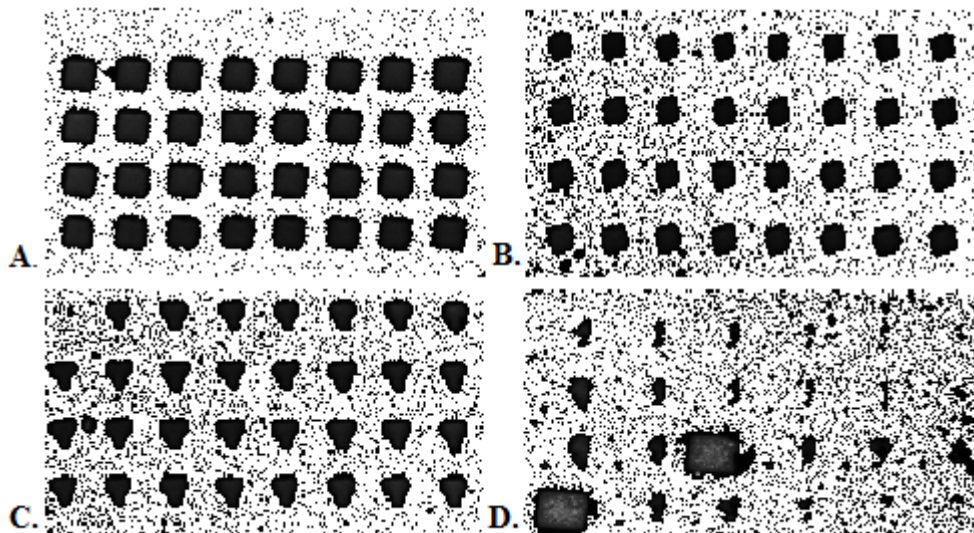
3. Resultater

3.1 Trykking av array

3.1.1 Utprøving av nåler

Fire forskjellige trykkepennner fra ArrayIt ble testet ut for å finne ut hvilken penn som gav den beste spotmorfologien. Hver penn hadde forskjellige egenskaper: hvor mye volum de suger opp, spot diameter, mellomrom mellom spottene og volum som blir avsatt på overflaten.

Pennene som ble prøvd ut var SMP5b, SMP4, SMP5 og SMP15. Ved bruk av fluorokromet Alexa 647, slik det ble forklart i metodeutviklingskapittelet, ble det mulig å scanne spottene. Resultatet vises i figur 7.



Figur 7: Resultatet fra utprøving av forskjellige trykkepennner fra ArrayIt A: viser SMP5b, B: viser SMP4, C: viser SMP5, D: viser SMP15.

Den siden av trykkepennene som skulle avsette prøven var firkantet. Det var derfor ønskelig med firkantede spotter og samtidig at pennen klarte å reprodusere spotmorfologien på alle spottene. Det viser seg at SMP5b gir en god spotmorfologi med god avstand mellom spottene. SMP4 gir mindre spotter med en god morfologi, men reproduserbarheten i mellom spottene er dårligere enn ved SMP5b siden ikke alle spottene blir like firkantete. Ut i fra tabell 3 ser en at spot diameteren til SMP4 er på 135, altså betydelig mindre enn de andre. SMP5 gir trekantede dette gjør bildebehandlingen vanskeligere enn ved de firkantete spottene som SMP4 og SMP5b gir. SMP15 gir store firkanter med dårlig spotmorfologi. Kun enkelte av spottene ble firkantet og resten liknet ikke spotter i det hele tatt. Samtidig bruker denne pennen stor plass for å trykke, da både spotdiameter og mellomrommet mellom spottene er stort (Tabell 3).

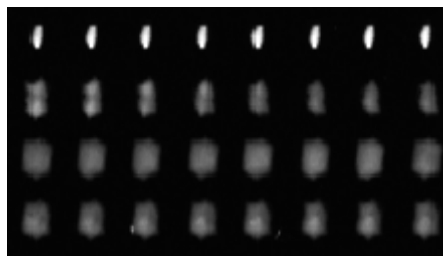
Ut fra disse resultatene er det helt klart at SMP5b er den trykkepennen som gir best spotmorfologi og som bør brukes i dette prosjektet.

3.1.2 Andre problemer med trykking:

Selve trykkeprosessen er følsom for små feil og variasjoner. I de første trykkeforsøkene viste scanning av slide før amplifiseringsmetoden ble utført ofte svarte flekker midt inne i spotten. Det var først mistanke om at pennen hadde blitt innstilt for å gå for langt ned og perforerte nitrocellulosemembranen, men siden problemet ikke bestandig var der og ikke ved hver spot ble det avgjort at dette mest sannsynlig ikke var tilfellet. Etter utallige forsøk på å trykke en slide uten dette problemet fikk en mistanke om at støvfnugg som lå på brettet hvor slides blir lagt for trykking var årsaken. Disse støvfnuggene førte til at slide ble løftet fra brettet, noe som fikk pennen til å perforere membranen på sliden. Dette viser hvor sensitivt trykkesystemet er. Brettet ble derfor nøye rengjort og støvsugd før bruk og dette løste problemet. Også trykkepennene kunne medføre problemer under trykking, dette kunne sees ved at spotter manglet når slide ble scannet før den ble behandlet med blokkering og amplifiseringsreagenser.

Andre problemer som var lettere å løse var at spotmorfologien var avhengig av rett fuktighet i roboten. Uppresis plassering av spotter ble rettet på ved å la roboten nullstille seg mellom hver trykking, slik at trykkeaksene ble helt nøyaktig stilt tilbake.

Det var svært viktig at serumet blir fortynnet i riktig forhold med PBS og trykkebuffer for at serumet ikke skulle bli for seigt. Ble væsken for tykk ble det vanskelig for pennen (SMP5b) å få væsken ut av kapillærspalten til pennene. Derfor ble det utført et forsøk med forskjellig fortynninger av serum; 1:2, 1:4, 1:8 og 1:10 (figur 8).



Figur 8: De forskjellige fortynningene av serum, Øverst 1:2 videre nedover 1:4, 1:8 og 1:10

1:2 fortynningene gir ikke firkantete spotter. Denne fortynningen blir for seig for at den skal kunne slippes lett ut av kapillærspalten til pennen når pennen berører overflaten. Så denne fortynningen gir ingen god løsning for denne bruken. 1:4 fortynningen gir noe større spotter,

men spottene er fortsatt smale selv om de begynner å likne på firkanter. 1:8 og 1:10 fortyningene gir klare firkanter. Dermed er det klart at en av disse er de som har rett fortykning for at nok væske skal komme ut av kapillærspalten å bli trykt på slide. Det ble ikke utprøvd fortyninger over dette da det er ønskelig å fortynne serumet minst mulig. Høyere fortyninger ville også medført at serumet flyter utover, dermed flyter spottene sammen og det skjer en kontaminasjon mellom prøvene. Det ble valgt å bruke 1:10 fortykning videre.

3.2 Valg av slide

Under prosessen med å velge slide gikk en frem og tilbake mellom de forskjellige trinnene i prosedyren slik at resultatene glir noe over i hverandre. Det ble valgt å framstille resultatene i denne rekkefølgen:

3.2.1 Egenfluorescens

Mange av de kommersielle slidene har en egenfluorescens (autofluorescens). Denne egenfluorescensen kommer på grunn av membranene som ligger på slidene for å gi best mulig adhesjon av spotter. Med egenfluorescens menes den støyen som selve sliden gir under scanning, mens bakgrunn er støyen som kommer av uspesifikt signal i og rundt selve spotten. Egenfluorescensen er ikke mulig å fjerne ved hjelp av blokkering av endogene aktiviteter. FAST sliden ble brukt i begynnelsen av dette prosjektet siden laboratoriet hadde erfaring med denne fra pilotforsøkene med PSA. Til å begynne med ga sliden lave signaler og høy bakgrunn. Siden mer blokkering ikke ga noen resultater på bakgrunn som nevnt i kapittel 3.2.3, var det aktuelt å se om signalet skyldtes egenfluorescens. Dette ble gjort ved å scanne FAST og noen andre alternative slider ved forskjellig PMT (photomultiplier) uten at disse hadde vært trykt eller forbehandlet på noe vis.

Tabell 4: Egenfluorescens til slides typene ved forskjellig PMT.

Slide	100 PMT	150 PMT	190 PMT
FAST	535	3772	35760
Gentel	7	11	25
Schott NC-C	948	17927	Metning
Schott NC-N	454	9446	Metning

Fra tabell 4 ser en at FAST og Schott NC-C og NC-N har sterkest egenfluorescens (Vedlegg 2, s.43). Dette skyldes at disse har en hvit membran som dekker området hvor arrayene blir trykt, og en hvit overflate vil gi høyere bakgrunn. Gentel-sliden derimot består av et “monolayer” av nitrocellulose og er svart og gjennomsiktig, dette gjør at egenfluorescensen blir lav.

3.2.2 Proteinbinding til slide

FAST slide fra Whatman ble brukt i piloteksperimentene, men etter at egenfluorescensen ble testet og Pathplus slide fra Gentel viste nesten null i bakgrunn ble det besluttet å prøve å overføre metoden til denne slidetypen. Denne slidetypen har et monolayer av nitrocellulose og det ble på forhånd antatt at det dermed kunne være vanskelig å få proteinene til å feste seg godt nok til overflaten. Forsøket ble optimalisert ved å bruke Gentels egne anbefalte trykkebuffer.

Det ble gjort et forsøk med Pathplus slide hvor alle deteksjonstrinn var utprøvd på forhånd på FAST-slides og hadde vist seg å fungere. I tillegg ble FAST slide brukt som parallell for å se at alt fortsatt fungerte som det skulle. Under scanning viste det seg at det ikke var mulig å oppdage noen av spottene på Pathplus, men FAST ga signaler som ventet. Ved noen av subarrayene på Pathplus var prøvene glidd utover glasset i stedet for å ligge i distinkte spotter. Dette bekreftet at det var vanskelig å få proteinene til å feste seg i nitrocellulose monolayeret på Pathplus slidene. For å prøve å løse dette problemet ble det i første omgang valgt å justere vaskeprosedyrene. Vasketidene ble satt ned til et minutt med PBS for hver vask i stede for fem minutter. Det samme gjaldt PBS med tween. Prøvene ble allikevel vasket bort under prosedyren. Da redusering av vasketiden ikke fungerte ble det valgt å prøve å crosslinke proteinene til nitrocellulosen med 1 % formaldehyd. Formaldehydet ble brukt med inkuberingstider på fem, ti, femten og tjue minutter. Ingen av disse inkuberingstidene gjorde at spottene satt bedre fast. Ut i fra disse resultatene og tidspress ble det dermed valgt å legge bort denne slidetypen og fortsette med FAST slide.

3.2.3 Blokkering av uspesifikk binding

Under all deteksjon og spesielt ved signal amplifisering er det viktig at bakgrunnen er så lav som mulig. Det ble derfor forsøkt å øke “signal to noise” ratio ved å blokkere uspesifikke bindinger.

Blokkeringsforsøkene ble gjort på FAST slides med trykkeprosedyren beskrevet foran. Blokkeringsmetoden fra pilotforsøkene ble forandret ved å prøve med SuperBlock i ti minutter i tillegg til de vanlige blokkeringstrinnene og å doble inkuberingstiden fra ti til tjue minutter. Slidene ble scannet med PMT på 190. Monoklonalt antistoff fra LSbio ble brukt under disse forsøkene. Prosedyrene er beskrevet i material og metode kapittelet. Det ble tatt tjue målinger fra begge blokkeringsmetoden, målingene ble utført av bildebehandlingsprogrammet Genepix.

