

Kandidatnummer 10009 & 10019

# Optimalisering av metode for påvisning av fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri

BI301305 Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag  
Veileder: Bente Alm & Yanran Cao

Mai 2019



Kandidatnummer 10009 & 10019

# Optimalisering av metode for påvisning av fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri

BI301305 Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bachelor i Bioingeniørfag  
Veileder: Bente Alm & Yanran Cao  
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



## Sammendrag

Oppgaven tar for seg optimalisering av en metode for å påvise fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri. Fagocytose er en prosess der en celle omslutter og tar opp større partikler for å deretter bryte dem ned. Dette er en viktig del av den immunologiske funksjonen til flere typer leukocytter. For å påvise fagocytose ble *pHrodo Green E. coli Bioparticles Conjugate* fra Thermofisher brukt. Konjugatet skal emitte sterkere fluorescens ved lav pH, som er optimalt ved påvisning av fagocytose. Anti-CD45 ble brukt til å få over oversikt over de ulike leukocyttopulasjonene. Anti-CD16 ble brukt for å nærmere studere de profesjonelle fagocytene. Tidligere forskning og vitenskapelige artikler om påvisning av fagocytose og overflateantigen ble brukt for å samle inn informasjon.

Basert på anbefalinger fra produsent og tidligere forsøk ble reagenser og utstyr valgt ut. Enkelte justeringer ble gjort på grunnlag av hva som var tilgjengelig. En midlertidig prosedyre ble utarbeidet og tilpasset etter hvert som ulike punkter i prosedyren ble utprøvd. Det ble observert resultater som stemte overens med at konjugatet hadde blitt fagocyttert. Disse resultatene ble forbedret ved å justere de ulike parameterene. Resultatene ble imidlertid påvirket av at fritt konjugat emitte betydelig høyere fluorescens enn forventet. Det var bare mulig å skille fritt konjugat fra antatt fagocyttert konjugat ved bruk av anti-CD45. Det ble forsøkt å benytte Trypan Blue som quencher, men dette var ikke vellykket.

Etter utprøving og tilpasning av prosedyren ble en endelig prosedyre utarbeidet. Prosedyren kan brukes for å påvise fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri, men metoden bør kontrolleres for å bekrefte at konjugatet har blitt fagocyttert.

## Forord

Denne bacheloroppgaven er utarbeidet og utført av to bioingeniørstudenter ved NTNU Ålesund. Oppgaven tar for seg utviklingen og optimaliseringen av en metode for å påvise fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri. Det ble utviklet en midlertidig prosedyre som ble testet ut og tilpasset etter hvert i forsøksfasen. Forarbeidet og det preanalytiske ble utført i semi-sterile omgivelser. Instrumentet som ble brukt var flowcytometeret BD Accuri C6 Flow Cytometer.

Arbeidet strakte seg over ca. 8 uker hvor 3 uker gikk til opplæring og forsøk, mens resten gikk til informasjonsinnhenting og litteratursøk. Disse ukene har vært svært givende. Fra planleggingsfasen til de siste justeringene på oppgaven har arbeidet vært spennende, utfordrende og læringsrikt. Vi sitter igjen med erfaringer og kunnskap som vi føler vil komme til nytte i arbeidslivet.

Oppgaven hadde ikke blitt den samme om det ikke hadde vært for den hjelpen og støtten vi har fått. Først vil vi takke Ph.D Yanran Cao for å inkludere oss i valg av oppgave innenfor flowcytometri, og for å gi oss informasjon, opplæring og støtte underveis i prosessen. Det hadde ikke vært mulig for oss å få en slik innsikt og forståelse av temaet uten hennes hjelp. Vi vil også takke Universitetslektor Bente Alm som hjalp oss i skriveprosessen, og ved å gi oss konstruktiv kritikk og tilbakemeldinger slik at oppgaven kunne presenteres best mulig. I tillegg ønsker vi å takke Overingeniør Heidi Engstrøm og Førsteamanuensis Ann-Kristin Tveten for hjelp og støtte under laboratoriearbeidet. De besvarte våre spørsmål og ga oss gode løsninger om vi fikk utfordringer underveis. Tilslutt vil vi takke hverandre for samarbeidet og for godt utført arbeid med en utfordrende og spennende oppgave.

# Innholdsfortegnelse

Figurer.....	1
Tabeller.....	2
<b>1. Innledning.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Problemstilling.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 <i>Bakgrunn for valg av oppgave.....</i>	3
1.1.2 <i>Presentasjon av problemstilling.....</i>	3
1.1.3 <i>Begrensinger i problemstillingen.....</i>	4
<b>1.2 Etikk og risikovurdering.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Teori.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 <i>Introduksjon til leukocytter.....</i>	6
1.3.2 <i>Fagocytose.....</i>	8
1.3.3 <i>Overflateantigen.....</i>	9
1.3.4 <i>Flowcytometri.....</i>	10
<b>2. Materialer og metoder.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>16</b>
2.1.1 <i>Prøvemateriale.....</i>	16
2.1.2 <i>Reagenser.....</i>	16
2.1.3 <i>Utstyr.....</i>	18
<b>2.2 Metode.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 <i>Utarbeiding av prosedyre.....</i>	20
2.2.2 <i>Rekonstituering av pHrodo Green E. coli Bioparticles Conjugate.....</i>	20
2.2.3 <i>Inkubering av fullblod med pHrodo Green E. coli Bioparticles Conjugate.....</i>	20
2.2.4 <i>Lysering.....</i>	21
2.2.5 <i>Farging av overflateantigen.....</i>	22
2.2.6 <i>Oppstart og kalibrering av BD Accuri C6 Flow Cytometer.....</i>	22
2.2.7 <i>Analysering og gating på BD Accuri C6 Flow Cytometer.....</i>	23
2.2.8 <i>Quenching ved bruk av Trypan Blue.....</i>	25
<b>2.3 Tilpasning av metode og prosedyre.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Resultater.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Test av metode.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Fargekompensering.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Volum fullblod mot volum konjugat.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 <i>Mengde fullblod.....</i>	31
3.3.2 <i>Mengde konjugat.....</i>	32
<b>3.4 Inkubering med konjugat i 37°C.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Inkubering med anti-CD45.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Inkubering med anti-CD16.....</b>	<b>36</b>
<b>3.7 Lysering av erytrocytter og vaskesteg.....</b>	<b>37</b>
<b>3.8 Test av konjugat.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9 Quenching – Trypan Blue.....</b>	<b>40</b>
3.9.1 <i>Trypan Blue som quencher.....</i>	40
3.9.2 <i>Test av Trypan Blues inkubasjonstid med konjugat.....</i>	41
<b>4. Diskusjon.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Resultater og tilpasninger.....</b>	<b>43</b>
4.1.1 <i>Test av metode.....</i>	43
4.1.2 <i>Fargekompensering.....</i>	44
4.1.3 <i>Volum fullblod mot volum konjugat.....</i>	45
4.1.4 <i>Inkubering med konjugat.....</i>	46

4.1.5	<i>Inkubering med anti-CD45</i> .....	47
4.1.6	<i>Inkubering med anti-CD16</i> .....	48
<b>4.2</b>	<b>Utfordringer og feilkilder</b> .....	<b>49</b>
4.2.1	<i>Lysering av erythrocytter og vaskesteg</i> .....	49
4.2.2	<i>Test av konjugat</i> .....	50
4.2.3	<i>Quenching – Trypan Blue</i> .....	51
<b>4.3</b>	<b>Svakheter med oppgaven</b> .....	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Referanseliste</b> .....	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Vedlegg</b> .....	<b>59</b>



## Figurer

**Figur 1.3.1 – 1** Normal fordeling av leukocytter i perifert blod

**Figur 1.3.4 - 1** Figur over hydrodynamisk fokusering, laserstråle og detektorer

**Figur 1.3.4 – 2** Ved hvilken bølgelengde de ulike antistoffene avgir fluorescens

**Figur 1.3.4 – 3** pHrodo™ deteksjon av fagocytose og endocytose

**Figur 1.3.4 - 4** Scattergram over leukocytter og deres uttrykking av CD45

**Figur 2.2.7 – 1** Scattergram og histogram som brukes for å bestemme gating av cellepopulasjoner

**Figur 2.2.7 - 2** Scatter-plot av P1 med konjugatet FITC mot anti-CD45

**Figur 2.2.7 – 3** Fargekompensasjon av de ulike kanalene

**Figur 3.1 - 1** Scatterplot av negativ prøve. Ikke tilsatt konjugat

**Figur 3.1 - 2** Scatterplot av positiv prøve. Tilsatt konjugat

**Figur 3.1 – 3** Isk kontroll; tilsatt fullblod og konjugat

**Figur 3.2 – 1** Fargekompensering av scatterplot som kun inneholder konjugat

**Figur 3.2 – 2** Fargekompensering av scatterplot som kun inneholder fullblod og anti-CD45

**Figur 3.2 – 3** Scatterplot av fargekompensering

**Figur 3.3.1 – 1** Mengde fullblod

**Figur 3.3.2 – 1** Mengde konjugat

**Figur 3.4 – 1 & 2** Scatterplot av prøver tilsatt 50 µl fullblod og 20 µl konjugat som er inkubert i ulike tider ved 37°C

**Figur 3.5 – 1** Scatterplot av negativ kontroll som kun er tilsatt fullblod og anti-CD45

**Figur 3.5 – 2 & 3** Scatterplot av prøve tilsatt fullblod, konjugat og anti-CD45

**Figur 3.6 – 1** Scatterplot av prøver tilsatt anti-CD16

**Figur 3.6 – 2** Er samme prøve som i figur 3.6 – 1B. Viser cellene som ligger i UR, området hvor celler har fagocyttert konjugat

**Figur 3.7 – 1** Scatterplot av prøve med ufullstendig lysering av erytrocytter

**Figur 3.7 – 2** Scatterplot av prøve med fullstendig lysering av erytrocytter

**Figur 3.8 – 1** Scatterplot av prøver tilsatt bare konjugat og buffere med ulik pH for å se om pH interfererer med fluorescensen

**Figur 3.8 – 2 A:** Scatterplot av prøve tilsatt fullblod og anti-CD45. **B:** Histogram av prøve tilsatt kun fullblod. **C:** Scatterplot av prøve kun tilsatt konjugat. **D:** Histogram av prøve tilsatt konjugat som er resuspendert i RPMI 1640. **E:** Histogram av prøve tilsatt konjugat som er resuspendert i HBSS.

**Figur 3.9.1 – 1** Scatterplot av prøve tilsatt Trypan Blue med pH 4,4

**Figur 3.9.1 – 2** Scatterplot av prøve tilsatt Trypan Blue med pH 7,4

**Figur 3.9.2 – 1** Inkuberingstid med Trypan Blue pH 4,4

**Figur 3.9.2 – 2** Inkuberingstid med Trypan Blue pH 7,4

## **Tabeller**

**Tabell 1.3.4 - 1** Oversikt over BD Accuri C6 Flow Cytometers fluorescensdetektorer

**Tabell 2.1.3 – 1** Oversikt over hvilke utstyr som ble brukt før, under og etter forsøkene

**Tabell 2.2.3 -1** Oversikt over tilsetninger i kontroller og prøver

**Tabell 2.2.5 – 1** Oversikt over tilsetning av antistoff i prøver og kontroller

**Tabell 2.2.6 – 1** Vask og kalibrering av BD Accuri C6 Flow Cytometer

**Tabell 3.1 – 1** Forklaring til grupperinger i scatterplot med konjugat mot anti-CD45.

**Tabell 3.3.1 – 1** Sammenligning av 50 µl fullblod mot 100 µl fullblod

**Tabell 3.3.2 – 1** Sammenligning av 20 µl konjugat mot 100 µl konjugat

# 1. Innledning

## 1.1 Problemstilling

### 1.1.1 Bakgrunn for valg av oppgave

Oppgaven var en av flere som prosessveiledere ved skolen hadde formulert som mulige bachelorprosjekt. Flere av oppgavene virket interessante, men vi som gruppe ble raskt enig om at oppgavene som omhandlet flowcytometri skulle være vårt førstevalg. Flowcytometri er en retning innenfor laboratorieteknologi som vi har lite erfaring med selv om begge medlemmene av gruppen har arbeidserfaring innenfor bioingeniørfaget. Oppgavene virket som en god blanding av givende, utfordrende og interessant. Det at vi kunne jobbe med et tema der vi begge stilte på samme teoretiske nivå gjorde også oppgaven svært egnet. I tillegg synes vi at deteksjon og evaluering av leukocyttfunksjonen virket som et spennende tema.

Flowcytometri er et spennende område som vi ønsket å fordype oss i utenom det som ble gjennomgått på skolen. Oppgaven ville gi oss teoretiske og faglige utfordringer, samt muligheten til å tilegne oss kunnskaper om et nytt instrument og studieområde. Ved å velge denne oppgaven var tanken at ved å kunne sette seg inn i et ukjent tema ville det øke motivasjonen til å tilegne seg kunnskap. I tillegg fikk vi utvikle en prosedyre som skolen kan bruke når de skal senere analysere fagocytosefunksjon ved hjelp av flowcytometri.

### 1.1.2 Presentasjon av problemstilling

For å gjennomføre oppgaven om utvikling og optimalisering av en metode for deteksjon av fagocytoseaktivitet i leukocytter ble vi gitt et par krav. Et krav var at vi skulle kunne detektere og påvise fagocytose ved hjelp av flowcytometri, mens det andre kravet var at vi skulle bruke fluorokromet *pHrodo Bioparticles Green E.coli Conjugate* (Thermofisher). Vi kunne også merke overflateantigener med antistoff for å kunne skille de ulike cellene. Ut ifra dette kom vi frem til problemstillingen; *optimalisering av en metode for påvisning av fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri*. Ved å velge denne problemstillingen gir det oss muligheter for selvstendig arbeid og læring. Problemstillingen gjør at vi får en dypere

forståelse av hvordan de individuelle aspektene av analysemetoden fungerer, samtidig som vi setter oss inn i hvordan man jobber på et laboratorium. Flowcytometri er en mye brukt metode innenfor både sykehus- og forskningslaboratorier, og leukocyttfunksjon er en viktig del av immunforsvaret. Vi følte dermed at vi ville sitte igjen med erfaringer og kunnskap som vi kan bruke senere i arbeidslivet.

Utvikling og optimalisering av metoder og prosedyrer er en viktig del av laboratoriearbeidet og er med på å kvalitetssikre arbeidsmetodene. Ofte vil det være nødvendig å gjøre tilpasninger i en analyse. Slike endringer krever at man tilegner seg nok kunnskaper til hvordan metoden og instrumentet virker til at man kan se hvilke områder som eventuelt kan forbedres. En må også vite hvilke aspekter som er essensielle for analysen.

Metodeoptimalisering og utvikling av prosedyrer er noe vi kommer til å erfare i arbeidslivet. Vår prosedyre vil være et resultat av å kombinere metoder som andre laboratorier har brukt, samt utføre tilpasninger basert på arbeidsforhold ved skolen.

Leukocytter har en rekke ulike funksjoner, men vi fokuserer på fagocytose i denne oppgaven. Dette er en metode som ikke har blitt benyttet ved NTNU Ålesund før, og vi har derfor fått i oppgave å utvikle og tilpasse metoden slik at den kan brukes i våre laboratorier, med det instrumentet som vi har tilgjengelig. Formålet med oppgaven er dermed å utvikle en prosedyre for påvisning av fagocytose ved hjelp av flowcytometri. Målet er at prosedyren skal være kostnads- og materialeffektiv, og gi tilfredsstillende resultater, slik at prosedyren kan brukes av andre. Det er også et mål at gjennom oppgaven skal vi ha fått erfaring i hvordan instrumentet benyttes, samt hvordan man utvikler, tilpasser og optimaliserer en prosedyre.

### *1.1.3 Begrensinger i problemstillingen*

Det er i stor grad materialer og kostnader som gir begrensinger til problemstillingen. Vi hadde et ønske om å bruke antistoffer mot andre antigen, f.eks anti-CD14. Dette er et overflateantigen som er karakteristiske for fagocytterende leukocytter. På skolen er det ikke et stort nok behov for dette antistoffet, og vi hadde ikke tilgang til anti-CD14 med en passende emisjonsbølgelengde. Dette ble dermed ikke kjøpt inn. Andre aktuelle anti-CD markører ble utelukket på grunn av emisjonsspekteret til disse anti-CD markørene ligger for nært den delen av spekteret som grønnfargen til pHrodo Green Conjugat avgir. Det fantes også et større

kit, *pHrodo Green E. coli BioParticles™ for Phagocytosis*, som i tillegg til *E. coli* inneholdt både buffer og vaskebuffer. På grunn av økt kostnad og at skolen allerede hadde konjugat ble ikke dette kittet kjøpt inn. Dette gjorde at vi måtte sammenligne buffere som ble beskrevet i vitenskapelige artikler der konjugatet ble brukt. På denne måten ble metoden optimalisert med andre reagenser enn det som var anbefalt av produsent.

## 1.2 Etikk og risikovurdering

Gjennom det praktiske og det teoretiske arbeidet med denne oppgaven har vi fulgt NITO's og BFI's *Yrkesetiske retningslinjer for Bioingeniører* (1), samt de etiske retningslinjene for NTNU – Norges tekniske-naturvitenskapelige universitet (2).

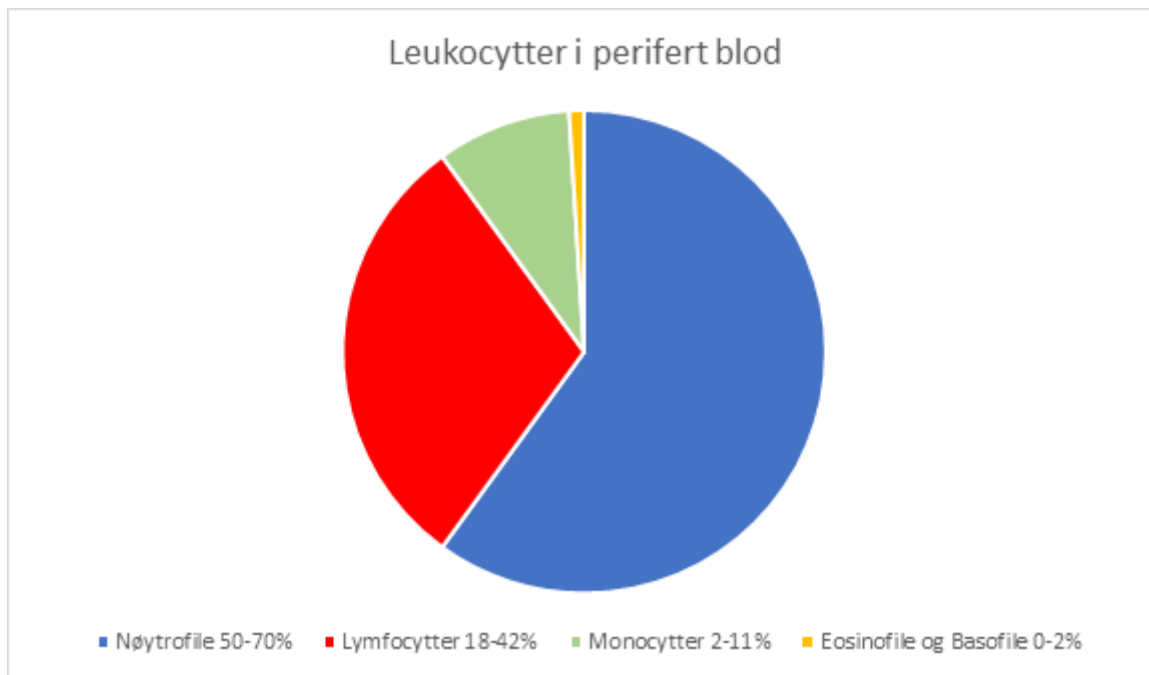
Vår metode bruker fullblod som analysemateriale, da dette er et prøveprøvemateriale som er lettere tilgjengelig enn cellekultur. Vi vil selv være prøvetakere, og prøvematerialet vil komme fra medlemmer i gruppen. Prøvetakningen utføres slik vi har fått opplæring gjennom skolen, ved studentpraksis og gjennom jobb. Vi følger prosedyren for venøs blodprøvetaking som er beskrevet i *Blodprøvetaking i praksis* (3). Da vi benytter dagsferske prøver vil det heller ikke være nødvendig med lagring. Etter vurdering har vi kommet frem til at det derfor ikke er nødvendig å melde oppgaven inn til NSD eller REK. Dette er fordi vi hverken trenger eller lagrer personopplysninger, vi ser ikke på parametere som vil variere fra person til person, vi lagrer ikke genetisk materiale, og dette er ikke et forskningsprosjekt.

Til risikovurdering ble det digitale verktøyet RiskManager © 2018 EVERY ved NTNU Ålesund brukt. Ut ifra risikovurderingen var det ingen nye tiltak som måtte settes i gang da laboratoriet hadde det nødvendige av reagens og utstyr, og gode rutiner for bruk og håndtering av disse. Risikovurderingen legges til som vedlegg 1. Sammen med faglig veileder gikk vi gjennom retningslinjene for praktisk arbeid på laboratorium for studenter hvor vi fikk en repetisjon i HMS og bruk av de ulike instrumentene ved laboratoriene.

## 1.3 Teori

### 1.3.1 Introduksjon til leukocytter

Leukocytter er en del av det flytende vevet, hvor de blant annet deltar i kroppens immunsystem (4). De utgjør en relativt liten del av blodet, men spiller til gjengjeld en stor rolle for kroppens immunforsvar og funksjon (5). Alle cellene i blodet stammer fra samme pluripotente stamcelle (6). Herfra deles de inn i to cellelinjer; myeloide eller lymfoide forløpere (5). Den myeloide forløpercellen vil utvikle seg til å bli forstadier til erythrocytter, trombocytter, eller til myeloblaster. Fra myeloblaster utvikles granulocytter og monocytter/makrofager. Felles for disse cellene er at de har granula i cytoplasma og kan ha uregelmessig kjernemembran (7). Forskjellen mellom granulocytterne kommer fra hvilke proteolytiske enzymer som finnes i granula (6). Den lymfoide cellelinjen utvikler seg til NK celler, samt B- og T-lymfocytter (5). De er ofte mindre enn granulocytterne, og har en stor kjerne med lite cytoplasma. NK celler er en del av det medfødte immunforsvaret, mens B- og T-lymfocytterne utgjør en større del av det ervervede immunforsvaret (6). Selv om leukocytter dannes i beinmargen, modnes og aktiveres noen av dem i andre vev (8). T-lymfocytterne aktiveres i tymus hvor de gjennomgår positiv og negativ seleksjon slik at de T-lymfocytterne som gjenkjenner eget vev, og angriper fremmed vev, aktiveres (4). Monocytterne omdannes til makrofager når de går ut av blodet og inn i annet vev. Da går de fra celler med jevn cellemembran, med relativt få granula, til en mer ujevn celleoverflate med mye granula. Makrofager har ulike egenskaper ut ifra hvilket vev de utvikler seg i (6).



**Figur 1.3.1 – 1** Normal fordeling av leukocytter i perifert blod (5).

Leukocyttenes hovedfunksjon er å gjenkjenne og fjerne fremmede antigener som trenger inn i kroppen (4). Nøytrofile og eosinofile granulocytter er som oftest de første aktørene ved en infeksjon fordi de blir tiltrukket av endringer og signal som sendes fra et betennelse- eller skadested (10). Nøytrofile granulocytters oppgave er å uskadeliggjøre fremmede antigener, og spiller en viktig rolle i bekjempelsen av de fleste infeksjoner (6). Eosinofile granulocytter spiller oftest en rolle ved allergiske reaksjoner og ved parasittinfeksjoner (9). Basofile granulocytter er sjeldnere enn eosinofile granulocytter, og det er mye usikkerhet rundt akkurat hvilken rolle de spiller. Forskning tyder på at basofile skiller ut histaminer som fører til en betennelsesreaksjon, og at den derfor spiller en rolle i allergiske reaksjoner (4).

Monocytter utvikler seg til makrofager når de migrerer ut av blodet. Både Makrofager og monocytter er svært effektive fagocytter, men makrofager har en større evne til å fagocyttere fordi de har flere lysosomer (6). De har også en bedre evne til å filtrere stoffer som produseres under fagocytotisk aktivitet (10). Makrofager blir tiltrukket til et skadested ved hjelp av cytokiner, ofte fra T-lymfocytter (6). De har også evnen til å presentere antigen på overflaten, noe som er viktig for det ervervede immunforsvaret. De kan presentere antigenet til cytokinproduserende celler, slik som naive T-lymfocytene (9). NK celler, *Natural Killer Cells*, er en form for leukocytter som dannes fra den lymfoide cellerekken (5). De kan drepe bakterier ved å angripe celleveggen til hvor de fremmede antigenene sitter (10). Det unike

med NK-celler er at de har reseptorer som vil detektere om en celle har nedsatt antall HLA-molekyler som er viktig for oppdagelse av virus-infeksjoner (6).