Tabell 5: Tjue målinger av signalintensiteten til bakgrunnen gjort på slide blokkert med SuperBlock, gjennomsnittet av disse målingene ble beregnet.

Nr.	Intensitet	Nr.	Intensitet
1	39807	11	40140
2	31353	12	35232
3	39964	13	35835
4	35102	14	30603
5	38832	15	45805
6	41665	16	27485
7	39583	17	28009
8	38672	18	30684
9	39682	19	33641
10	36775	20	34943
Gjennomsnitt		36191	

Tabell 6: Tjue målinger av signalintensiteten til bakgrunnen gjort på slide blokkert med dobbel så lang blokkeringstid, gjennomsnittet av disse ble beregnet.

Nr.	Intensitet	Nr.	Intensitet
1	27684	11	35072
2	32678	12	36115
3	35594	13	41434
4	37339	14	32717
5	38336	15	34799
6	41727	16	40165
7	43609	17	31251
8	37437	18	38209
9	32305	19	35710
10	33438	20	38475
Gjennomsnitt		36205	

Fra begge blokkeringsforsøkene ble resultatene på rundt 36200 (tabell 5 og 6). Det at begge blokkeringsforsøkene ga like resultater med forskjellige metoder tyder på at en ikke kan senke bakgrunnen ved hjelp av blokkering. Ved å sammenlikne resultatene med resultatene fra egenfluorescens forsøket ser en at egenfluorescensen til FAST var på 35760 ved 190 PMT (tabell 4). Dette viser igjen at den bakgrunnen som vises når slide blir scannet etter amplifisering er av egenfluorescens og en kan derfor ikke blokkere mer for å redusere denne bakgrunnen.

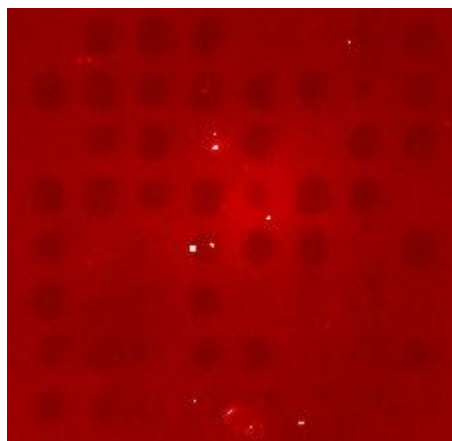
Ut fra disse resultatene ble det valgt å beholde den opprinnelige blokkeringsprosedyren, med ti minutter H_2O_2 , dermed avidin og biotin for så å blokkere med TSA blokk i 45 minutter.

3.4 Monoklonale antistoffer

Det ble brukt to forskjellige monoklonale antistoff, et fra Hytest og et fra LS-Bio. Disse to antistoffene ble utprøvd i forskjellige konsentrasjoner og med amplifikasjon som beskrevet nedenfor. Utprøvingen viste svært forskjellige resultater for de to antistoffene:

Antistoffet fra LS-Bio ga signal, men i begynnelsen like sterkt signal på alle spottene og dette medførte en flat konsentrasjons-signalkurve (Figur 11) inkludert serumprøver uten PSA (vedlegg 4, s. 47). Dette ble tolket som at antistoffet bandt seg uspesifikt, eventuelt kombinert med at tiden med TSA inkubering var for lang da denne var på tjue minutter og at enzym reaksjonen gikk i metning uansett PSA-konsentrasjon.

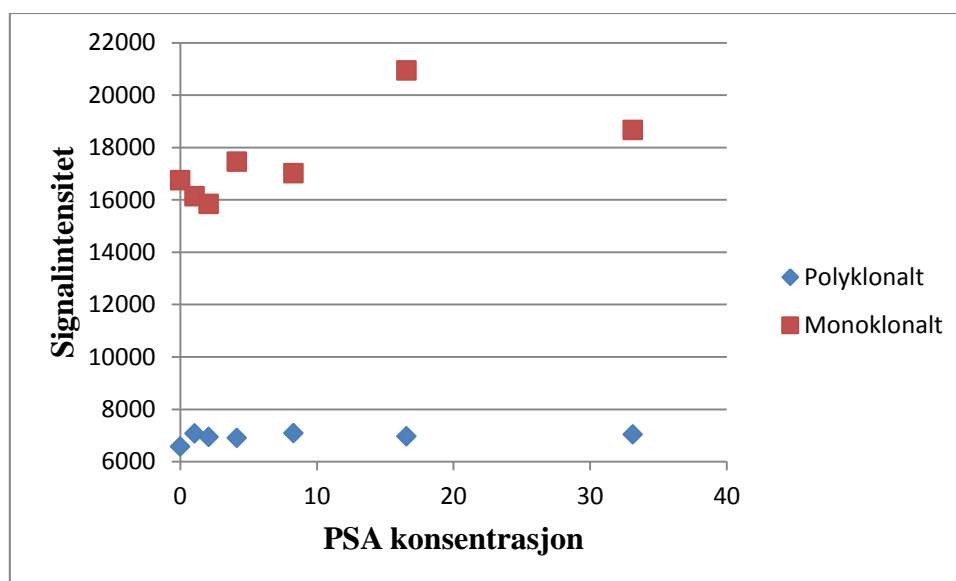
Antistoffet fra Hytest ga ingen signaler i det hele tatt. I stedet kunne en se svarte flekker der prøven var (figur 9). Disse flekkene kalles "black holes". "Black holes" kommer enten av for lite blokkering, slik at signalet fra prøven blir lavere enn bakgrunnen rundt spoten eller av at antistoffet har lav eller ingen bindingsaffinitet til antigenet i prøven (39). Siden blokkeringen var den samme som for antistoffet fra LS-Bio, og Hytest-antistoffet var monoklonalt, fant vi det mest sannsynlig at antistoffet ikke "fant" sin epitop og videre utprøving ble ikke gjort.



Figur 9: Viser blackholes som oppstod ved bruk av monoklonalt antistoff fra Hytest.

3.5 Polyklonalt antistoff

Det var i utgangspunktet tenkt å starte metodeutviklingen med et polyklonalt antistoff, siden disse binder seg til flere forskjellige epitoper og det derfor var større sjanse til å få binding og signal. Det polyklonale antistoffet ga imidlertid svært lave signaler som nesten var på lik intensitet som bakgrunnen (figur 10). Det ble derfor ikke gjort noen videre utprøving av dette.



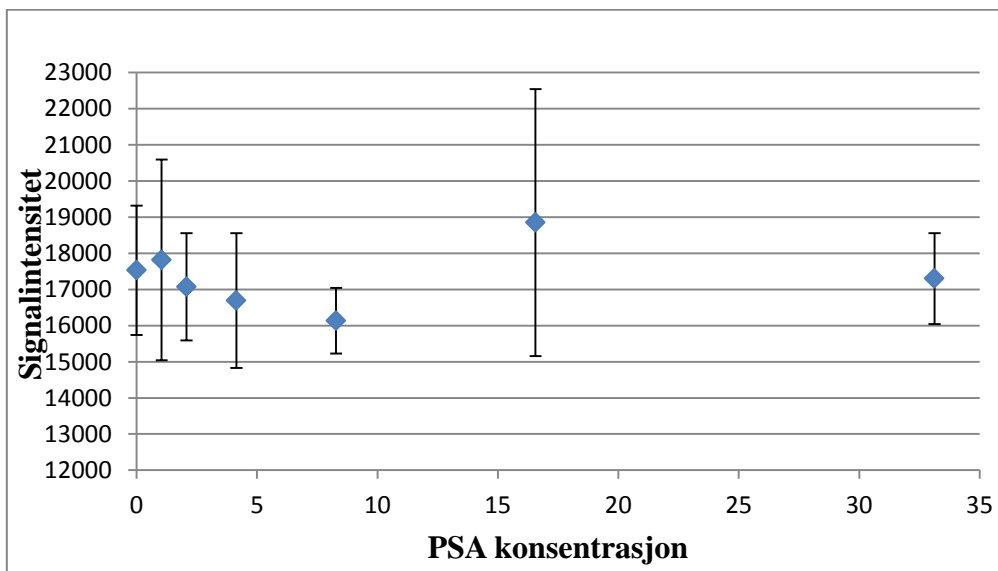
Figur 10: Forskjellen i signalintensiteten til spottene med de forskjellige antistoffene. Det monoklonale antistoffet fra LS-Bio gir et høyere signal enn det polyklonale. PMT 150.

I figur 10 vises det at det polyklonale antistoffet ligger på rundt 6000 i spotintensitet mens det monoklonale (LS-Bio) ligger opp mot 17 000 (vedlegg 3, s. 45). Dette viser at det monoklonale gir sterkere signaler enn det polyklonale og det ble derfor valgt å gå videre med monoklonalt antistoff fra LS-Bio i stede for det polyklonale og det monoklonale fra Hytest.

3.6 Tyramid signalamplifikasjon (TSA)

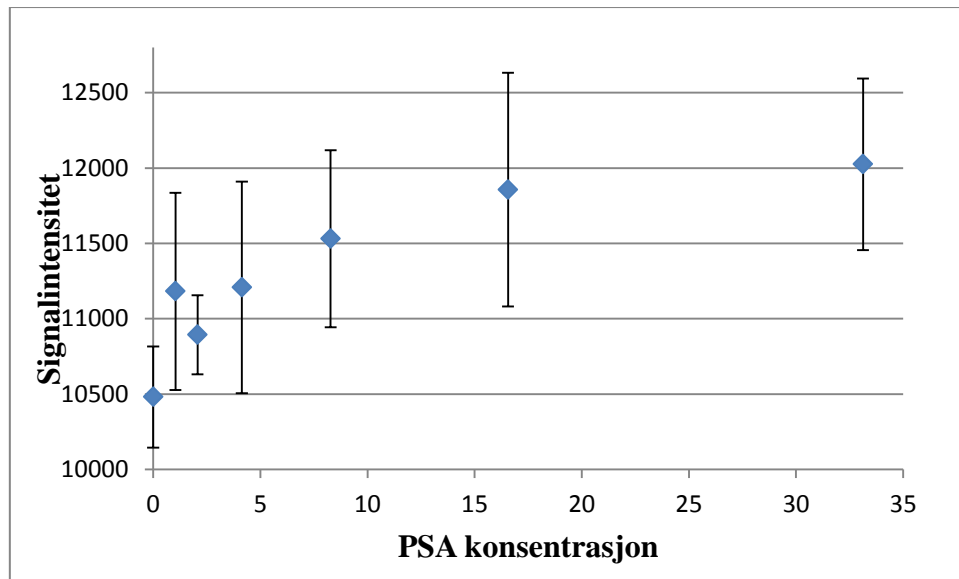
TSA-metoden gir en kraftig amplifisering av signalet. For lang inkuberingstid med tyramid fører til at amplifiseringen når metningspunktet og signalet blir flatt selv om konsentrasjonen av målproteinet er forskjellig i spottene. For kort inkuberingstid gir et svakt-, eller manglende signal. Det var derfor essensielt at TSA inkubasjonstiden ble optimalisert. I produktvedlegget oppgir Invitrogen at mellom fem til ti minutter er optimalt, men denne tiden gjelder for vevssnitt der en kun ønsker å se om noe er tilstede eller ikke, og ikke kvantitering (31). Etter piloteksperimenter ble tjue minutter ansett som optimal tid.