T- og B-lymfocytters rolle i det ervervede immunforsvaret er kompleks. T-lymfocytter har som hovedoppgave å finne og ødelegge fremmede antigener (6). Det finnes 2 typer T-lymfocytter; T-hjelpeceller og T-drepeceller (10). Et annet navn på disse er CD4 og CD8 T-lymfocytter (6). T-drepeceller, CD8, vil angripe og ødelegge antigen gjennom apoptose (5). T-hjelpeceller, CD4, sender ut cytokiner som tiltrekker makrofager, samt produserer cytokiner som hjelper den inflammatoriske og humorale immunresponsen (6). B-lymfocytterne derimot utvikler antistoffer som er spesifikt for antigenet som skal bekjempes (4). De aktiveres når de fanger opp et antigen, hvor de omdannes til antistoffproduserende plasmaceller (6).

### *1.3.2 Fagocytose*

Fagocytose er en mekanisme som en rekke celler bruker for å ta opp større partikler, slik som bakterier, og bryte de ned slik at de ulike bestanddelene kan enten gjenbrukes eller destrueres (6). Fagocytose, sammen med pinocytose, utgjør det som kalles endocytose (11). Pinocytose er når små partikler tas opp fra ekstracellulær matriks for destruksjon eller bruk intracellulært. I mange tilfeller må cellen få signal for at endocytose skal skje. Vanligvis initieres endocytosen gjennom binding mellom et molekyl og reseptorer på overflaten av cellen (11). Når cellen har fått signal vil cellemembranen omslutte den ekstracellulære væsken med partiklene. Da danner det seg en vakuole som generelt kalles et endosom (6). Ved fagocytose blir vakuolen omtalt som et fagosom. Fagosomet blir transportert gjennom cytoplasma i cellen og smelter sammen med et lysosom. Et lysosom er en vakuole som inneholder fordøyelsesenzymer som har den virkningen at de løser opp biologiske partikler og enheter (6). Enzymene er oftest nukleaser, proteaser og lipaser, men kan være andre hydrolytiske enzymer (11). Disse er aktive i syrlige løsninger slik at lysosomet vil under ideelle forhold opprettholde en pH på ~5. Dette gjøres ved at lysosommembranen har en ATP-avhengig  $H^+$ -pumpe som sørger for at det pumpes inn nok  $H^+$ -ioner slik at pH forblir lav. At pH er lavere i lysosomet enn i intracellulær matriks er viktig for fluorescensmetoden som skal brukes, og beskrives i detalj under metodedelen.



Fagocytose har ikke bare en metabolsk rolle ved at nedbrutte bestanddeler resirkuleres. Fagocytose spiller også en viktig rolle i immunforsvaret. Mest kjent er fagocytose av virus og bakterier, som er en stor del av det medfødte immunforsvaret (11). De fleste leukocytter har egenskapen til å fagocyttere, men de gjør dette med ulik grad av effektivitet og hyppighet. De viktigste fagocyterende cellene kalles profesjonelle fagocyterende celler (6). Dette er i hovedsak nøytrofile granulocytter, monocytter, makrofager, mast celler og dendritter (12). I motsetning til andre fagocyterende celler har de profesjonelle fagocyterende cellene overflatereseptorer som gjør at de kan direkte detektere bakterier og andre antigen (13). Nøytrofile granulocytter, som vanligvis utgjør 50-70 prosent av leukocytene i blodet, er en viktig profesjonell fagocyt (9). Sammen med eosinofile granulocytter er det ofte disse cellene som kommer først til en infeksjon (6).

Selv om fagocyterende celler og fagocytosefunksjonen noen ganger kan bidra til å spre smitte så er fagocytosen en viktig del av både det medfødte, det uspesifikke, og det ervervede spesifikke immunsystemet (14). I tillegg er fagocytose en viktig del av cellenes metabolisme og livssyklus. Det er en komplisert mekanisme som fortsatt forskes på, og det finnes stadig nye metoder for å studere og kvantifisere fagocytoseaktivitet.

### *1.3.3 Overflateantigen*

På cellemembranen finnes det flere overflateproteiner og molekyler, også kalt markører eller antigen, som kan brukes til å identifisere ulike celler. Under differensieringen uttrykker hver celletype en unik samling av overflatemarkører som kan brukes til å skille og identifisere dem (5). De spiller også en viktig rolle i cellenes individuelle egenskaper. En kan se på samlingen av overflateantigener som et fingeravtrykk. Overflateantigenene til leukocytter klassifiseres i dag som CD-molekyl, cluster of differentiation nomenklatur (15). Dette gjelder glykoproteiner, glykolipider og lektiner. I dag er det registrert 408 molekyl fordelt i 371 CD-grupper (16,17). CD nomenklaturen har blitt et universelt språk som gjør at forskere, labteknikere, og andre, kan enkelt kommunisere innenfor dette fagområdet. For å påvise overflateantigener brukes monoklonale antistoff som detekteres ved hjelp av flowcytometri (5). Dette beskrives senere.

I oppgaven brukes anti-CD45 for å markere og differensiere leukocytene. CD45, også kalt lymfocyt- eller leukocytantigenet, er et reseptorbundet protein som uttrykkes på alle

leukocytter (18). En finner også CD45 på andre nukleære hematopoietiske celler, men ikke på modne erythrocytter og trombocytter (19). Lymfocytter er, med 10% av cellemembranen dekket av overflateantigenet, den celletypen med sterkest uttrykking av CD45 (5). Dette henger sammen med at det er påvist at uttrykkingen av CD45 via T-cellerreseptor (TCR) er viktig for T-lymfocytaktivering (18).

For å skille ut de fagocyterende cellene kan en bruke anti-CD14 og anti-CD16 (20).

Monocytter er de eneste leukocytene som uttrykker CD14 (toll-like reseptorer) på overflaten, mens CD16 (Fc $\gamma$ RIII) uttrykkes på nøytrofile granulocytter, NK-celler og makrofager (21). Hvordan kombinasjonen av CD14/CD16 uttrykkes på monocytter kan brukes for å klassifisere dem. CD14 fungerer som en reseptor for endotoksiner som fører til aktivering av celler og produksjon av cytokiner slik som TNF. CD16 er en Fc-reseptor med lav affinitet som spiller en stor rolle i fagocytosen (9). Reseptoren kan binde seg til immunglobulin på immunkompleks og på celler, som fører til initiering av fagocytose (21).

#### *1.3.4 Flowcytometri*

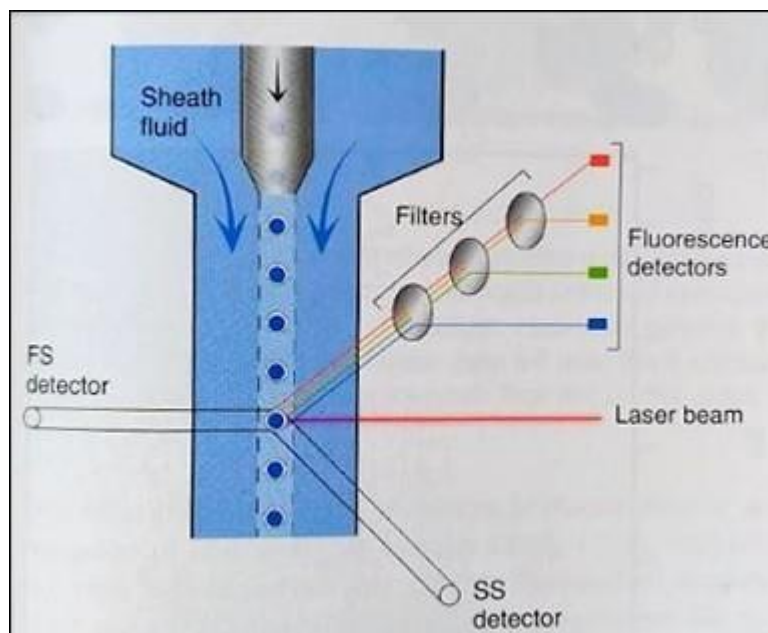
Flowcytometri er en metode som raskt kan utføre celletelling og celledatering, samtidig som flere ulike parametermålinger utføres (22). Ordet cytometri henviser til måling eller deteksjon av karakteristiske bestanddeler av celler eller partikler (23). De karakteristiske delene kan være kjemiske og/eller fysiske komponenter. Flowcytometri henviser til kvantitering av celler i en væskeløsning (20). Ved å bruke flowcytometri kan en kombinere analysering av lysspredning og laserindusert fluorometri (23). En kan da differensiere ulike populasjoner av celler ut ifra størrelse, form og karakteristiske bestanddeler som befinner seg enten på utsiden av cellen eller i cytoplasma eller kjernen.

For å frakte celledensjonen gjennom instrumentet brukes et væskesystem som blir drevet av trykkluft, pumper eller tyngdekraftsflow (22). Instrumentet som brukes i oppgaven er Accuri B6 Flow Cytometere fra BD Science. Det bruker et pumpesystem for å frakte væsken. For å få cellene til å vandre enkeltvis gjennom analyseringsområdet brukes hydrodynamisk fokusering (24). Hydrodynamisk fokusering går ut på at celledensjonen tilsettes i et kammer med cellefri væske som har høy hastighet. Dette skaper et undertrykk i cellekammeret som fører til en jevn flyt av celler sentrert i væsken (25). Dette er for å

forhindre feilkilder som at to celler tolkes som en stor celle eller at en ikke klarer å differensiere de individuelle cellene.

For å kunne samle inn data om cellene, og eventuelle fluorescerende antistoff, brukes lys. Den vanligste lyskilden er laser (26). Dette er på grunn av laserens monokromatiske egenskaper, samt intensitet og stabilitet. I dag har flowcytometerene flere lasere for å kunne detektere lys ved flere forskjellige bølgelengder (4). Vanligvis har de fem lasere; 350 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm og 640 nm. Når cellen passerer laserstrålen vil lys bli sendt i flere retninger.

Lysstrålene detekteres som forward scatter, FSC, og side scatter, SSC (27). FSC sier noe om størrelsen på cellen som passerer laserstrålen, og er dermed proporsjonal med cellestørrelsen. SSC sier noe om blant annet kjernen og granula, og er dermed proporsjonal med kompleksiteten til cellen. I en cellesuspensjon av leukocytter kan en ved bruk av FSC og SSC se om cellene er lymfocytter, monocytter eller granulocytter, samt si noe om det totale antallet og fordelingen av de ulike cellene.



**Figur 1.3.4 - 1** Figur over hydrodynamisk fokusering, laserstråle og detektorer (5).

Undertrykket som skapes fører til at cellene blir dratt gjennom væska, sheath fluid, som gjør at de vandrer enkeltvis gjennom laserstrålen. Når laseren treffer cellen blir lys sendt i alle retninger som detekteres av FSC detektor, SSC detektor og eventuelle fluorescensdetektorer.

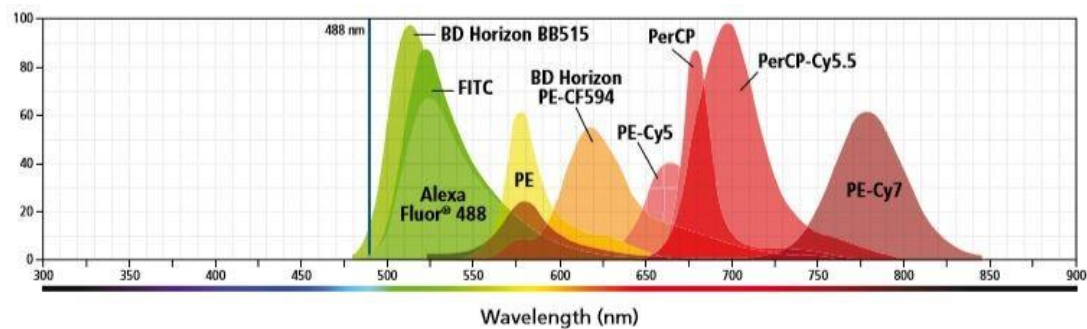
En kan også differensiere leukocytter, i tillegg til morfologiske egenskaper, ut ifra hvilke immunofenotypiske markører de uttrykker (27). Markørene kan identifiseres ved hjelp

av et fluorescerende molekyl som oftest er immunologiske komponenter slik som antistoff (26). Et eksempel er det andre antistoffet som brukes; anti-CD16. CD16 er et antigen som finnes på nøytrofile granulocytter, NK-celler og makrofager (se vedlegg 2). Ved å inkubere en celleduspensjon av leukocytter med anti-CD16, som er konjugert med et fluorescerende antistoff, vil alle leukocytene som uttrykker CD16 avgi en sterk fluorescerende farge. Leukocytter som ikke uttrykker CD16 vil kun avgi bakgrunnsfluorescens. Vanligvis bruker en et par antistoff, men det finnes studier hvor de har klart å samtidig identifisere 17 antigen på en individuell celle (28). Ved å kombinere flere antistoffer kan en identifisere spesifikke celler, bestemme graden av differensiering og oppdage abnormale celler.

**Tabell 1.3.4 - 1** Oversikt over BD Accuri C6 Flow Cytometers fluorescensdetektorer (29). Apparatet har 4 detektorer som kan detektere ulike typer fluorokrom avhengig av ved hvilken bølgelengde de emitterer lys.

Detektor	Bølgelengde	Fluorokrom
FL1	533/30	FITC, GFP, CFSE
FL2	585/40	PE, PI
FL3	670 LP	PERCP-Cy5.5, PE-Cy <sup>TM</sup> 5, PE-Cy7
FL4	675/25	APC, Alexa-647

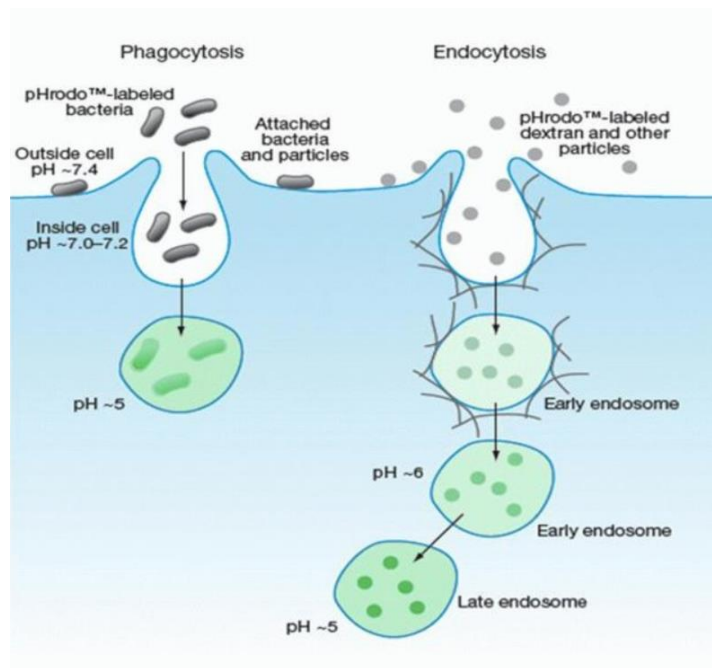
Celler som er konjugert med et fluorescerende antistoff vil avgi fluorescens når de passerer laserstrålen (26). En kan bruke så mange antistoff en ønsker så lenge de har ulike emisjonsspektrum. Antistoffet emitterer lys ved en spesifikk bølgelengde, hvor intensiteten til fluorescensen er proporsjonal med mengden konjugert antistoff bundet til cellen (27). Det finnes flere typer molekyl som avgir fluorescens ved ulike bølgelengder, se *figur 1.3.4 -2*. De mest vanlige er FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythin), APC (allophycocyanin), PE-Cy7 (PE + cyanidfargen Cy7) og PerCP (perdinin chlorophyll protein) (20,27). FITC er allment brukt for å merke bakterier og sopp, og er dermed en god markør for fagocytose (30). Dette er fordi at FITC-merkede bakterier blir påvirket av intracellulære pH-endringer, slik at fluorescensen er sterkere enn hos bakterier merket med andre typer fluorescerende molekyl.



**Figur 1.3.4 – 2** Ved hvilken bølgelengde de ulike antistoffene avgir fluorescens (31).

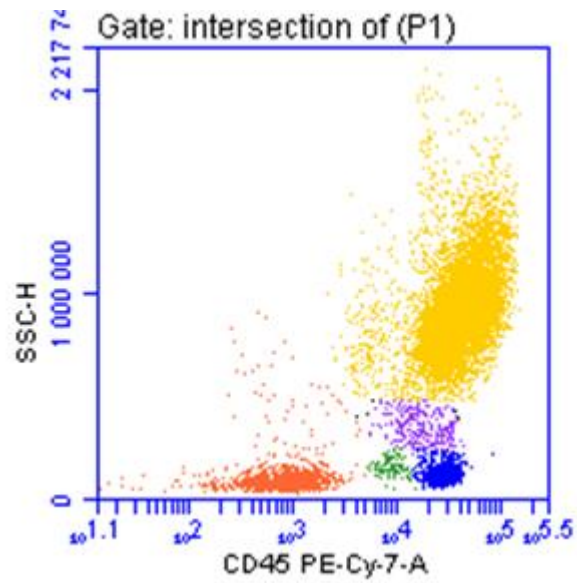
Konjugatet som brukes er av type FITC, anti-CD45 er av type PE-Cy7, og anti-CD16 er av type PE. En skal dermed kunne enkelt skille de ulike markørene da de avgir fluorescens ved ulike bølgelengder.

Ved noen tilfeller ønsker en at antistoffet ikke skal avgi fluorescens før det har gjennomgått en kjemisk reaksjon. Dette kan være ved analysering av biokjemiske egenskaper og/eller aktivitet. En kan da bruke fluorogenske prober (22). Probene er molekyl som har en fluorescerende del kovalent bundet til ei funksjonell gruppe. Den funksjonelle gruppen gjør at proben ikke avgir fluorescens før miljøet er tilfredsstillende, eller enzymer i cellen kløyver gruppen av. I oppgaven brukes *pHrodo Bioparticles Green E. coli Conjugate* fra Thermofisher som avgir fluorescens ved lav pH (se vedlegg 3). Til lavere pH, til sterkere fluorescens skal molekylet avgi. Konjugatet inneholder *Escherichia coli* som er merket med et fluorescerende molekyl, pHrodo. Når den pHrodo-merkede *E. coli* fagocyteres havner molekylet i et miljø som har en pH~5.



**Figur 1.3.4 – 3** pHrodo™ deteksjon av fagocytose og endocytose (32). Når en bakterie eller partikkel merket med pHrodo tas opp av en celle og fagocyteres, vil de bli utsatt for lavere pH enn ekstracellulært. Disse partiklene vil avgi mer fluorescens enn de utenfor cellemembranen, og man vil på denne måten kunne skille mellom biopartikler i og utenfor cellen.

Dataene fra flowcytometeret kan fremvises i et histogram, flerfarget scattergram eller i et contour plot (22). Om en har bare ett parameter er et histogram den enkleste fremvisningen av data. Ved flere parametere brukes oftest et scattergram eller contour plot. Hvilken en velger avhenger av hvordan en ønsker å fremstille dataene. Hovedforskjellen mellom disse to er at i et scattergram kan en bruke flere farger, mens et contour plot er best å bruke om dataene skal presenteres i svart og hvit. Ved studering av celler brukes oftest scattergram og histogram (20).



**Figur 1.3.4 - 4** Scattergram over leukocytter og deres uttrykk av CD45. Lymfocytter (lilla) Granulocytter (gul), og monocyttter (blå) har høyest uttrykk av CD45 på overflaten. Blaster (grønn) har ikke like sterk uttrykt av CD45. Erytroide forløperceller (oransje) har lite til ingen uttrykk av CD45.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Prøvemateriale:

Prøvetakningen tok sted ved NTNU Ålesund hvor prosedyren beskrevet i *Blodprøvetakning i praksis* (3) ble brukt som veiledning. Det ble brukt venøst fullblod tatt på EDTA-rør (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetic-Acid). Blodprøven ble tatt tidlig slik at den kunne stå 10 minutter på is før det praktiske arbeidet kunne begynne. Det var ingen spesielle forhold som måtte tas hensyn til før prøvetaking, slik som å være fastende eller medisinbruk. Ettersom det skulle påvises en generell egenskap i leukocytter, ble ikke EDTA-røret merket med navn, bare prøvetakingstidspunkt og dato. På grunn av at funksjonen til leukocytter synker etter ca. 12 timer i EDTA måtte det tas nye blodprøver hver gang et nytt forsøk ble satt opp. Det var dermed ikke behov for et lagringssystem, da eldre prøver ikke kunne brukes.

#### 2.1.2 Reagenser:

Fullstendig liste over reagenser med navn, produsent og lot-nummer presenteres i vedlegg 4.

Det ble brukt *pHrodo™ Green E. coli BioParticles™ Conjugate for Phagocytosis* (Thermofisher) med en konsentrasjon i henhold til pakningsvedlegget (33). Videre omtales dette som konjugatet. Det var tilgjengelig en pakke med 5 rør med 2mg frysetørket konjugat, og benyttet to av disse. Disse ble oppbevart ved ca. -20 grader.

PBS (Phosphate-Buffered Saline) ble benyttet i flere av stegene i prosedyren. I stedet for å bruke en egen vaskebuffer ble PBS brukt i vaskestegene PBS ble tillaget ved å tilsette en tablett med *PBS (Phosphate-Buffered Saline) Tablets* (Invitrogen) til 100 ml Milli-Q destillert vann. De ferdig vaskede leukocytene ble suspendert i PBS etter anbefaling fra faglig veileder. PBS ble tillaget ved å tilsette en tablett med *Invitrogen™ PBS (Phosphate-Buffered Saline) Tablets* til 100 ml Milli-Q destillert vann. RPMI 1640 (Gibco) ble i hovedsak benyttet som rekonstitueringsbuffer for konjugatet, og ble klargjort av veileder. HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution* Thermofisher) ble brukt som rekonstitueringsbuffer ved den andre utblandingen av konjugatet. Alle bufferne hadde en pH~7,4 og ble oppbevart i



romtemperatur. pH var særlig viktig da det ble arbeidet med levende celler og hvor bufferen ikke skulle påvirke konjugatet eller andre reagenser.

*Lysing Solution 10X Concentrate* (BD) ble brukt til å lysere erytrocyttene. Den konsentrerte lyseringsløsningen ble fortynnet 1:10 med Milli-Q vann. Det ble laget ny fortynning hver dag. Både konsentratet og den ferdig fortynnete bufferen ble oppbevart i romtemperatur. Det ble laget ny fortynning hver dag. Både konsentratet og den ferdig fortynnete bufferen ble oppbevart i romtemperatur.

*BDs PE-Cy 7 Mouse Anti-Human CD45* og *PE CD16 Monoclonal Antibody* fra Thermofisher ble brukt for å lettere studere leukocytene. Det var i hovedsak anti-CD45 som ble brukt, da for å skille de ulike leukocytene fra hverandre. Anti-CD45 er av type PE-Cy7, som har maksimal eksitasjon ved 496 nm og maksimal emisjon ved 785 nm (34). Anti-CD16 ble brukt for å separere leukocytene enda mer, særlig da med tanke på fagocyterende granulocytter. Antistoffet er av type PE, som hadde maksimal eksitasjon ved ca. 496 nm og maksimal emisjon ved 578 nm (35). Antistoffene ble oppbevart i kjøleskap.

*Trypan Blue* (Merck) ble benyttet for å prøve å dekke over og skjule overflødig fluorescens. Basert på tidligere forskning ble det laget en Trypan Blue-løsning med en konsentrasjon på 250 µg/ml og pH 4,4 (36). Trypan Blue ble fortynnet med Saline-Sodium Citrate (SSC fra AppliChem). SSC ble også brukt som base for å lage en sur buffer (pH 4,97) for å teste funksjonen til konjugatet. Trypan Blue ble også laget i en 250 µg/ml løsning med pH 7,4. PBS ble da brukt som fortynningsbuffer. Dette ble gjort for å sjekke konjugatet og anti-CD45s reaksjon med Trypan Blue i forskjellige buffere med ulik pH. Trypan Blue ble oppbevart i romtemperatur, mens SSC ble oppbevart i kjøleskap.

Det ble også brukt en del reagenser i forbindelse med bruk, kalibrering og vedlikehold av flowcytometeret. Dette inkluderer en vaskeløsning og en dekontamineringsløsning som er en del av BDs *Flow Cytometry Fluid Kit*. Dette ble oppbevart i romtemperatur. Til kalibrering av flowcytometeret ble *Spherotech 8-peak Validation Beads* og *Spherotech 6-peak Validation Beads* brukt. De ble rekonstituert ved å tilsette en dråpe fra hver flaske til ca. 1ml Milli-Q destillert vann.