Siden protokollen fra piloteksperimentene ble brukt som utgangspunkt ble det først prøvd en inkubasjonstid på tjue minutter. Ved så lang inkuberingstid var en også sikker på at en skulle få signal. I forsøkene med inkuberingstid med tyramid ble FAST slide brukt sammen med det monoklonale antistoffet fra LS-Bio med en fortynning på 1:100. Hver PSA konsentrasjon har fem eller seks paralleller (konsentrasjon 0 – 4,14 har seks paralleller og resten av konsentrasjonene fem). Spoter som lå langt utenfor resten av parallellene ble fjernet. Det ble også valgt å bare vise konsentrasjonene 0 – 33,13 da disse viser konsentrasjoner fra inne i normalområdet for PSA i serum hos menn til område hvor det er forhøyet. Det ble brukt median i stedet for gjennomsnitt av pixler for å beregne signalet per spot, deretter ble medianverdiene brukt for å beregne gjennomsnitt over flere spotter.



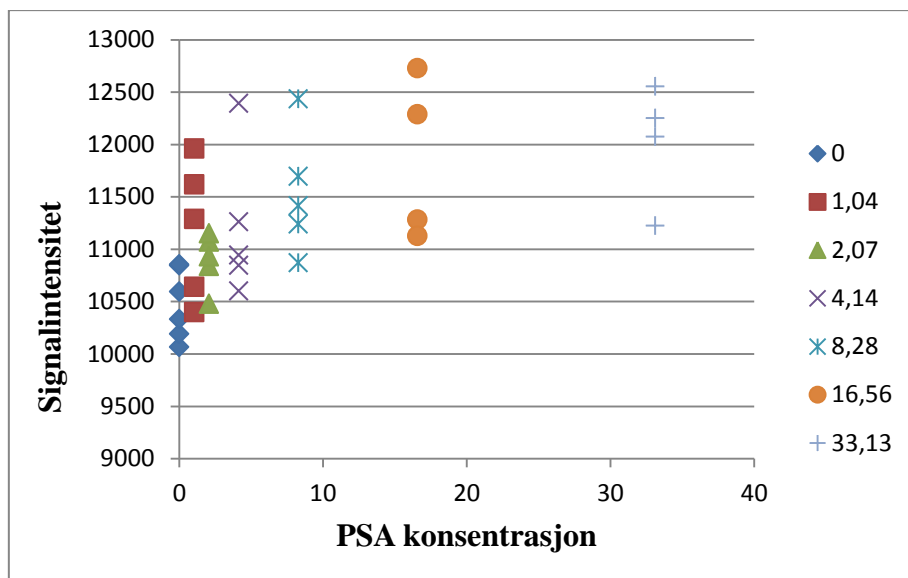
Figur 11: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved tjue minutters inkuberingstid med tyramid. Scannet på 120 PMT.

Ved 20 minutters inkuberingstid med tyramid (Figur 11) er det svært liten forskjell i signal mellom prøvene med forskjellig konsentrasjon. Standardavviket (vedlegg 4, s. 47) mellom replikatene er ganske høyt, dette betyr at det er stor varians innenfor replikatene. Blindprøven som ikke har PSA i seg (vises som null i figur 11) har like høy gjennomsnittlig spotintensitet som prøvene med PSA. Dette tyder på at inkubasjonstiden var så lang at enzym reaksjonen som skjer ved amplifisering har gått i metning.



Figur12: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved ti minutters inkuberingstid med tyramid. Scannet på 120 PMT.

Ved tyramid inkubering på ti minutter begynner kurven å bli tilnærmet lineær innenfor det som er normalområdet for PSA (figur 12), men forskjellen på gjennomsnittet av spotene til prøven uten PSA og opp til spotene med konsentrasjon 32,5 $\mu\text{l/L}$ er svært lav, med en forskjell i intensitet på bare 1600 (vedlegg 5, s. 48). Det er ønskelig at denne forskjellen skal være større, for å gjøre det lettere å skille mellom konsentrasjonene. Standardavviket har blitt mindre enn det var ved tjue minutter. Ved tjue minutter var det største standardavviket så høyt som 3692 mens ved ti minutter har det krympet til 775. Variansen mellom replikatene i subarrayet er altså mindre ved kortere inkuberingstid med tyramid.



Figur 13: Scatterplott som viser hver spot til PSA konsentrasjonene 0-33,13 og hvordan de skiller seg fra hverandre ved tyramid inkuberingstid på ti minutter.

Selv om gjennomsnittet i figur 12 viser at det er en viss linearitet mellom konsentrasjonene 0 – 16,56 når en bruker gjennomsnittet av parallellene, viser figur 13 et annet bilde. Her vises hver spott som et punkt og spottene med konsentrasjon mellom null og 33,13 er tatt med. Resten av konsentrasjonene er tatt bort for å gi en bedre oversikt. Som en ser er det umulig å skille mellom de konsentrasjonene som ligger innenfor normalområdet og utenfor da disse overlapper hverandre. Skulle dette ha vært pasientprøver ville det vært umulig å si om pasienten hadde et normalt nivå av PSA.

Under disse forsøkene ble det også forsøkt flere inkuberingsintervaller og tiden var helt nede i en og opp til tjue minutter (1, 3, 5, 7, 10, 12,5, 15, 17,5 og 20) (vedlegg 4-12, s. 47-61). De resterende tidspunktene som ikke er blitt diskutert over ga variable resultater. Ved tidspunktene 15 og 17,5 minutter var det ikke mulig å oppdage en lineær linje. Avstanden mellom prøvene var heller ikke noe bedre enn den var ved ti minutter.

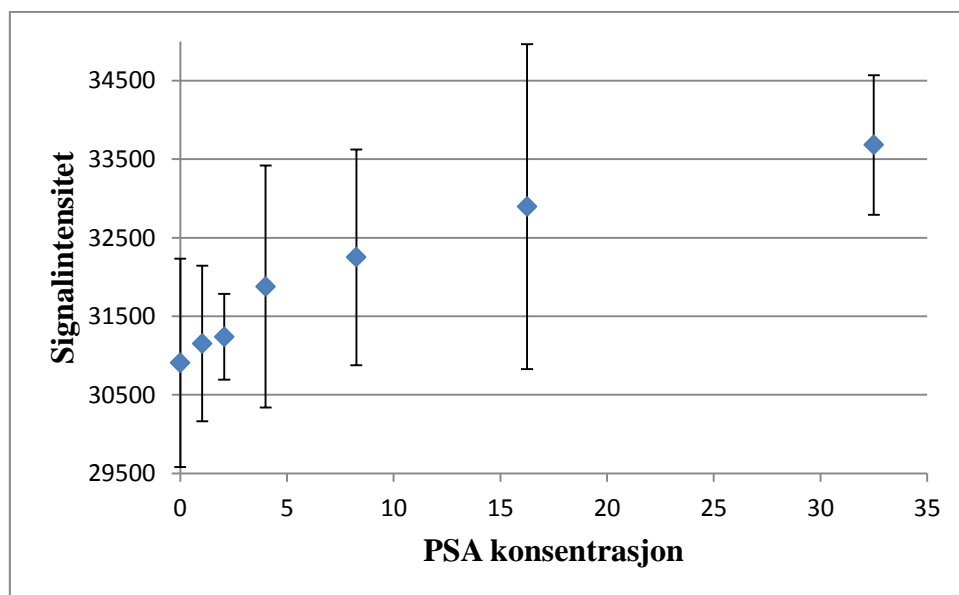
Ut i fra disse resultatene ble det besluttet å gå videre med ti minutter som inkuberingstid selv om den ikke ga en helt optimal lineær kurve og at det ikke var mulig å vise sikker forskjell på enkeltprøver med høy- og lav konsentrasjon. Det ble avgjort at tyramid inkuberingstiden ikke kunne optimaliseres bedre og at det derfor var nødvendig å rette fokus mot andre trinn i protokollen for å gi bedre resultater.

3.7 Variering av antistoff fortynninger

Da tyramid inkuberingstiden hadde blitt optimalisert i henhold til denne metoden, og den ikke ga en kurve som kan brukes til standardkurve, ble det valgt å se på fortynningen av antistoffet. Tidligere hadde 1:100 blitt brukt, da vi var sikre på at dette ga antistoff i overskudd.

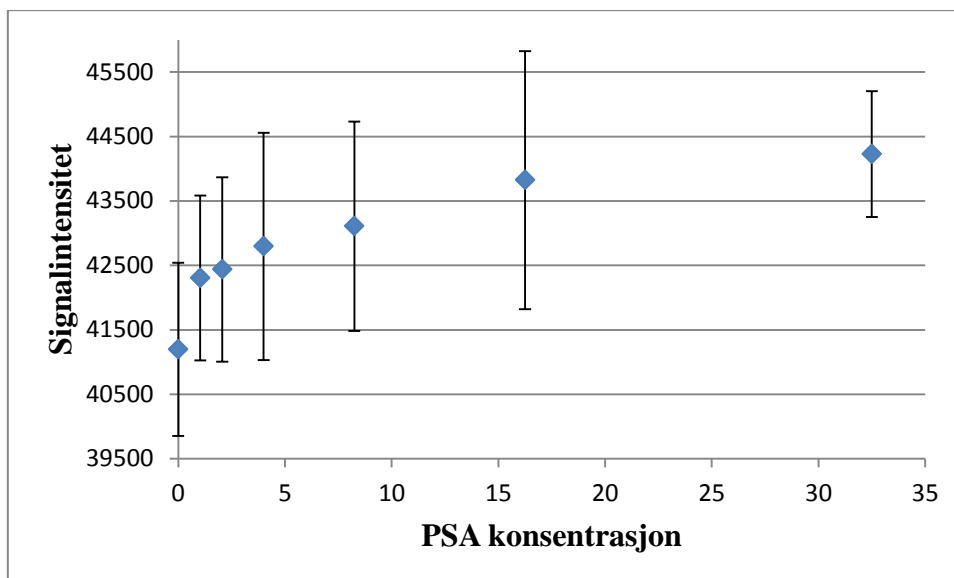
Antistoff fortynningene som ble prøvd var 1:100, 1:500 og 1:1000. Av tidsmessige årsaker ble det ikke prøvd ut flere konsentrasjoner, selv om det ville vært interessant å se hva som hadde skjedd på konsentrasjoner over 1:1000. I dette forsøket ble monoklonalt antistoff fra LS-Bio brukt og ti minutter for tyramid inkubering. Bildebehandling og rådata behandling var likt som under tyramid inkuberings forsøkene. Slide ble tilslutt scannet på en PMT på 190.

Ved 1:100 (figur 12) fortynning av antistoffet var det hele tiden en eller to PSA konsentrasjoner som lå et stykke utenfor linjen resten av konsentrasjonene dannet (vedlegg 5, s. 48). Dette kunne en se også under tyramid inkuberingsforsøkene der 1:100 fortynning ble brukt under forskjellige inkuberingstider med TSA. Denne fortynningen av antistoffet var derfor ikke optimal.



Figur15: Gjennomsnittlig signalintensitet til PSA konsentrasjonene 0- 33,13 ved en antistoff fortynning på 1:500. Scannet på 190 PMT.

Ved en antistoff fortynning på 1:500 (figur 15) begynner alle konsentrasjonene å legge seg på en lineær og stigende kurve (vedlegg 13, s. 63). Ingen av antistofffortynningene avviker vesentlig fra det som ser ut til å være en sammenheng mellom PSA konsentrasjon og signal. Det er fortsatt liten avstand mellom PSA konsentrasjonene i form av signalintensitet noe som gjør det vanskelig å skille konsentrasjonene fra hverandre hvis disse hadde vært ukjent.



Figur 16: Gjennomsnittlig spotintensitet til PSA konsentrasjonene 0- 33,125 ved en antistofffortynning på 1:1000. Scannet på 190 PMT

1:1000 (figur 16) har igjen noen punkter som ligger utenfor resten av den lineære kurven. Også blank prøven, altså prøven som ikke inneholder PSA har høyere konsentrasjon enn prøven med PSA konsentrasjon 1,04 (vedlegg 14, s. 64).