### 2.1.3 Utstyr:

**Tabell 2.1.3 – 1** Oversikt over hvilke utstyr som ble brukt før, under og etter forsøkene.

Hva	Utstyr
<b>Prøvetakning</b>	Vacuette EDTA-rør  BD 21 G kanyle  BD Kanyleholder m/ beskyttelseshette  Kimetec Stasebånd  Braun Softa Swabs  Micropore Surgical Tape  Tupfer
<b>Autoklaving</b>	Tomy High Pressure Steam Sterilizer ES-315 autoklav – 121°C <ul style="list-style-type: none"><li>• Pipettespisser</li><li>• Reagensflasker</li></ul>
<b>Inkubering 37°C</b>	Digital Dry Heat Block <ul style="list-style-type: none"><li>• Begerglass ble satt over for å stabilisere temperaturen</li></ul>
<b>pH-målinger</b>	Accumet AB150 instrument <ul style="list-style-type: none"><li>• Kalibreringsløsninger med pH 4, pH 7 og pH 10.</li></ul>
<b>Småutstyr</b>  -vasket og spritet før bruk	Pipetter: <ul style="list-style-type: none"><li>• Jencons Sealpette 0.5-10 µl</li><li>• Sartorius 20-100 µl</li><li>• Jencons Sealpette 200-1000 µl</li><li>• Biohit Proline 1-5 ml</li></ul> VWR Lab Dancer Vortex mikser

	<p>Timer Count Up/Down digital</p> <p>Isoporboks m/ is</p> <p>Fisherbrand nitrilhansker</p> <p>Uvex vernebriller</p> <p>Laboratoriefrakk</p>
<b>Sentrifugering</b>	Thermo Scientific SL 40 FR Centrifuge
<b>Flowcytometer</b>	<p>BD Accuri™ C6 Flow Cytometer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PC m/ BD Accuri C6 Software</li> </ul>

Forberedelse og klargjøring av prøver måtte gjøres i et semi-sterilt rom. Et eget rom ble vasket med mildt såpevann og spritet med 70% etanol. Benkeoverflaten og utstyr ble desinfisert med sprit hver morgen. Dette var for å sikre at prøvene ikke skulle bli kontaminert. Standard personlig utstyr var nitrilhansker og laboratoriefrakker. Vernebriller ble brukt ved tillaging av lyseringsbuffer. Håndtering av Trypan Blue og tillaging av konjugat ble utført i avtrekksskap, som ble vasket og spritet før bruk. Dette var fordi det ble anbefalt av produsent å vise varsomhet med konjugatet i tørrstoff, mens Trypan Blue generelt krever at man jobber med ekstra beskyttelse. Alt utstyr som ble tatt med inn i arbeidsrommet ble spritet med 70% etanol først.

Til analysering bruktes flowcytometeret *BD Accuri™ C6 Flow Cytometer*. Dette er et lite, lett instrument som beskrives som enkel å bruke, holde ved like, og flytte. Instrumentet har en rød og en blå laser, to scatter-detektorer, og fire fluorescens-detektorer. Disse detektorene er optimalisert for FITC, PE, PerCP-Cy 5.5 og APC, men kan også tilpasses andre farger. Væskesystemet drives av et low-pressure pumpesystem, og kan analysere opp til 10 000 events per sekund. Hver brønn kan inneholde 1 million events. Instrumentet kan dermed detektere mange events veldig raskt.

## 2.2 Metode

### 2.2.1 Utarbeiding av prosedyre

Metoden som ble utviklet er basert på to ulike prosedyrer. Den ene prosedyren er fra Thermofishers pHrodo phagocytosis kit (37), mens den andre er fra en tidligere laboratorieøvelse utført ved NTNU Ålesund (se vedlegg 5). Hvilke reagenser som ble brukt ble valgt ut ifra tidligere forskning (30, 36, 38), og etter anbefalinger fra Thermofisher (39). Etter samtale med faglig veileder ble PBS brukt som vaskebuffer, RPMI 1640 og HBSS som mulige resuspenderingsbuffer, og BDs *Lysing Solution* som lyseringsbuffer. Ut ifra hvilke utstyr og reagenser som var tilgjengelig ved NTNU Ålesund ble en foreløpig prosedyre utarbeidet. Den endelige prosedyren er beskrevet i vedlegg 6.

### 2.2.2 Rekonstituering av pHrodo Green *E. coli* Bioparticles Conjugate

Det ble brukt to rør med pHrodo Green *E. coli* Bioparticles Conjugate. Første rør ble blandet ut med RPMI 1640, med en pH på ca. 7,4. Det andre røret ble blandet ut med HBSS med en pH på ca. 7,4. Konjugatet er av FITC som har høyest emisjon ved ca. 509nm, og høyest eksitasjon ved 533nm. På BD Accuri C6 tilsvarer dette kanal FL1 (29). Konjugatet ble oppbevart i kjøleskap i maks 5 dager per anbefaling fra produsent. Ved bruk ble konjugatet holdt mørkt og kjølig. Det var ikke anbefalt å fryse ned konjugatet etter rekonstituering.

### 2.2.3 Inkubering av fullblod med pHrodo Green *E. coli* Bioparticles Conjugate

Prøverør ble merket med et prøvenummer eller hva som skulle tilsettes og gjøres med det. Ved hvert oppsett ble det tatt med 3 kontroller; negativ kontroll, konjugat kontroll og en «is-kontroll». Is-kontrollen var en standard prøve satt på is og holdt kjølig istedenfor inkubering ved 37°C for å hindre start av fagocytose.

**Tabell 2.2.3 -1** Oversikt over tilsetning i kontroller og prøver. Kontroller ble håndtert som vanlige prøver. Is-kontrollen ble ikke inkubert i 37°C, bare satt på is til den skulle analyseres.

	50 µl fullblod	20 µl konjugat
<i>Negativ kontroll</i>	Ja	Nei
<i>Konjugat kontroll</i>	Nei	Ja
<i>Is-kontroll</i>	Ja	Ja
<i>Prøve</i>	Ja	Ja

Etter tilsetning av fullblod og konjugat ble prøvene raskt blandet og inkubert ved 37°C. Ved fullført inkubering ble prøvene satt på is for å senke temperaturen og stoppe fagocytoseprosessen.

#### 2.2.4 Lysering

For å få best mulig effekt ble det laget ny lyseringsbuffer til hvert oppsett. Lyseringen ble startet kort tid etter at prøvene hadde kjølt seg ned etter inkubering i 37°C. De første gangene ble 0,5 ml tilsatt av den fortynnede bufferen, men det ble observert at volumet burde økes til 1 ml for å få totalt lysering av erytrocytter. Lyseringsbufferen ble tilsatt i alle prøver og kontroller, blandet, og latt virke i 5 minutter før 1 ml PBS ble tilsatt og ventet i ytterligere 5 minutter. Rørene ble sjekket for å se om innholdet i prøverørene hadde fått en gjennomskinnelig rødfarge. Prøvene ble så vasket. Dette ble gjort ved at rørene ble sentrifugert i 5 minutter på 350 x g. Etter sentrifugering ble rørene forsiktig vendt og tømt i et spillbeger. Uten å snu rørene igjen, ble røret forsiktig dunket ned på filterpapir slik at rester av overflødig væske ble fjernet. Celleknappen i bunnen av røret ble resuspendert ved å tilsette 1 ml PBS. Prøvene ble blandet på en vortex mikser og sentrifugert igjen på 350 x g i fem minutter. Væsken ble fjernet på samme vis som ble beskrevet over, men PBS ble ikke tilsatt før neste steg.

### 2.2.5 Farging av overflateantigen

5 µl anti-CD45 og anti-CD16 ble tilsatt direkte i rørene etter at overflødig væske fra siste vask var tømt ut.

**Tabell 2.2.5 – 1** Oversikt over tilsetning av antistoff i prøver og kontroller. Det ble ikke tilsatt anti-CD45 eller anti-CD16 til konjugat-kontrollen.

<i>Negativ kontroll</i>	Ja
<i>Konjugat kontroll</i>	Nei
<i>Is-kontroll</i>	Ja
<i>Prøve</i>	Ja

Prøvevene ble inkubert mørkt i romtemperatur, i 20 til 30 minutter. Deretter tilsattes 0,5 ml PBS, blandet med vortex, og sentrifugert i 5 minutter på 350 x g. Deretter ble væsken helt over i spillbeger, og kantene tørket på tilsvarende måte som beskrevet i forrige avsnitt. Dette ble gjort 2 ganger. Etter det siste vaskesteget ble 0,25 ml PBS tilsatt, og blandet kort med vortex. og 250µl PBS ble tilsatt tilslutt.

### 2.2.6 Oppstart og kalibrering av BD Accuri C6 Flow Cytometer

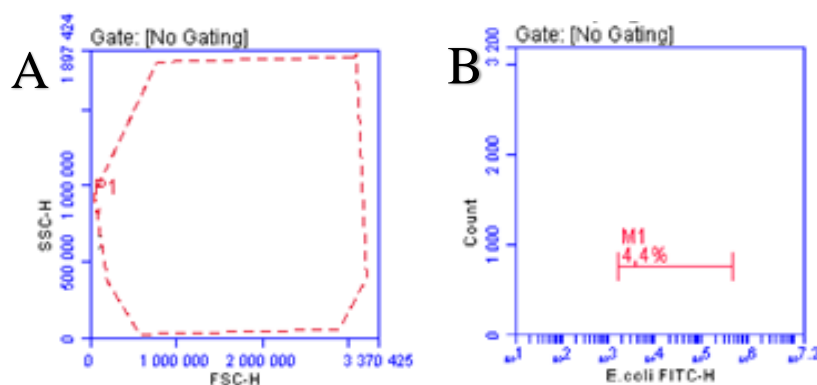
Flowcytometeret ble startet tidlig slik at vask og kalibrering var ferdig til prøvene var klar for analysering. Vaskeprosessen går ut på å vaske, dekontaminere, og rense flowcytometeret. Kalibreringen ble utført ved å bruke 8-peak og 6-peak beads. Vaske- og dekontamineringsløsningen ble fortynnet ved behov.

**Tabell 2.2.6 – 1** Vask og kalibrering av BD Accuri C6 Flow Cytometer. Dette ble utført ved oppstart og avslutning. Etter kalibrering med beads, og godkjenning av resultatet, renses det med Milli-Q og instrumentet er klar for bruk.

	Hva	Tid/events	Fart
Steg 1	Vaskeløsning	5 min	Høy
Steg 2	Dekontaminering	5 min	Høy
Steg 3	Rens med Milli-Q	5 min	Høy
Steg 4	8-peak beads • Backflush	10 000 events	Lav
Steg 5	6-peak beads • Backflush	10 000 events	Lav
Steg 6	Rens med Milli-Q	5 min	Høy

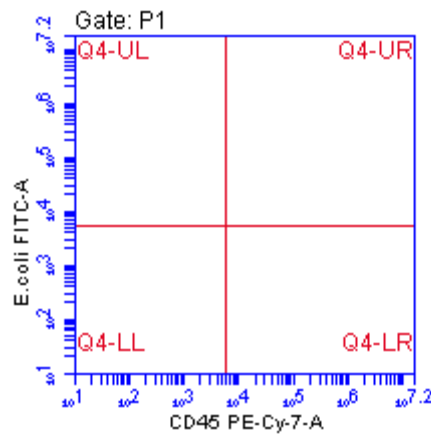
### 2.2.7 Analysering og gating på BD Accuri C6 Flow Cytometer

Tilpasning av gater og parametere for plot ble gjort i samarbeid med faglig veileder. Dette er vist i figur 2.2.7 – 1. Ved å bruke SSC og FSC ble utvalget tilpasset slik at en var sikker på at relevante celler ble fremstilt. Dette ble gatet som P1. Ut ifra P1 ble et scatter-plot med anti-CD45 på x-aksen og SSC på y-aksen, slik at leukocytfordelingen kom fra. Et histogram viser styrken på konjugatets fluorescens basert på antall celler som avgir fluorescens. M1 ble funnet ved å sammenligne en konjugat-positiv mot en konjugat-negativ prøve. Dette området av fluorescensintensitet ble regnet som positiv for FITC-fluorescens.



**Figur 2.2.7 – 1** Scattergram og histogram som brukes for å bestemme gating av cellepopulasjoner. **A:** Plot med FSC og SSC. P1 utgjør det området i plottet der de fleste leukocytterne vil legge seg ut ifra størrelse og kompleksitet. Events utenfor P1 er oftest debris. **B:** Histogram som viser fluorescensstyrken til konjugatet. M1 er gatet som de cellene som avgir fluorescens.

Ved å sammenligne styrken av fluorescenssignal av konjugatet mot styrken av anti-CD45 kan en se hvilke leukocytter som har fagocyttert og hvilke som ikke har fagocyttert. På denne måten får en også separert fritt konjugat fra fagocyttert konjugat.



**Figur 2.2.7 - 2** Scatter-plot av P1 med konjugatet FITC mot anti-CD45. Plotet ble gatet i 4 ruter for å skille ulike grupper av celler, og for å lettere se hvilke celler som har fagocyttert. Gatene Q4-UR viser de cellene med høy konsentrasjon av konjugat og høy binding av anti-CD45. Dette er leukocytter som har fagocyttert konjugatet.

Ved å tilsette anti-CD16 sammen med anti-CD45 kan en spesifikt sammenligne fluorescensstyrken for å se hvilke leukocytter som har, og hvilke som ikke har, fagocyttert konjugatet. Fluorescensstyrken til anti-CD16 ble sammenlignet mot konjugatet for å se om CD16-positive celler hadde fagocyttert konjugatet.

Ettersom det ble arbeidet med flere ulike fargestoffer ble fargekompensasjon benyttet for de ulike kanalene. Dette er matematisk korrigering som minimerer overlapp mellom de ulike



fluorescenssignalene. Kompensasjonen vises i *figur 2.2.7 – 3*, og ble utført i samarbeid med faglig veileder.

Channel to Correct	FL1 (%)	FL2 (%)	FL3 (%)	FL4 (%)
Correct FL1	0,00	20,00	0,00	0,00
Correct FL2	15,00	0,00	10,00	0,00
Correct FL3	1,50	45,00	0,00	0,00
Correct FL4	0,00	0,00	0,00	0,00

**Figur 2.2.7 – 3** Fargekompensasjon av de ulike kanalene. Konjugatet er i FL1, anti-CD16 er i FL2, og anti-CD45 er i FL3.

### 2.2.8 Quenching ved bruk av Trypan Blue

Etter å ha observert betydelig fluorescens fra ufagocyttert konjugat ble det bestemt at quenching skulle prøves. For å dekke over deler av fluorescensen ble Trypan Blue prøvd. Det ble laget to løsninger med Trypan Blue. Den første ble laget ved å tilsette 5 ml citrat buffer til 90 ml milliQ destillert vann. pH ble senket til 4,4 ved å dråpevis tilsette 2M HCl med en pasteurpipette. Vernebriller og hansker ble brukt på grunn av HCl. Tilslutt ble 6,25 ml Trypan Blue tilsatt, og blandet godt. En Trypan Blue-løsning med pH 7,4 ble også lagt ved å tilsette 6,25 ml Trypan Blue i ca. 95 ml PBS.

20 µl ferdig fortynnet Trypan Blue ble tilsatt etter det første vaskesteget etter lysering av erythrocytter (mellom steg 13 og 14 i vedlegg 6). Prøvene ble inkubert ved ulike tider for å se i hvilken grad inkubasjonstid hadde noe å si. Inkubasjonen ble gjort i 1 minutt, 2 minutter, 4 minutter, 6 minutter, 8 minutter og 10 minutter. Grunnet gjentatte uønskede reaksjoner

i fluorescens-signalet til både konjugatet og anti-CD45 ble ikke Trypan Blue tatt med i den endelige prosedyren, men blir beskrevet under resultater.

### **2.3 Tilpasning av metode og prosedyre**

Volum til konjugat og fullblod ble endret tidlig i forsøksfasen med tilfredsstillende resultater. Mengde lyseringsbuffer ble også økt tidlig. Med optimal mengde volum ble andre deler av prosedyren tester og vurdert.

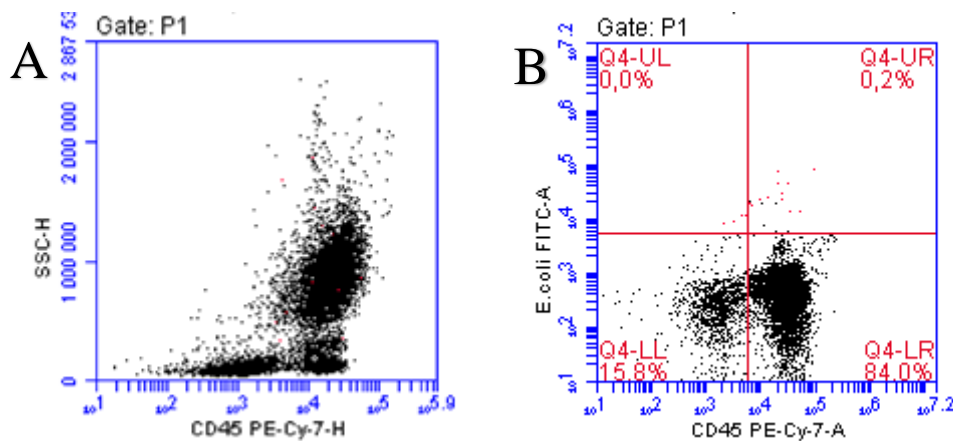
To forskjellige rekonstitusjonsbuffer for konjugatet ble testet for å se om det ga ulikt resultat. Inkubasjonstiden med konjugat og fullblod ble også testet og vurdert, med inkubasjonstider mellom 15-60 minutter. Inkubasjonstid for anti-CD45 ble testet med tre prøver mellom 20-30 minutter. Anti-CD16 ble brukt for å få et mer spesifikt resultat på hvilke leukocytter som har fagocyttert. Det ble utført tester med bare konjugat, og buffer med pH 7,4 og pH 5 for å se hvilken effekt det hadde på konjugatet. Det ble også prøvd å quenche overflødig fluorescens ved bruk av Trypan Blue, da med fokus på pH og inkubasjonstid. Som følge av dette har det resultert i flere interessante resultater. Reaksjoner og konsekvensene av en del ulike endringer ble også observert.

### 3. Resultater

Resultatene presenteres ved hjelp av scatterplot og histogram. Kombinasjonen av parameterne FSC, SSC, totalt antall (count), FITC, PE og PE-Cy7 gjør at en enkelt kan avgrense og skille cellepopulasjoner. Gating av områder med cellegrupper gjorde at ulike cellepopulasjoner lettere kunne skilles ut ved å farge dem. Figurer som presenteres her er et utdrag, og er representativ for resultatene. Originale filer med fullstendige resultater kan fremvises ved forespørsel.

#### 3.1 Test av metode

Scatter-plottene i *figur 3.1 – 1* viser hvordan leukocytterne fordeler seg i en prøve uten tilsatt konjugat. Den negative prøven behandles som en vanlig prøve. Oversikt over hvor de ulike leukocytterne fordeler seg i et slik plot presenteres i *figur 1.3.4 – 4*. I plot A ser en fire ulike cellegrupper. De ligger basert på kompleksitet og hvorvidt de har overflate-antigenet CD45. I plot B viser leukocytter i forhold til fordeling av anti-CD45/konjugat som er delt inn i 4 ulike områder; UL, UR, LL, LR. Se tabell 3.1 – 1 for forklaring. Plottet viser to ulike cellegrupper innenfor LL og LR.

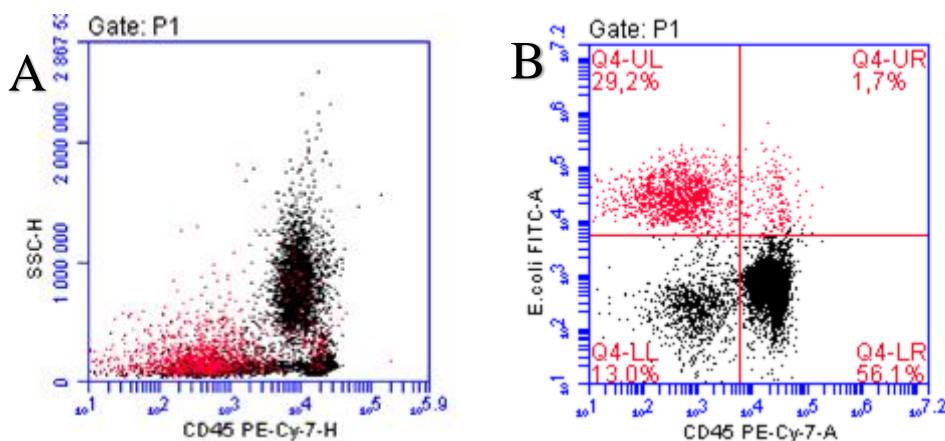


**Figur 3.1 - 1** Scatterplot av negativ prøve. Ikke tilsatt konjugat. Inkubert med CD45 i 20 minutter. **A:** Leukocytfordelingen i et CD45/SSC-H plot. **B:** Leukocytfordeling mot mengde konjugat tilstede og/eller fagocyttert.

**Tabell 3.1 – 1** Forklaring til grupperinger i scatterplot med konjugat mot anti-CD45.

Hva	Betydning
<b>UL – upper left</b>	Negativ/lite CD45, men positiv for konjugat.
<b>UR – upper right</b>	Positiv for CD45 og konjugat. Celler som er antatt å ha fagocyttert.
<b>LL – lower left</b>	Negativ/lite CD45 og konjugat.
<b>LR – lower right</b>	Negativ/lite konjugat, men positiv for CD45.

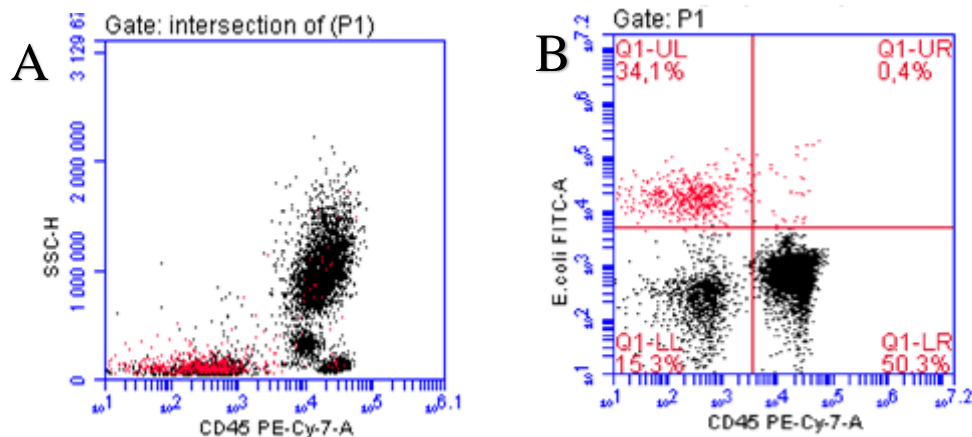
Figur 3.1-2 er et eksempel på hvordan resultatet ble ved bruk av vår metode. Rødfargen viser fluorescensen fra konjugatet, og er angitt fra M1 (se figur 2.2.7 – 1C). Prøven ble behandlet som beskrevet i prosedyren i vedlegg 5. Plot A og B viser to scatterplot fra samme prøve. Plot A viser prøven i et CD45/SSC-H scatterplot. Leukocyttdelingen er lignende fordelingen i en negativ prøve (se figur 3.1 – 1A). Alle celler og partikler med fluorescens i M1-gaten er farget rød. Det er et stort område av fluorescens som ligger innenfor M1 gate. Dette blir vist nede i venstre hjørne av plottet. Et mindre område av tilsvarende fluorescens sees høyere oppe på x-aksen, mot høyre hjørne. Plot B viser prøven i et CD45/konjugatplot. Her ligger 1,7% av leukocytterne i UR, området hvor konjugatet har blitt fagocyttert.



**Figur 3.1 - 2** Scatterplot av positiv prøve. Tilsatt konjugat. **A:** Leukocyttdelingen i et CD45/SSC-H plot. Rødt er fluorescens fra konjugat. **B:** Leukocyttdeling mot mengde

konjugat tilstede og/eller fagocyttert. Røde celler i Q4-UR er leukocytter som har fagocyttert konjugatet.

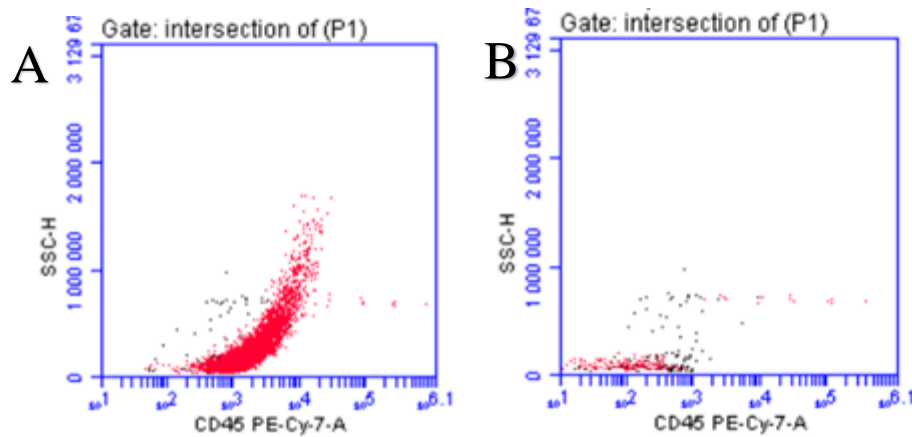
Ved hvert oppsett ble en prøve satt opp som de andre prøvene, men den ble ikke inkubert ved 37°C. Prøven lå på is gjennom hele førbehandlingen, utenom ved sentrifugering og analysering.