Det var ikke mulig å trekke en konklusjon om hvilken fortynning som bør brukes videre ved bruk av det monoklonale antistoffet til LSbio. For å kunne si noe om hvilke fortynning som bør brukes må det gjøres flere forsøk der en prøver å reprodusere svaret og i tillegg prøver flere fortynninger. 1:100 fortynningen derimot ble brukt under hele prosjektet også da tyramid inkuberingstid ble optimalisert, og ga ikke optimale forhold dermed kan en konkludere med at 1:100 fortynning ikke bør benyttes videre.

4. Diskusjon

I denne masteroppgaven var målet å lage en metode som ved hjelp av reverse phase mikromatriser kunne se forskjell på serumprøver med forhøyede PSA verdier og serumprøver med PSA i normalområdet. Om mulig var det også ønskelig å kvantitere mengde PSA i prøven. I 2006 ble det utført piloteksperimentene ved norsk mikromatrisekonsortium node, NTNU, som ga lovende resultater, men en klarte aldri å nå målet med å få lineariteten ned til under 6,5 µg/L som er normalområdet for menn over 69 år (tabell 1). Resultatene fra disse piloteksperimentene gikk dessverre tapt og det eneste som var igjen var protokollen som ble brukt. Denne protokollen er brukt som utgangspunkt for denne oppgaven.

Under prosjektet var det mange metodeproblemer som måtte løses. Dette kapittelet vil for det meste diskutere resultatene og foreslå forandringer som kan gjøres for å forbedre metoden og forhåpentligvis gjøre høykapasitetsanalyser av proteiner ved hjelp av mikromatriser mulig.

Trykkingen av mikromatrisene medførte en del problemer. Å få trykt mikromatrisene uten noen feil var tidkrevende og en tålmodighetsprøve. Som forklart i resultatene er systemet så sensitivt at et støvfnugg kan gjøre at mikromatrisen ikke blir trykt på rett måte. I tillegg kan et lite trykk mot en av maskinens akser flytte trykkepennene ut av sin bane og dermed gi uregelmessige spotmønstre. Å løse problemene som oppsto under trykkingen var en prosess som tok lang tid og maskinen måtte som regel observeres mens den trykte for å finne ut hvor problemet lå. Slidene ble alltid scannet før de ble behandlet med blokkerings- og amplifiseringsreagenser. Dette gjorde at det var mulig å oppdage feil med spotten før slide ble brukt. Det var på denne måten at det ble oppdaget at pennene hadde perforert membranen, men en kunne også enkelte ganger se at spotter manglet. Dette rettet mistanken mot trykkepennene. På grunn av at serum er ganske viskøst ble pennene ofte blokkert av serum som hang igjen. Ved hjelp av mikroskop var det mulig å oppdage dette og pennene ble rengjort med vann eller trykkluft.

I denne oppgaven ble det brukt kontakt trykking for å kunne trykke mikromatrisene, som tidligere beskrevet var det en del problemer med denne trykkesmetoden og den mekaniske kraften gjorde at nitrocellulose membranen på slidene noen ganger ble ødelagt. Dette medførte at slidene ikke kunne brukes videre, og både reagenser og slides gikk tapt noe som ga en del ekstra kostnader. For å bli kvitt disse problemene kan ikke-kontakt trykkesmetoden være en mulighet, men det vites ikke om denne metoden kan brukes på reverse phase

mikromatriser da det ikke var mulig å finne noen litteratur på dette. Ikke-kontakt metoden ble heller ikke prøvd ut i denne oppgaven da en slik trykkerobot ikke var tilgjengelig og derfor er det ikke mulig å si om denne trykkemetoden ville løse problemene som oppsto under trykking. Trykkeredskapet ved ikke-kontakt trykking er aldri i kontakt med selve slide overflaten, slik at den mekaniske kraften som gjorde at pennene perforerte nitrocellulosemembranen ikke er til stede (15). En annen utfordring er at det er ønskelig å trykke mange tusen prøver per slide og av hver prøve trykkes kun en spot. Dette er en tidkrevende prosess uansett hvilken trykkemetode som velges. Kontakt trykkemetoden er som regel raskere enn ikke-kontakt metoden og er derfor som regel foretrukket når mange prøver skal trykkes (40). Det er imidlertid ingen andre som har prøvd å trykke mange tusen forskjellige prøver på en slide, da de fleste bruker forward phase metoden og ikke reverse phase metoden, slik at det er vanskelig å være sikker på om kontakt trykkemetode virkelig er raskere.

Under forsøkene var det høy bakgrunn hele tiden. Det ble gjort forsøk på å redusere denne bakgrunnen ved å doble blokkeringstidene med peroksidase, avidin og biotin fra ti til tjue minutter. Alle disse reagensene blokkerer endogen aktivitet i serumprøvene. Å doble tiden reduserte ikke bakgrunnen. I tillegg ble det gjort et forsøk der blokkeringstidene ble holdt på ti minutter, og i tillegg lagt til et trinn der det ble blokkert med SuperBlock. Da dette heller ikke ga lavere bakgrunn ble resultatene sammenliknet med resultatene fra egenfluorescens forsøket, og det viste seg at den høye bakgrunnen skyldtes membranen til FAST slide. FAST slide har en membran som er hvit og dette gir en høy egenfluorescens. Også NC-C og NC-N slidene har hvite membraner og ga høy egenfluorescens, mens sliden fra Gentel derimot har en mørk overflate og nesten ingen bakgrunn. Det ble derfor konkludert med at den høye bakgrunnen skyldtes membranen til de respektive "hvite" slidene og ikke endogene substanser i serumspottene. Den hvite membranen reflekterer fargen fra laseren slik at membranen også blir rød i likhet med spottene, mens Gentel Pathplus slide er svart og reflekterer ingen farge, derfor blir bakgrunnen fra selve slideoverflaten lav. For å løse problemet med høy egenfluorescens ble Fast og Nexterion slidene lagt til side og det ble valgt å gjøre et forsøk med Pathplus slide.

Selv om Pathplus hadde lav egenfluorescens skulle det vise seg at det var vanskelig å skifte slide i henhold til den protokollen som ble brukt. For å være på den sikre siden ble det brukt en trykkebuffer (Gentel Array buffer 5x, Gentel, katalognummer 2-1012) som produsenten har laget til denne typen slide. Etter blokkering og amplifisering var det ikke mulig å

detektere spotter under scanning. Det første som ble sjekket var om reagensene fungerte siden vi tidligere i prosjektet hadde sett at reagenser plutselig sluttet å fungere selv innenfor angitt holdbarhetstid. Etter validering med FAST slide viste det seg imidlertid at alle reagenser fungerte som de skulle. Konklusjonen ble derfor at problemet lå i selve Pathplus sliden. Siden Pathplus kun har bare ett lag med nitrocellulose kunne det tenkes at det er vanskelig for proteinene å få festet seg og at hard vasking kunne gjøre at proteinene ble vasket bort. Etter prøvinger med å korte ned på vaskeprosedyrene var det fortsatt ikke signaler, og det ble bestemt å bytte trykkebuffer da det var kun dette reagentet som var forandret fra da FAST slide ble brukt. Å bytte trykkebuffer løste ikke problemet, men på et av subarrayene var det mulig å skimte at spottene var dradd utover sliden. Etter dette kunne en konkludere med at det var et problem for proteinene å få festet seg og at de rett og slett forsvant under trinnene når væske ble byttet ut, særlig at vaskeprosedyrene med PBS og PBS-T var for harde.

For å få proteinene til å feste seg bedre ble det gjort forsøk hvor slide ble inkubert i formaldehyd i varierende tid for å crosslinke proteinene til overflaten og dermed danne kovalente bindinger i stedet for hydrofobiske (17, 18). Det var også mislykket. Dermed ble det bestemt å ikke bruke mer tid på denne sliden selv om den ga en lav egenfluorescens. Det er også mulig å prøve andre reagenser som kan crosslinke proteiner til overflaten, et helt annet alternativ er UV-stråling. På grunn av tidspresset gikk en imidlertid tilbake til Whatman's FAST slide hvor proteinbinding ikke var noe problem, slik at det kunne arbeides videre med andre deler av metoden.

Det ble først antatt at det polyklonale antistoffet ville gi best signaler. Dette fordi polyklonale antistoffer er mer sensitive enn de monoklonale. De kan gjenkjenne flere epitoper og det er dermed større sjans for at de finner en epitop som passer. Ved polyklonale antistoff er faren for kryssreagering større, slik at antistoffet reagerer med andre molekyler enn antigenet noe som kan gi falske positive svar. De monoklonale derimot er mer spesifikke, og gjenkjenner en enkelt epitop (21). Imidlertid er det da større sjans for at epitopen ligger skjult og at det av den grunn ikke blir noen signaler. Ut fra resultatene med de antistoffene vi hadde til utprøving viser det seg imidlertid, litt uventet, at det monoklonale fra LS-Bio gir høyere signaler enn det polyklonale.

I stedet for å bruke antistoffer kan aptamerer som syntetiseres kjemisk være et alternativ, teoretisk løser de mange av antistoffenes svake sider. Når en bruker antistoffer er det en rekke forsøksbetingelser som kan gjøre at antistoffet ikke fungerer godt. For eksempel kan antistoffer bare fungere under tilnærmet fysiologiske forhold med pH etc, mens aptamerer kan modifiseres til forskjellige betingelser. Også merkingen med et signalmolekyl kan ødelegge antistoffets affinitet til antigenet. Dette er lett å unngå med aptamerer, da en kan bytte posisjon på signalmolekylet slik at det ikke er i veien for bindingssetet (29). I videre arbeid med denne metoden vil det være lurt å teste aptamerer for å se om disse kan gi en bedre sensitivitet og reproduserbarhet. Om aptamerer faktisk vil fungere bedre enn antistoffer i reverse phase mikromatriser kan ikke besvares i denne oppgaven da det ikke er prøvd ut, men teoretisk virker det lovende. Et problem med aptamerer er at de ofte er dyre å lage i større mengder (29).

Det ble utført forsøk for å finne den optimale tiden for inkubering med tyramide. Dette var vanskelig å bedømme, spesielt virket det som om reproduserbarheten var dårlig. Inkuberingstider som lå mellom femten og tjue minutter viste seg å være for lange, da enzymreaksjonen i TSA metoden gikk i metning og konsentrasjons-signalkurven var flat for alle konsentrasjoner av PSA inkludert nullprøven. Ved inkuberingstider som lå nærmere ti minutter, for eksempel 12,5, var det mulig å se en lineær kurve nesten lik den på ti minutter. Under ti minutter var det langt større spredning mellom parallellene, og dette skyldtes antakelig at arbeidet på laboratoriebenken ble mindre presist med disse korte reaksjonstidene. Til slutt valgte vi ti minutters inkuberingstid, siden denne tiden ga en god sammenheng mellom konsentrasjon av PSA i prøven og gjennomsnittlig signal. Et tilleggsproblem var at det var liten forskjell i signalintensitet mellom de forskjellige PSA konsentrasjonene. Disse lå ganske tett med forskjell i signalintensitet på bare rundt 1000 mellom blankprøven og prøven med 33,13 i PSA konsentrasjon. Sammen med spredningen mellom parallellene var det klart at det ved ukjente pasientprøver ville det være umulig å si med sikkerhet hvilke som var forhøyet og ikke. For å illustrere dette ble det laget et scatterplott (figur 13) som viser en ganske stor overlapping mellom parallellene for de forskjellige konsentrasjonene. Siden dette problemet ikke gikk å løse med å variere inkuberingstiden med tyramid ble det valgt å gå videre for å se om det var andre trinn i metoden som kunne forandres og gi større spredning mellom prøvene.

Ett forsøk som kunne vært gjort for å forbedre konsentrasjons-signalkurven og minske spredningen er bruk av andre reporter-molekyler enn fluorokromet Alexa 647. Fluorokromer av denne typen er svært lysfølsomme og avbleker fort (30). Selv om det ble forsøkt å beskytte prøvene mot lys kan dette ikke unngås helt, og grad av avblekning kan være en del av årsaken til dårlige paralleller. Løsningen på dette kan være å ta i bruk Quantum dots (Qdots). Qdots er svært fotostabile og påvirkes ikke av lys som for eksempel fluorokromet Alexa 647. Det var imidlertid ikke Qdots tilgjengelig i forbindelse med denne oppgaven. Det er også en mulighet å prøve deteksjon med flere antistoffer samtidig, som er rettet mot forskjellige epitoper. Da de monoklonale antistoffene ble handlet inn var det kun Hytest som anga hvilken epitop antistoffet var rettet mot. Ved andre antistoffer som ble vurdert for innkjøp inkludert det monoklonale fra LSbio, var det ikke mulig å vite hvilken epitop de var rettet mot. Hvis dette skal prøves må det antakelig skaffes flere forskjellige antistoffer som testes i forskjellige kombinasjoner for å se om signalet forsterkes. Et annet viktig spørsmål er om det er mulig å komme vekk fra amplifisering, siden dette innfører en usikkerhet som er vanskelig å vurdere. En ting som kunne prøves er å se på mulighetene til å kunne konjugere Qdots til antistoffer for en direkte deteksjon (41).

Tilslutt ble det utført et forsøk på å optimalisere antistoff fortynningen. Antistoffet ble fortynnet i 1:100, 1:500 og 1:1000. På grunn av at dette ble utført bare en gang var det vanskelig å trekke noen konklusjon om hvilken av disse fortynningene som er den optimale. Det ville vært interessant å fortynne antistoffet videre for å se hvilke resultater dette ga, og forsøke enda flere alternative antistoffer. Tidligere i diskusjonen ble det påpekt at aptamerer kan være et bedre alternativ enn antistoffer. Ved aptamerer slipper en å optimalisere antistoff fortynningen da disse lages av kjemikalier in vitro slik at batch variasjonene er mye mindre enn ved antistoffer som dannes in vivo i forsøksdyr (29).

5. Konklusjon

Det har i denne oppgaven blitt bevist at metoden fungerer til en viss grad. De nåværende resultatene viser en lineær kurve for gjennomsnittsverdiene av signal for hver PSA-konsentrasjon, men metoden er ikke presis nok. På dette tidspunktet er det ikke mulig å se forskjell på prøver med forhøyede PSA konsentrasjon og prøver med PSA konsentrasjon i normalområdet. Den dynamiske rangen må forbedres ved å minske egenfluorescensen og få sterkere prøvesignaler. TSA amplifiseringen medfører i denne sammenhengen en usikkerhet som gjør det vanskelig å vurdere signalene. Det er viktig å finne en metode som kan detektere signalene uten hjelp av amplifiseringsmetoder.

Metoder som kan gjøre dette mulig er bruk av flere antistoffer som er rettet mot forskjellige epitoper i en kombinasjon med for eksempel Quantum dots. En kan også prøve å bytte ut antistoffene med aptamerer. Aptamererne kan øke sensitiviteten og forhindre kryssbindinger slik at reproduserbarheten blir bedre.

Tiden ble knapp under utførelse av oppgaven og det ble ikke tid til å prøve disse løsningene som ut i fra litteraturen virker lovende.

6. Referanser

1. Dufva M. Introduction to microarray technology. *Methods Mol Biol.* 2009;529:1-22.
2. Wilkes T, Laux H, Foy CA. Microarray data quality - review of current developments. *OMICS.* 2007;11(1):1-13.
3. Hoopes L. Genetic Diagnosis: DNA Microarrays and Cancer. *Nature Education*; 2008 [cited 2011 9/2]; Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-diagnosis-dna-microarrays-and-cancer-1017>.
4. Microarray history. Microarray centre University Health Network; 2010 [cited 2011 8/2]; Available from: <http://www.microarrays.ca/about/history.html>.
5. Babu MM. An Introduction to Microarray Data Analysis. [cited 2011 10/2]; Available from: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/microarray/chapter-final.pdf>.
6. Aitman T. Genetics and Genomics. Imperial College London; 2011 [cited 2011 10/2]; Available from: <http://www1.imperial.ac.uk/medicine/research/researchthemes/geneticsgenomics/>.
7. Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, Collins PJ, Chu TM, Bao W, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nat Biotechnol.* 2006 Sep;24(9):1140-50.
8. Kapur A, Dworkin P. Affymetrix and Applied Biosystems Enter into Licensing Agreement. Life Technologies corporation 2005 [cited 2011 23/3]; Available from: <http://ir.lifetechnologies.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=540321>.
9. About Affymetrix. Affymetrix; 2009 [cited 24/3 2011]; Available from: http://www.affymetrix.com/estore/about_affymetrix/index.affx?category=34003&categoryIdClicked=34003&rootCategoryId=34003&navMode=34003&aId=aboutNav.
10. Aguilar-Mahecha A, Cantin C, O'Connor-McCourt M, Nantel A, Basik M. Development of reverse phase protein microarrays for the validation of clusterin, a mid-abundant blood biomarker. *Proteome Sci.* 2009;7:15.
11. Jaras K, Ressine A, Nilsson E, Malm J, Marko-Varga G, Lilja H, et al. Reverse-phase versus sandwich antibody microarray, technical comparison from a clinical perspective. *Anal Chem.* 2007 Aug 1;79(15):5817-25.
12. Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, Lu Y, Fishman D, Espina V, et al. Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Apr;4(4):346-55.
13. Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):611-33.
14. Kersten B, Wanker EE, Hoheisel JD, Angenendt P. Multiplex approaches in protein microarray technology. *Expert Rev Proteomics.* 2005 Aug;2(4):499-510.
15. Barbulovic-Nad I, Lucente M, Sun Y, Zhang M, Wheeler AR, Bussmann M. Bio-microarray fabrication techniques--a review. *Crit Rev Biotechnol.* 2006 Oct-Dec;26(4):237-59.
16. Products - Microarray Printing - Stealth Technology. Arrayit Corporation; 1993-2010 [cited 2010 10/11]; Available from: http://arrayit.com/Products/Microarray_Printing/Microarray_Pins_Stealth_Techno/microarray_pins_stealth_techno.html.
17. Nitrocellulose coating. Schott Nexterion; 2011 [cited 2011 3/4]; Available from: http://www.schott.com/nexterion/english/products/coated_slides/nitrocellulose/nitrocellulose.html.

18. Chemistry of Crosslinking. Thermo Fisher Scientific; 2011 [cited 2011 28/3]; Available from: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C46E01232683>.
19. Klockenbusch C, Kast J. Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:927585.
20. Talapatra A, Rouse R, Hardiman G. Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics.* 2002 Jul;3(4):527-36.
21. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3rd ed. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke; 2006. 400 s.
22. Rao C. Immunology. 2nd ed. Oxford: Alpha Science; 2006. 656 pp.
23. Glick B, Pasternak J, Patten C. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 4th ed. Washington: ASM Press; 2009. 1000 pp.
24. Burdick JS, Chung E, Tanner G, Sun M, Paciga JE, Cheng JQ, et al. Treatment of Menetrier's disease with a monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor. *N Engl J Med.* 2000 Dec 7;343(23):1697-701.
25. Neuroblastoma - Childhood. American Society of Clinical Oncology (ASCO); 2010 [cited 2011 6/4]; Available from: <http://www.cancer.net/patient/Cancer+Types/Neuroblastoma+-+Childhood?sectionTitle=Treatment>.
26. Karnik R. Monoclonal Antibodies. [cited 2011 1/4]; Available from: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/molbio/MolStudents/01rakarnik/mab.html>.
27. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 2005;46(3):258-68.
28. Antibody Microarray Limitations. Molecular Station; 2005-2011 [cited 2011 3/2]; Available from: <http://www.molecularstation.com/protein-microarrays/antibody-microarray-limitations/>.
29. Kuk J, Lee E, Jang B, Lam J. Aptamer Advantages. University of Toronto; [cited 2011 24/4]; Available from: <http://bio349.biota.utoronto.ca/20069/bio349jerry1/aptameradvantages.html>.
30. Ness JM, Akhtar RS, Latham CB, Roth KA. Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. *J Histochem Cytochem.* 2003 Aug;51(8):981-7.
31. Tyramide Signal Amplification Kits. Invitrogen; 2011 [cited 2010 5/12]; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp20911.pdf>.
32. Endogenous Avidin + Biotin Blocking System (ab3387). Abcam; 1998-2011 [cited 2011 22/3]; Available from: <http://www.abcam.com/Endogenous-Avidin-Biotin-Blocking-System-ab3387.html>.
33. Blocking Endogenous Biotin. IHCWORLD; 2011 [cited 2011 20/4]; Available from: http://www.ihcworld.com/technical_tips/biotin_tips.htm.
34. Sale J. Spectral imaging and Quantum Dots. MRC Laboratory of Molecular Biology; [cited 2011 30/3]; Available from: <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/jes/pages/spectralimaging.html>.
35. Diamandis EP. Prostate-specific Antigen: Its Usefulness in Clinical Medicine. *Trends Endocrinol Metab.* 1998 Oct 1;9(8):310-6.
36. Åsberg A, Stakkestad JA, biokjemi Nffm. Brukerhåndbok i klinisk kjemi. 2nd ed: Akademisk fagforl.; 2004. 605 s.
37. Human Kallikrein 3/PSA Immunoassay. R&D systems Inc; 2010 [cited 2011 6/4]; Available from: <http://www.rndsystems.com/pdf/DKK300.pdf>.
38. Prostate-Specific Antigen (PSA) Test. National Cancer Institute 2009 [cited 2011 8/3]; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/PSA>.

39. FAQ - Questions around Microarraying. Schott Nexterion; 2011 [cited 2011 30/3]; Available from: <http://www.schott.com/nexterion/english/application/faq/microarraying.html>.
40. Walther M. The FAST Guide to Protein Microarrays. Whatman; 2007 [cited 2011 9/4]; Available from: <http://www.whatman.com/References/FAST%20Guide%20to%20Protein%20Microarrays.pdf>
41. Jaiswal JK, Goldman ER, Mattoussi H, Simon SM. Use of quantum dots for live cell imaging. Nat Methods. 2004 Oct;1(1):73-8.

Bildet på forsiden er basert på figur fra:

Tyramide Signal Amplification Kits. Invitrogen; 2011 [cited 2010 5/12]; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp20911.pdf>.

Vedlegg 1: Reagensløsninger

PBS buffer:

1 x PBS: 1 tablett per 100 ml destillert vann

0,01 % Tween 20 i PBS (Vaske buffer):

10 ml PBS med 100 µl Tween 20.

Tyramid stockløsning:

Tilsetter 150 µl DMSO til røret med tyramid i tørrstoff. Vend røret for blanding, alikvoter ut og lagre på -20 °C og beskyttet fra lys.

TSA blokk:

1 % løsning (10 mg/ml) i PBS.

HRP Konjugat:

Rekonstituerte HRP konjugatet i 200 µl PBS.

Amplifikasjons buffer:

Stockløsning: amplifikasjon buffer med 0,0015 % H₂O₂

1. 200 µl Amplifikasjon buffer tilsettes 1 µl 30 % H₂O₂
2. 100 µl Amplifikasjon buffer tilsettes 1 µl av løsning 1

Rekonstituering av Polyklonat antistoff (R&D system):

Løses i 20 MM TRIS (Merck, Katalognummer: 648309) og 150 MM NaCl (Merck, Katalognummer: 567440)

Det ble veid ut 0,606 g TRIS og 1,71 g NaCl. I tillegg skulle det være 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich, Katalognummer: 85040) slik at det ble veid ut 0,1 g. Alt ble løst sammen i 100 ml dH₂O.