**Figur 3.1 – 3** Isk kontroll; tilsatt fullblod og konjugat. Lagt på is istedenfor inkubering i 37°C for å hindre fagocytose. **A:** Leukocytfordelingen i et CD45/SSC-H plot. Rødt er fluorescens fra konjugat. **B:** Leukocytfordeling mot mengde konjugat tilstede og/eller fagocyttert.

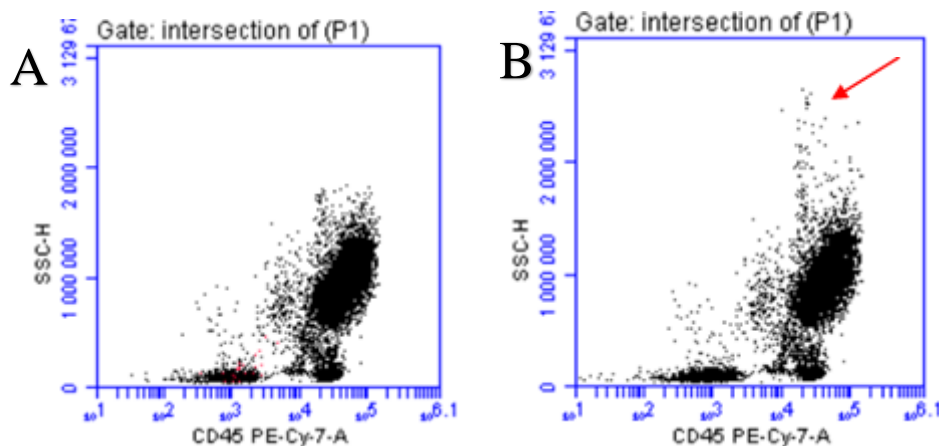
### 3.2 Fargekompensering

Innstillingene for fargekompenseringen er vist i *figur 2.2.7 - 3*. Figurene under viser hvordan fargekompenseringen påvirket fluorescens i en vanlig prøve, i en negativ kontroll, og i en konjugat-kontroll. *Figur 3.2 – 1* viser to versjoner av samme CD45/SCC-H scatterplot for 20 µl konjugat fortynnet i 1 ml PBS. Plot A viser en kurve av partikler med fluorescens som ligger innenfor M1 gaten. Denne kurven ligger i midten av x-aksen, og som går oppover. Kurven ligger i samme område som gruppen med CD45-positive leukocytter ville ligget i. Etter fargekompensering (plot B), ligger denne gruppen mot nedre venstre hjørne.



**Figur 3.2 – 1** Fargekompensering av scatterplot som kun inneholder konjugat. **A:** Kurven til konjugatet før fargekompensering. **B:** Kurven til konjugatet etter fargekompensering. Ved å fargekompensere vil overflødig konjugat kunne skjules.

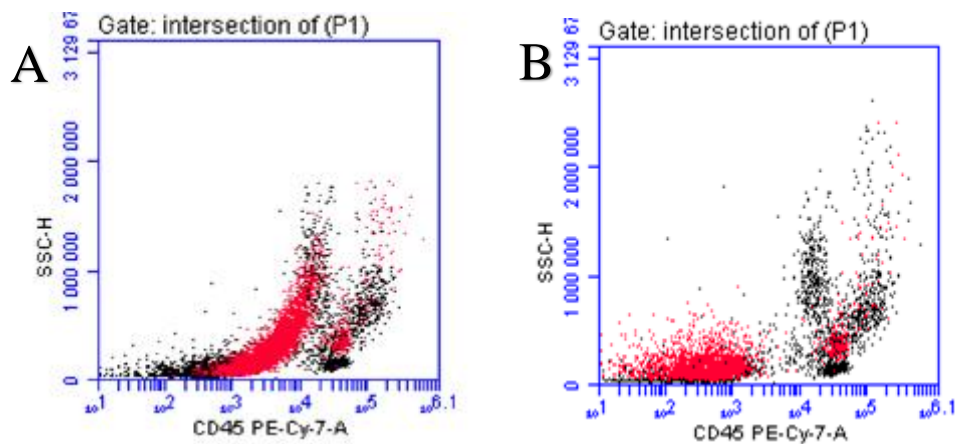
Figur 3.2 – 2 viser to versjoner av samme CD45/SSC-H scatterplot for en negativ kontroll. Fargekompenseringen påvirker i liten grad antall celler og plasseringen av dem. I plot B viser den røde pilen en svak spredning av celler over granulocytgruppen som ikke er tilstede i plot A.



**Figur 3.2 – 2** Fargekompensering av scatterplot som kun inneholder fullblod og anti-CD45. **A:** Prøven før fargekompensering. **B:** Prøven etter fargekompensering. Rød pil er celler som ikke var synlig før fargekompensering.

Figur 3.2 – 3 viser to versjoner av samme CD45/SSC-H scatterplot av en positiv prøve. Prøven ble behandlet som beskrevet i prosedyren i vedlegg 6. Plot A viser en kurve av partikler med forhøyet fluorescens som ligger i midten av x-aksen, og som går oppover, midt i

gruppen med CD45-positive leukocytter. En mindre gruppe kan også sees i området med høyere fluorescens av anti-CD45. Plot B viser at den største gruppen har flyttet seg til venstre hjørne, og viser negativitet for anti-CD45 og har lavere kompleksitet. Den mindre gruppen med spredning i y-aksen ligger i samme område som før.

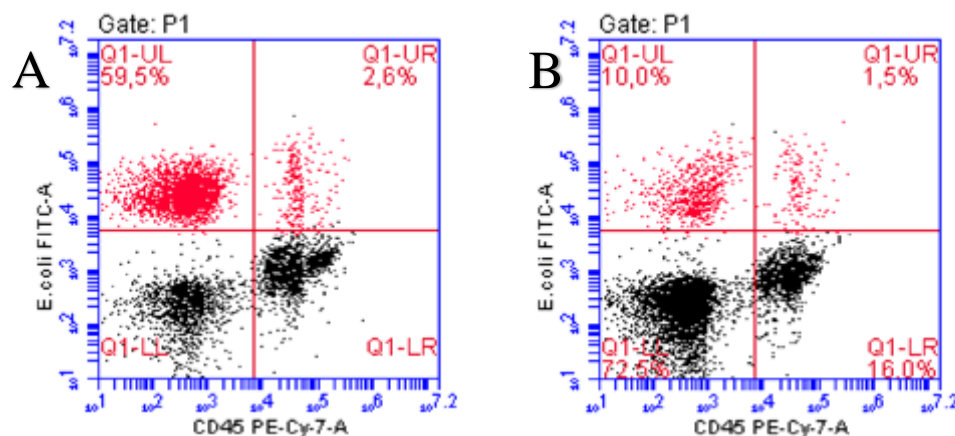


**Figur 3.2 – 3** Scatterplot av fargekompensering **A:** Prøve som er tilsatt konjugat, rødt, før fargekompensering. **B:** Prøven etter fargekompensering. En ser tydelig at ved å kompensere konjugatet i FL1 blir en kvitt en del av overskuddsfluorescensen.

### 3.3 Volum fullblod mot volum konjugat

#### 3.3.1 Mengde fullblod

Figur 3.3.1 – 1 viser CD45/konjugat scatterplot fra to ulike prøver. Prøvene har i hovedsak samme grupperinger i alle Q1-ruter. Gruppene er stort sett tydeligere, med en høyere spredning innenfor Q4-UR. Ved å sammenligne plot A og B ser en at det er høyere andel av fluorescens som ligger i M1 gaten i plot A, både i Q1-UL og Q1-UR, enn det er i plot B.



**Figur 3.3.1 – 1** Mengde fullblod **A:** Prøve tilsatt 50 µl fullblod og 20 µl konjugat. **B:** Prøve tilsatt 100 µl fullblod og 20 µl konjugat. Begge prøvene er inkubert 30min ved 37°C, og 20 minutter ved inkubering av anti-CD45.

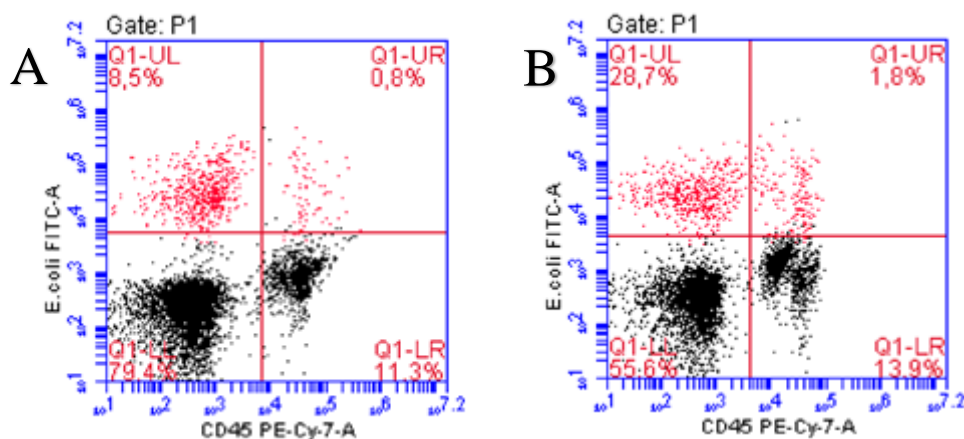
**Tabell 3.3.1 – 1** Sammenligning av 50 µl fullblod mot 100 µl fullblod. Tabellen viser statistikk over antall celler telt i P1, % av P1 som er konjugat (M1), og % konjugatet som har blitt fagocyttert i P1 (UR).

	P1: Antall	M1: % av P1	UR: % av P1
<b>A: 50 µl fullblod</b>	10184	62,09	2,60
<b>B: 100 µl fullblod</b>	10075	11,58	1,47

Tabell 3.3.1 – 1 viser at begge prøvene hadde ca. 10 000 telte celler. 62,09% i prøve A, og 11,58% i prøve B var celler og partikler som hadde fluorescens innenfor M1 gaten. Dette gir en differanse på 50,51%. Leukocytter som hadde fagocyttert konjugat var 2,60% i prøve A, og 1,47% i prøve B. Dette gir en differanse på 1,13%.

### 3.3.2 Mengde konjugat

*Figur 3.3.2 – 1* viser CD45/konjugat scatterplot fra to prøver med ulik mengde konjugat. Mellom prøve A og B er det 80 µl konjugat i forskjell, et 1:5 forhold. Begge prøvene har grupper med klare avgrensinger. Prøve A har et lavere antall CD45- og konjugat-positive celler enn prøve B.





**Figur 3.3.2 – 1** Mengde konjugat **A:** Prøve tilsatt 100 µl fullblod og 20 µl konjugat. **B:** Prøve tilsatt 100 µl fullblod og 100 µl konjugat.

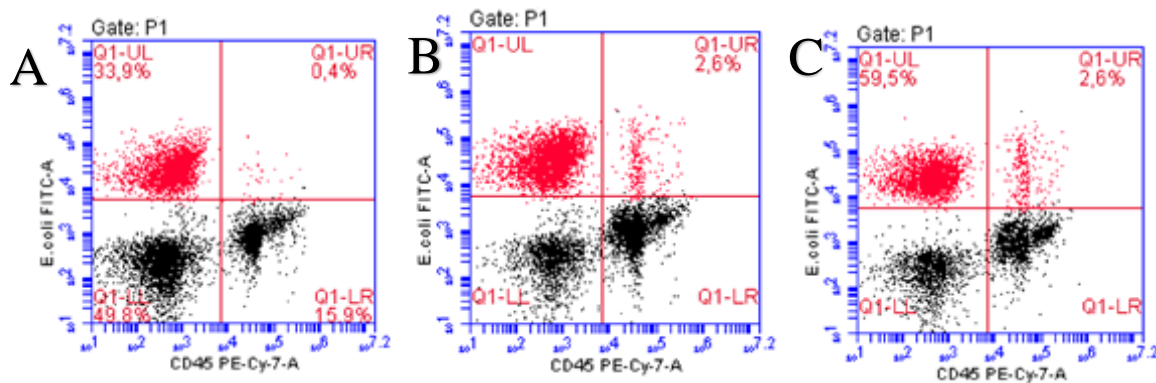
**Tabell 3.3.2 – 1** Sammenligning av 20 µl konjugat mot 100 µl konjugat. Tabellen viser statistikk over antall celler telt i P1, % av P1 som er konjugat (M1), og % konjugatet som har blitt fagocyttert i P1 (UR).