Vedlegg 2: Gjennomsnitt av egenfluorescens

Tabell 2-1: Gjennomsnittet av ti målinger gjort av egenfluorescensen på FAST slide ved PMT 100, 150 og 190

	PMT 100	PMT 150	PMT 190
1.	564	3625	30633
2.	653	4018	40421
3.	609	3450	43769
4.	595	3407	44220
5.	515	4203	34246
6.	263	3136	31849
7.	585	4353	36618
8.	638	3434	35904
9.	273	4405	32643
10.	651	3687	27296
Gjennomsnitt	535	3772	35760

Tabell 2-2: Gjennomsnittet av ti målinger gjort av egenfluorescensen på Pathplus slide ved PMT 100, 150 og 190

	PMT 100	PMT 150	PMT 190
1.	9	4	47
2.	7	13	5
3.	8	8	22
4.	6	13	21
5.	7	22	40
6.	4	6	32
7.	8	8	16
8.	5	12	5
9.	5	10	6
10.	7	16	54
Gjennomsnitt	7	11	25

Tabell 2-3: Gjennomsnittet av ti målinger gjort av egenfluorescensen på NC-C slide ved PMT 100, 150 og 190

	PMT 100	PMT 150	PMT 190
1.	672	14648	Metning
2.	1158	25136	Metning
3.	763	15613	Metning
4.	830	12411	Metning
5.	1113	14362	Metning
6.	659	23253	Metning
7.	1182	11882	Metning
8.	1166	22292	Metning
9.	1224	23644	Metning
10.	708	16027	Metning
Gjennomsnitt	948	17927	Metning

Tabell 2-4: Gjennomsnittet av ti målinger gjort av egenfluorescensen på NC-N slide ved PMT 100, 150 og 190

	PMT 100	PMT 150	PMT 190
1.	367	7728	Metning
2.	525	10825	Metning
3.	398	8015	Metning
4.	334	7942	Metning
5.	574	11094	Metning
6.	367	6792	Metning
7.	520	10978	Metning
8.	449	10470	Metning
9.	586	11385	Metning
10.	423	9234	Metning
Gjennomsnitt	454	9446	Metning

Vedlegg 3: Rådata polyklonalt og monoklonalt antistoff

Tabell 3-1: Rådata fra polyklonalt antistoff. Brukt i sammenlikningen mellom monoklonalt og polyklonalt antistoff.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	5855	66,25	7359
0	6563	66,25	7387
0	6374	132,5	6620
0	6813	132,5	6488
0	6635	132,5	6744
0	7189	132,5	7264
1,04	6472	132,5	6778
1,04	6622	265	6205
1,04	7111	265	6447
1,04	7284	265	6907
1,04	7532	265	7413
1,04	7413	265	7417
2,07	6761	530	6241
2,07	6390	530	6943
2,07	6840	530	6758
2,07	7258	530	7181
2,07	7394	530	7323
2,07	7007	1060	6115
4,14	6470	1060	6541
4,14	6717	1060	7346
4,14	6851	1060	7000
4,14	6624	1060	7343
4,14	7276		
4,14	7442		
8,28	6706		
8,28	7171		
8,28	7178		
8,28	7291		
16,56	6877		
16,56	6562		
16,56	7467		
16,56	6925		
33,13	6498		
33,13	7116		
33,13	6718		
33,13	7372		
33,13	7472		
66,25	6582		
66,25	6840		
66,25	6399		

Tabell 3-2: Rådata fra monoklonalt antistoff. Brukt i sammenlikningen mellom monoklonalt og polyklonalt antistoff.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	16781	66,25	17823
0	18134	66,25	16817
0	16802	132,5	19290
0	15829	132,5	19654
1,04	16161	132,5	19964
1,04	14721	132,5	20399
1,04	17135	132,5	18330
1,04	14878	265	16468
1,04	14739	265	20460
1,04	16042	265	22185
2,07	17941	265	19525
2,07	16054	265	20253
2,07	16014	530	16122
2,07	15068	530	20744
2,07	14543	530	19029
2,07	16878	530	19808
4,14	20433	530	17818
4,14	17565	1060	19240
4,14	17849	1060	18168
4,14	17853	1060	24532
4,14	16962	1060	20118
4,14	18335	1060	19172
8,28	14860		
8,28	17478		
8,28	17220		
8,28	17153		
8,28	16213		
16,56	17116		
16,56	24366		
16,56	19655		
16,56	22766		
16,56	19958		
33,13	14847		
33,13	20263		
33,13	18279		
33,13	16699		
33,13	17614		
66,25	19111		
66,25	16119		
66,25	18340		

Tabell 3-3: Sammenlikner spotintensiteten mellom gjennomsnittet til parallellene ved de forskjellige PSA konsentrasjonene. Gjennomsnitt beregnet ut fra rådata i tabell 3-1 og 3-2.

PSA konsentrasjon	Polyklonalt	Monoklonalt
0	6572	16741
1,04	7072	16126
2,07	6942	15838
4,14	6897	17448
8,28	7087	17016
16,56	6958	20937
33,13	7035	18657
66,25	6913	16792
132,5	6779	19093
265	6878	19454
530	6889	19302
1060	6869	20256

Vedlegg 4: Rådata for tyramidinkuberingstid tjue minutter

Tabell 4-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på tjue minutter.

PSA konsentrasjon	Median
0	19455
0	19822
0	15967
0	17258
0	15428
0	17255
1,04	16652
1,04	15130
1,04	17834
1,04	17139
1,04	16966
1,04	23176
2,07	16975
2,07	16227
2,07	15628
2,07	19514
2,07	17016
4,14	18611
4,14	15541
4,14	16876
4,14	14163
4,14	18262
8,28	17419
8,28	15425
8,28	16109
8,28	15573
16,56	21054
16,56	22863
16,56	16324
16,56	15168
33,13	16823
33,13	18549
33,13	18074
33,13	15766
66,25	17686
66,25	19540
66,25	14551
66,25	14981
66,25	17536

PSA konsentrasjon	Median
132,5	22151
132,5	17707
132,5	16996
132,5	19559
132,5	14435
265	18635
265	19345
265	19363
265	20103
265	21098
530	19088
530	18527
530	15695
530	17540
530	16451
1060	19895
1060	20308
1060	25218
1060	17342
1060	19884

Tabell 4-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 4-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	17531	1787
1,04	17816	2774
2,07	17072	1481
4,14	16691	1864
8,28	16132	907
16,56	18852	3692
33,13	17303	1257
66,25	16859	2073
132,5	18170	2886
265	19709	934
530	17460	2073
1060	20529	2873

Vedlegg 5: Rådata for tyramidinkuberingstid ti minutter

Tabell 5-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på ti minutter.

PSA konsentrasjon	Median
0	10065
0	10596
0	10191
0	10845
0	10332
0	10855
1,04	10400
1,04	10640
1,04	11618
1,04	11288
1,04	11962
2,07	11071
2,07	10477
2,07	10839
2,07	11151
2,07	10931
4,14	10942
4,14	10602
4,14	10846
4,14	11260
4,14	12391
8,28	10871
8,28	11239
8,28	11695
8,28	11413
8,28	12436
16,56	12287
16,56	11282
16,56	12727
16,56	11128
33,13	12073
33,13	11224
33,13	12553
33,13	12250
66,25	11641
66,25	12322
66,25	10892
66,25	11964
66,25	12822

PSA konsentrasjon	Median
132,5	12180
132,5	11204
132,5	12167
132,5	12414
132,5	11508
265	10806
265	11248
265	12041
265	12551
265	12958
530	10737
530	11888
530	11483
530	12064
530	12619
1060	10673
1060	11034
1060	12951
1060	11742
1060	12601

Tabell 5-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 5-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	10481	336
1,04	11182	655
2,07	10894	263
4,14	11208	702
8,28	11531	588
16,56	11856	775
33,13	12025	570
66,25	11928	727
132,5	11895	513
265	11921	892
530	11758	727
1060	11800	978

Vedlegg 6: Rådata for tyramidinkuberingstid ett minutt

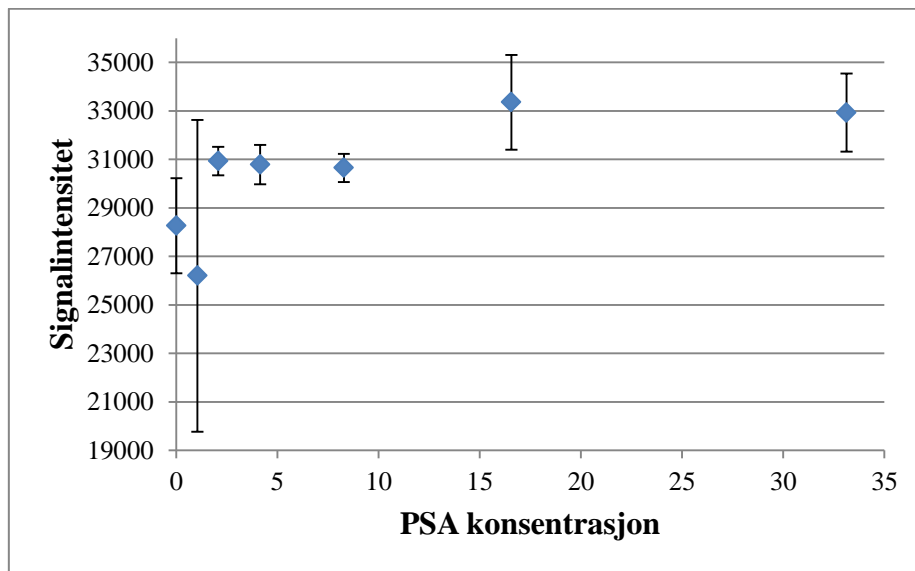
Tabell 6-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på ett minutt.

PSA konsentrasjon	Median
0	24768
0	29273
0	29336
0	28998
0	28940
1,04	21694
1,04	21581
1,04	22258
1,04	32027
1,04	23153
1,04	36501
2,07	30340
2,07	31208
2,07	30578
2,07	31621
4,14	30156
4,14	30763
4,14	31934
4,14	30281
8,28	30561
8,28	30515
8,28	30090
8,28	30458
8,28	31633
16,56	32966
16,56	35125
16,56	30550
16,56	35319
16,56	32831
33,13	31161
33,13	31433
33,13	34005
33,13	33174
33,13	34879
66,25	32935
66,25	35887
66,25	32740
66,25	35228
66,25	35084

PSA konsentrasjon	Median
132,5	39630
132,5	31647
132,5	31950
132,5	33199
132,5	32727
265	31110
265	31350
265	32082
265	33947
265	37955
530	33847
530	32538
530	31672
530	32595
530	35853
1060	31416
1060	33045
1060	35845
1060	31911
1060	32760

Tabell 6-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 6-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	28263	1961
1,04	26202	6427
2,07	30937	585
4,14	30784	810
8,28	30651	579
16,56	33358	1955
33,13	32930,4	1611
66,25	34375	1437
132,5	33831	3300
265	33289	2836
530	33301	1437
1060	32995	1721



Figur 6-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved ett minutt inkuberingstid med tyramid. Scannet på 190 PMT.

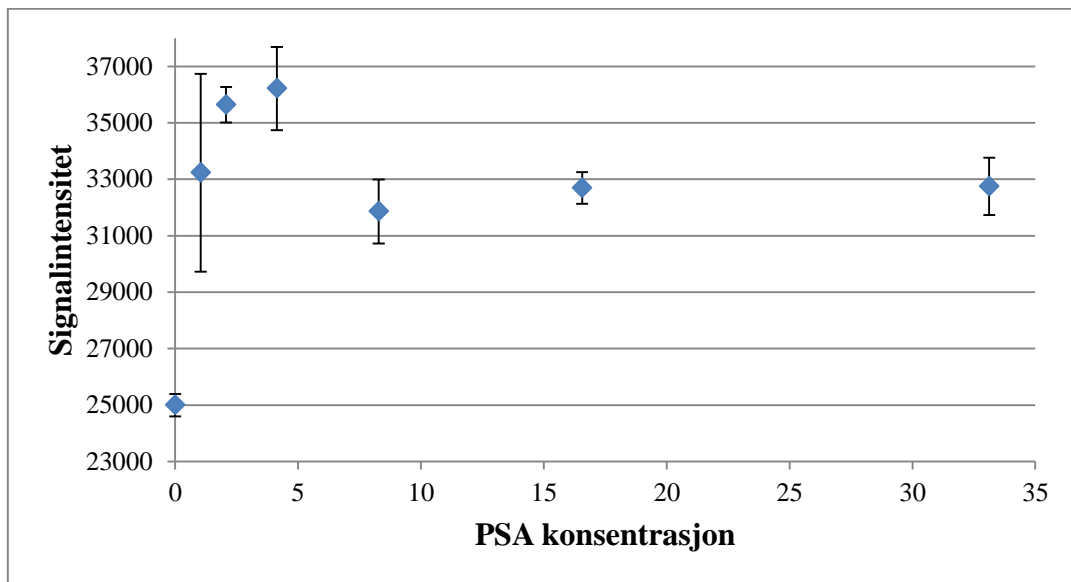
Vedlegg 7: Rådata for tyramidinkuberingstid tre minutter

Tabell 7-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på tre minutter.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	24872	66,25	33635
0	24679	66,25	32889
0	24550	66,25	34727
0	25184	66,25	33387
0	25055	132,5	37406
0	25645	132,5	34396
1,04	26776	132,5	34405
1,04	32272	132,5	34963
1,04	34656	132,5	34798
1,04	33601	265	33165
1,04	35471	265	32603
1,04	36619	265	32487
2,07	35587	265	33013
2,07	35848	265	37708
2,07	35650	530	34960
2,07	35093	530	34661
2,07	34958	530	34466
2,07	36713	530	34218
4,14	36991	530	34997
4,14	35990	1060	35744
4,14	35483	1060	34276
4,14	35491	1060	36004
4,14	34587	1060	34997
4,14	38769	1060	34564
8,28	30863		
8,28	31497		
8,28	32360		
8,28	30990		
8,28	33599		
16,56	32317		
16,56	32663		
16,56	32259		
16,56	32576		
16,56	33647		
33,13	32892		
33,13	32287		
33,13	31811		
33,13	32324		
33,13	34437		
66,25	32512		

Tabell 7-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 7-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	24998	394
1,04	33233	3500
2,07	35642	626
4,14	36219	1476
8,28	31862	1135
16,56	32692	560
33,13	32750,2	1018
66	33430	846
132,5	35194	1261
265	33795	2205
530	34660	846
1060	35117	743



Figur7-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved tre minutters inkuberingstid med tyramid. Scannet på 190 PMT.

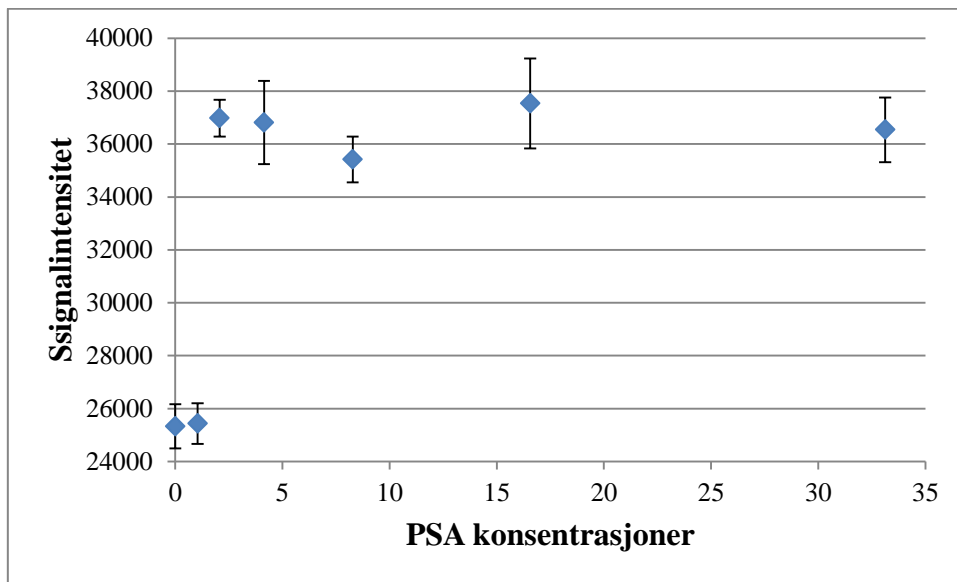
Vedlegg 8: Rådata for tyramidinkuberingstid fem minutter

Tabell 8-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på fem minutter.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	25363	132,5	41214
0	24336	132,5	36414
0	25162	132,5	36402
0	24840	132,5	39525
0	25478	132,5	37774
0	26808	265	37700
1,04	24599	265	35200
1,04	24886	265	36661
1,04	25874	265	38688
1,04	26510	265	39005
1,04	25926	530	39995
1,04	24824	530	40558
2,07	37709	530	36956
2,07	36122	530	38841
2,07	36361	530	39370
2,07	37285	1060	34997
2,07	37418	1060	36674
4,14	37870	1060	41582
4,14	34542	1060	36627
4,14	36219	1060	38115
4,14	36806		
4,14	38616		
8,28	34426		
8,28	34969		
8,28	36253		
8,28	36031		
16,56	36450		
16,56	39733		
16,56	37987		
16,56	35958		
33,13	34602		
33,13	36174		
33,13	36857		
33,13	37633		
33,13	37422		
66,25	36575		
66,25	39819		
66,25	36735		
66,25	37303		
66,25	38990		

Tabell 8-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 8-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	25331	832
1,04	25437	770
2,07	36979	696
4,14	36811	1571
8,28	35420	868
16,56	37532	1703
33,13	36537,6	1221
66,25	37884	1444
132,25	38266	2087
265	37451	1557
530	39144	1444
1060	37599	2485



Figur 8-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til de PSA konsentrasjonene 0 – 33,13 med standardavvik ved fem minutters inkuberingstid med tyramid. Scannet på 190 PMT.

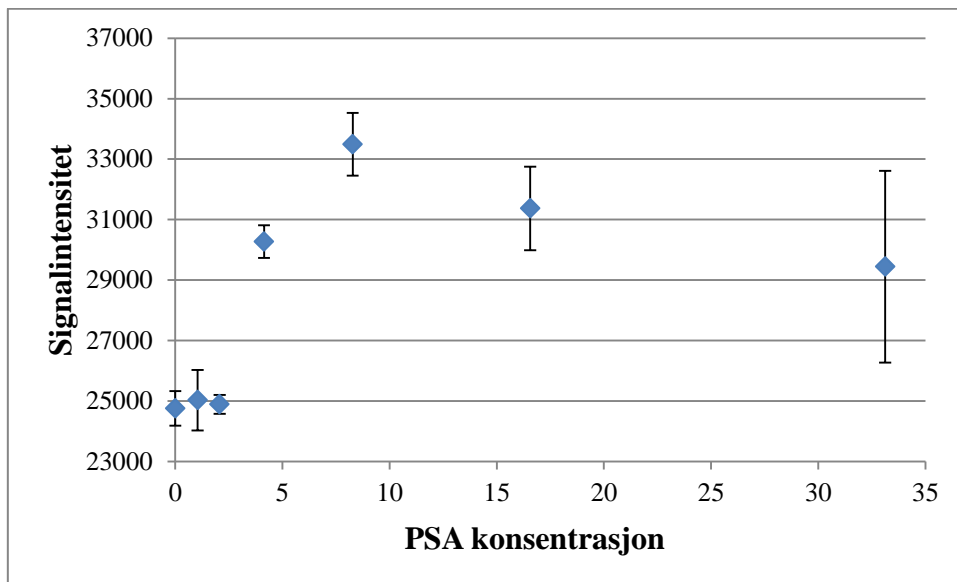
Vedlegg 9: Rådata for tyramidinkuberingstid sju minutter

Tabell 9-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på sju minutter.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	24392	66,25	31861
0	24744	66,25	32164
0	24048	66,25	30754
0	25740	132,5	35705
0	24814	132,5	33832
0	24806	132,5	34204
1,04	25397	132,5	33781
1,04	25569	132,5	33358
1,04	25174	265	31974
1,04	26314	265	32990
1,04	24089	265	33536
1,04	23613	265	32556
2,07	25297	265	32137
2,07	24365	530	27250
2,07	24946	1060	34398
2,07	25015	1060	36512
2,07	24740	1060	35321
2,07	24988	1060	34050
4,14	31281	1060	33738
4,14	29920		
4,14	30361		
4,14	29809		
4,14	29981		
4,14	30273		
8,28	33641		
8,28	34459		
8,28	32796		
8,28	34458		
8,28	32105		
16,56	31652		
16,56	33391		
16,56	29727		
16,56	30507		
16,56	31565		
33,13	25199		
33,13	26889		
33,13	31493		
33,13	31397		
33,13	32229		
66,25	33164		
66,25	33797		

Tabell 9-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 9-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	24757	567
1,04	25026	999
2,07	24892	314
4,14	30271	538
8,28	33492	1037
16,56	31368	1383
33,13	29441,4	3175
66,25	32348	1181
132,25	34176	906
265	32639	638
530	27250	1181
1060	34804	1124



Figur 9-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved sju minutter inkuberingsstid med tyramid. Scannet på 190 PMT.

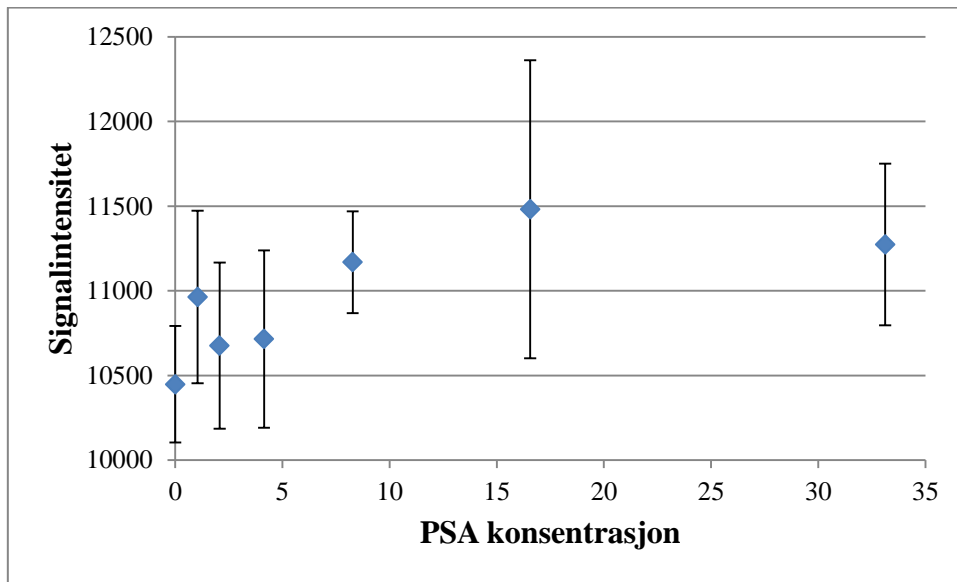
Vedlegg 10: Rådata for tyramidinkuberingstid 12,5 minutt

Tabell 10-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på 12,5 minutt.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	10238	66,25	11009
0	10755	66,25	10738
0	10116	66,25	11097
0	10891	132,5	12168
0	10092	132,5	11276
0	10594	132,5	11062
1,04	10876	132,5	12200
1,04	10459	132,5	10979
1,04	11510	265	10891
1,04	10341	265	10906
1,04	11046	265	11587
1,04	11550	265	12091
2,07	11409	265	11836
2,07	10474	530	11116
2,07	10564	530	12060
2,07	10684	530	11133
2,07	10973	530	11750
2,07	9952	530	11250
4,14	11124	1060	10820
4,14	10255	1060	11596
4,14	10572	1060	12455
4,14	10269	1060	11213
4,14	10502	1060	11714
4,14	11567		
8,28	11167		
8,28	11373		
8,28	11253		
8,28	10657		
8,28	11393		
16,56	10978		
16,56	12562		
16,56	10851		
16,56	12305		
16,56	10708		
33,13	10927		
33,13	11985		
33,13	10922		
33,13	11548		
33,13	10982		
66,25	11624		
66,25	12229		

Tabell 10-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 10-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	10448	344
1,04	10964	510
2,07	10676	491
4,14	10715	523
8,28	11169	300
16,56	11481	880
33,13	11272,8	477
66,25	11339	592
132,25	11537	601
265	11462	545
530	11462	592
1060	11560	611



Figur 10-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved 12,5 minutt inkuberingstid med tyramid. Scannet på 120 PMT.

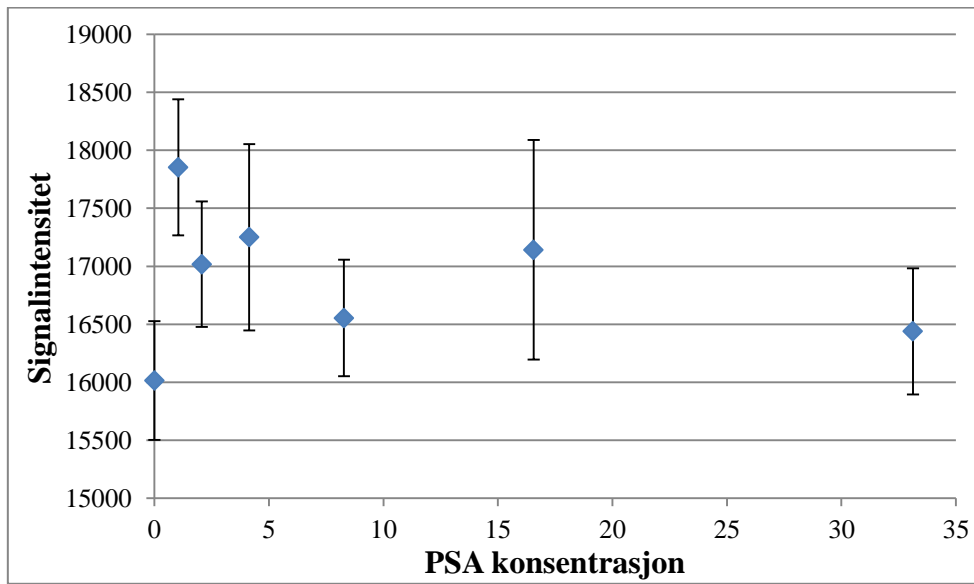
Vedlegg 11: Rådata for tyramidinkuberingstid femten minutter

Tabell 11-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på femten minutter.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	16894	66,25	16329
0	16099	66,25	16175
0	15681	66,25	17242
0	15365	132,5	18359
0	15999	132,5	18791
0	16045	132,5	17296
1,04	17821	132,5	17372
1,04	17521	132,5	16361
1,04	18174	265	16818
1,04	17008	265	17242
1,04	17852	265	16342
1,04	18742	265	16807
2,07	17190	265	17190
2,07	17181	530	18401
2,07	17502	530	16307
2,07	17081	530	16947
2,07	17196	530	16598
2,07	15951	530	16553
4,14	18204	1060	17198
4,14	17136	1060	17258
4,14	17055	1060	20746
4,14	16065	1060	16927
4,14	16922	1060	16967
4,14	18121		
8,28	17254		
8,28	16252		
8,28	16829		
8,28	15963		
8,28	16471		
16,56	17597		
16,56	17273		
16,56	16519		
16,56	18380		
16,56	15940		
33,13	17083		
33,13	16544		
33,13	15604		
33,13	16649		
33,13	16314		
66,25	16665		
66,25	17828		

Tabell 11-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 11-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	16014	513
1,04	17853	586
2,07	17017	541
4,14	17251	804
8,28	16554	503
16,56	17142	947
33,13	16438,8	544
66,25	16848	684
132,25	17636	958
265	16880	363
530	16961	684
1060	17819	1642



Figur 11-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved femten minutter inkuberingstid med tyramid. Scannet på 120 PMT.

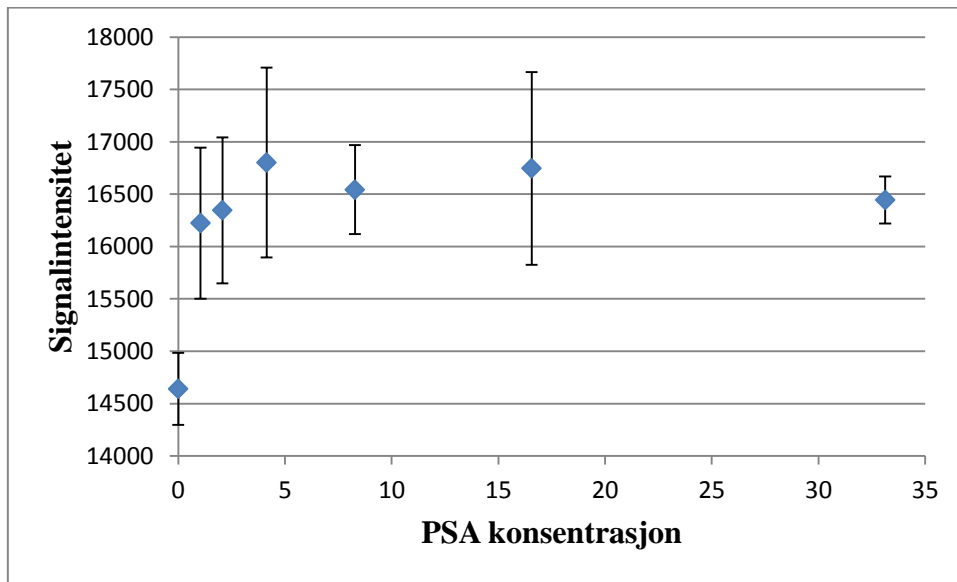
Vedlegg 12: Rådata for tyramidinkuberingstid 17,5 minutt

Tabell 12-1: Rådata for PSA konsentrasjonene med en tyramidinkuberingstid på 17,5 minutt.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	15028	66,25	16087
0	14835	66,25	16432
0	14710	66,25	16509
0	14804	132,5	19465
0	14385	132,5	16768
0	14088	132,5	16441
1,04	17012	132,5	16709
1,04	16242	132,5	16218
1,04	17180	265	16993
1,04	15491	265	16574
1,04	15700	265	17334
1,04	15716	265	16692
2,07	17706	265	16991
2,07	16308	530	16804
2,07	16062	530	17561
2,07	15758	530	15988
2,07	15956	530	16329
2,07	16284	530	16501
4,14	18469	1060	16969
4,14	16250	1060	17230
4,14	16554	1060	17854
4,14	16104	1060	16028
4,14	16242	1060	16010
4,14	17197		
8,28	17046		
8,28	16941		
8,28	16370		
8,28	16092		
8,28	16268		
16,56	16493		
16,56	18279		
16,56	16084		
16,56	16852		
16,56	16022		
33,13	16469		
33,13	16764		
33,13	16318		
33,13	16164		
33,13	16510		
66,25	17304		
66,25	18971		

Tabell 12-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 12-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	14642	344
1,04	16224	722
2,07	16346	698
4,14	16803	906
8,28	16543	424
16,56	16746	920
33,13	16445	225
66,25	17061	1157
132,25	17120	1329
265	16917	297
530	16637	1157
1060	16818	797



Figur 12-1: Gjennomsnittet av signalintensiteten til PSA konsentrasjonene 0-33,13 med standardavvik ved 17,5 minutt inkuberingstid med tyramid. Scannet på 120 PMT.

Vedlegg 13: Rådata for antistoff fortynning 1:500

Tabell 13-1: Rådata for PSA konsentrasjonene ved antistoff fortynning 1:500.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	31390	132,5	31219
0	29433	132,5	32576
0	32496	132,5	32866
0	30313	265	33890
1,04	32712	265	32135
1,04	31140	265	30295
1,04	30025	265	32167
1,04	31797	265	30687
1,04	30948	530	34454
1,04	30294	530	30212
2,07	30792	530	32100
2,07	30779	530	30951
2,07	31502	530	32661
2,07	31884	1060	34324
4,14	31655	1060	31988
4,14	31930	1060	30957
4,14	30445	1060	31702
4,14	34760	1060	31757
4,14	31805		
4,14	30672		
8,28	33710		
8,28	31039		
8,28	30573		
8,28	33193		
8,28	32741		
16,56	34936		
16,56	30280		
16,56	33668		
16,56	31140		
16,56	34457		
33,13	33393		
33,13	35002		
33,13	33122		
33,13	33210		
66,25	31035		
66,25	30324		
66,25	34261		
66,25	33688		
66,25	31659		
132,5	31782		
132,5	32307		

Tabell 13-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 13-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	30908	1327
1,04	31153	990
2,07	31239	547
4,14	31878	1541
8,28	32251	1373
16,56	32896	2069
33,13	33681,75	887
66,25	32193	1705
132,25	32150	656
265	31835	1424
530	32076	1705
1060	32146	1278

Vedlegg 14: Rådata for antistoff fortyning 1:1000

Tabell 14-1: Rådata for PSA konsentrasjonene ved antistoff fortyning 1:1000.

PSA konsentrasjon	Median	PSA konsentrasjon	Median
0	40716	66,25	43007
0	41133	132,5	42912
0	41181	132,5	43953
0	41397	132,5	43276
0	43459	132,5	44133
0	39295	132,5	45048
1,04	42981	265	44356
1,04	43078	265	45185
1,04	41014	265	42868
1,04	42773	265	43365
1,04	43579	265	45770
1,04	40399	530	45274
2,07	43214	530	44165
2,07	44428	530	44176
2,07	42008	530	43652
2,07	41865	530	41157
2,07	40675	1060	42208
4,14	44882	1060	43094
4,14	44082	1060	40917
4,14	41494	1060	43916
4,14	44170	1060	44295
4,14	41084		
4,14	41056		
8,28	44944		
8,28	42689		
8,28	41069		
8,28	44575		
8,28	42261		
16,56	44844		
16,56	43217		
16,56	45099		
16,56	40570		
16,56	45383		
33,13	45176		
33,13	43733		
33,13	44891		
33,13	43101		
66,25	43111		
66,25	42618		
66,25	43212		
66,25	44718		

Tabell 14-2: Gjennomsnitt og standardavvik (SD) beregnet ut i fra rådata i tabell 14-1.

PSA konsentrasjon	Gjennomsnitt	SD
0	41197	1342
1,04	42304	1280
2,07	42438	1430
4,14	42795	1763
8,28	43108	1626
16,56	43823	2003
33,13	44225,25	975
66,25	43333	806
132,25	43864	827
265	44309	1212
530	43685	806
1060	42886	1363