	P1: Antall	M1: % av P1	UR: % av P1
<b>A: 20 µl konjugat</b>	10050	9,31	0,82
<b>B: 100 µl konjugat</b>	9729	29,58	1,84

Tabell 3.3.2 -1 viser at begge prøvene hadde ca. 10 000 telte celler. 9,31% i prøve A, og 29,58% i prøve B var celler og partikler som hadde fluorescens innenfor M1-gaten. Dette gir en differanse på 20,27%. Leukocytter som hadde fagocyttert konjugat var 0,82% i prøve A, og 1,84% i prøve B. Dette gir en differanse på 1,02%.

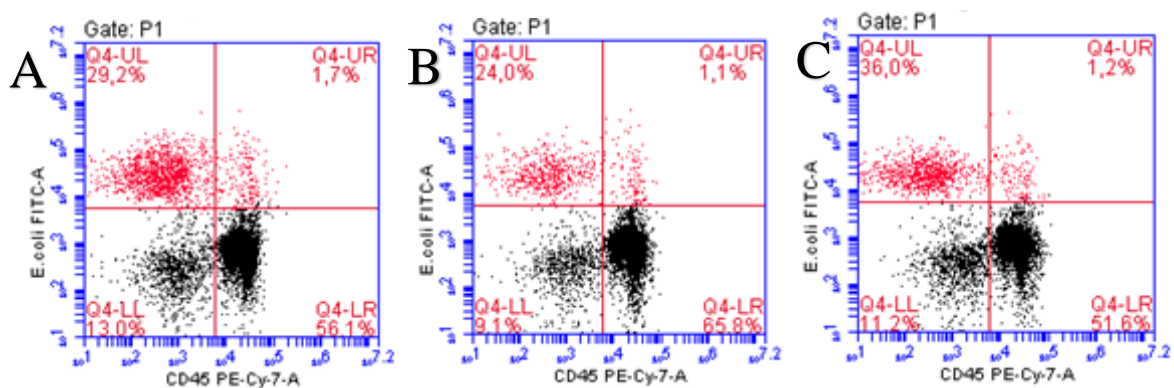
### 3.4 Inkubering med konjugat i 37°C

Prøve A, B og C i *figur 3.4 – 1* har tydelige cellegrupper innenfor alle Q1 ruter. I prøve A har 0,4% av cellene fagocyttert konjugatet. Prøve B og C har begge en andel på 2,6% av leukocytterne som har fagocyttert konjugatet. Sammenlignet med prøve A har prøve B og C høyere verdi.



**Figur 3.4 – 1** Scatterplot av prøver tilsatt 50 µl fullblod og 20 µl konjugat som er inkubert i ulike tider ved 37°C. **A:** Prøve inkubert i 15 minutter. **B:** Prøve inkubert i 23 minutter. **C:** Prøve inkubert i 30 minutter.

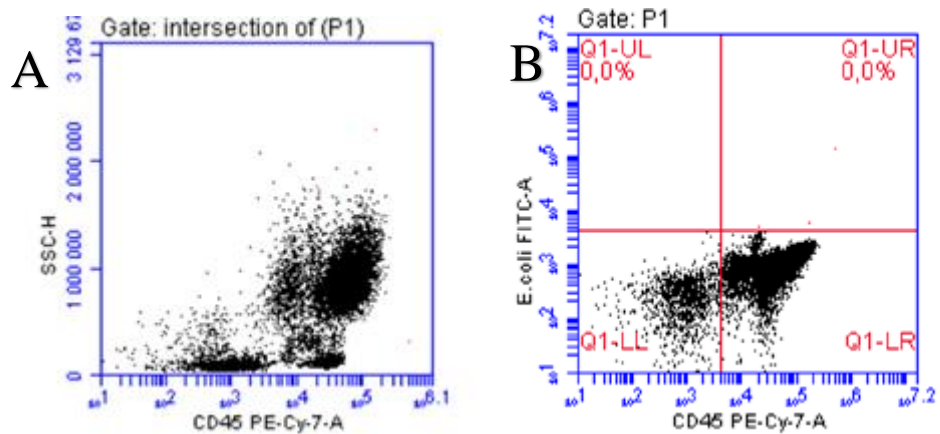
Prøvene i *figur 3.4 – 2* er fra et annet prøveoppsett enn prøvene presentert i *figur 3.4 – 1*. Alle prøvene tydelige grupper innenfor alle Q4 ruter. I prøve A har 1,7% av leukocyttene fagocyttert konjugatet. I prøve B har 1,1% av leukocyttene fagocyttert konjugatet, mens i prøve C har 1,2% fagocyttert. Prøve A har høyest andel leukocyttter som har fagocyttert, som samsvarer med forrige prøve inkubert i 30 minutter (se *figur 3.4 – 1C*).



**Figur 3.4 – 2** Scatterplot av prøver tilsatt 50 µl fullblod og 20 µl konjugat som er inkubert i ulike tider ved 37°C. **A:** Prøve inkubert i 30 minutter. **B:** Prøve inkubert i 45 minutter. **C:** Prøve inkubert i 60 minutter.

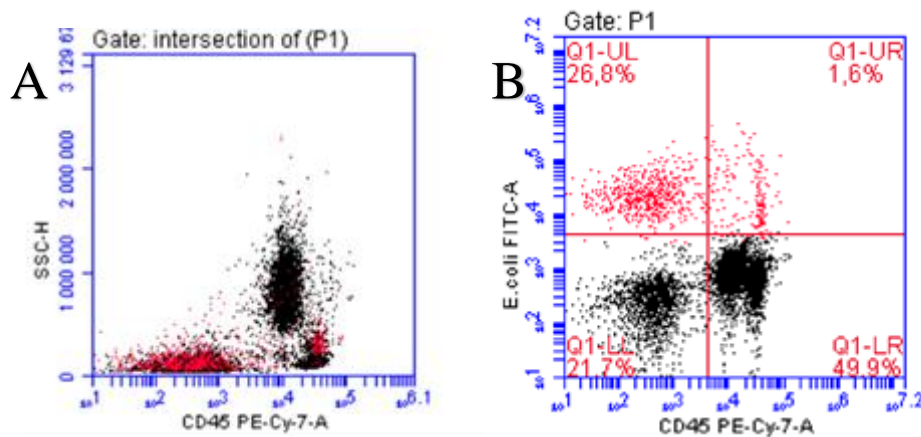
### 3.5 Inkubering med anti-CD45

Foruten om normal fordeling av leukocyttter viser *figur 3.5 – 1* plot A en fordeling som har litt mer spredning enn tidligere negative kontroller. Plot B viser en fordeling hvor cellene ligger i de områdene som sier noe om hvor mye anti-CD45 som er bundet til leukocyttene.



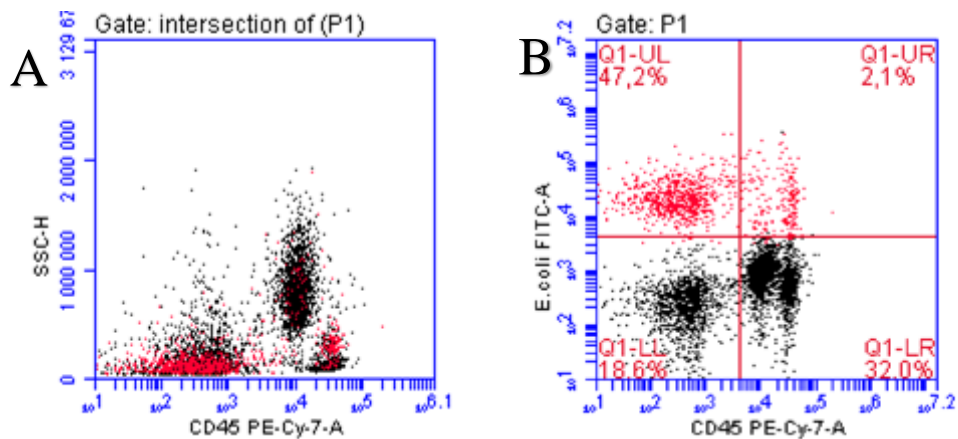
**Figur 3.5 – 1** Scatterplot av negativ kontroll som kun er tilsatt fullblod og anti-CD45. Prøvene ble inkubert 30min med anti-CD45. **A:** Mengde anti-CD45 bundet til cellene mot SSC. **B:** Mengde anti-CD45 bundet til leukocytene mot mengde konjugat.

Plot A i *figur 3.5 – 2* viser klare avgrensinger mellom de ulike cellegruppene. Vi kan se forhøyet fluorescens i både CD45-negative og i CD45-positive grupper. Plot B har cellegrupper i alle fire Q1-ruter med tydelige mønster. Man kan se både CD45-positive og CD45-negative celler. Det er en tydelig tilstedeværelse av celler i Q1-UR.



**Figur 3.5 – 2** Scatterplot av prøve tilsatt fullblod, konjugat og anti-CD45. Prøvene ble inkubert 30min med anti-CD45. **A:** Mengde anti-CD45 bundet til cellene mot SSC. **B:** Mengde anti-CD45 bundet til leukocytene mot mengde konjugat.

Ved sammenligning av inkubering av anti-CD45 i 30 minutter og 20 minutter observeres det få ulikheter. Prøven vist i *figur 3.5 – 2* ble inkubert i 30 minutter, mens prøven i *figur 3.5 -3* ble inkubert i 20 minutter.

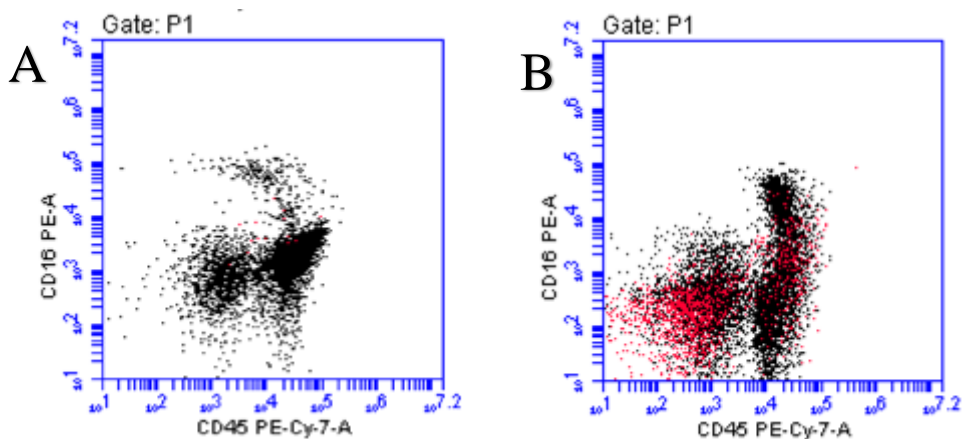


**Figur 3.5 – 3** Scatterplot av prøve tilsatt fullblod, konjugat og anti-CD45. Prøvene ble inkubert 20min med anti-CD45. **A:** Mengde anti-CD45 bundet til cellene mot SSC.

**B:** Mengde anti-CD45 bundet til leukocytene mot mengde konjugat.

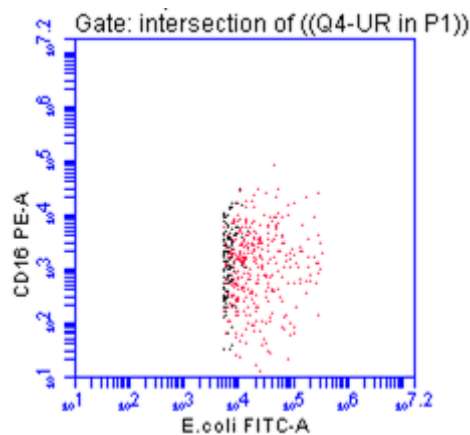
### 3.6 Inkubering med anti-CD16

Fordelingen i *figur 3.6 – 1* plot A viser at det er 3 cellegrupper. De ulike gruppene virker til å være delt inn i CD45/CD16-negative celler, CD45-positive og CD16-negative celler, og CD45/CD16-positive celler. Prøve B viser et mer kompakt bilde. Man kan likevel se forhøyet fluorescens i både CD45/CD16-negative celler, og i CD45-positive celler. Det virker også til å være noe fluorescens i CD16-positive celler.



**Figur 3.6 – 1** Scatterplot av prøver tilsatt anti-CD16. **A:** Prøve tilsatt fullblod, anti-CD45 og anti-CD16. **B:** Prøve tilsatt fullblod, konjugat, anti-CD45 og anti-CD16.

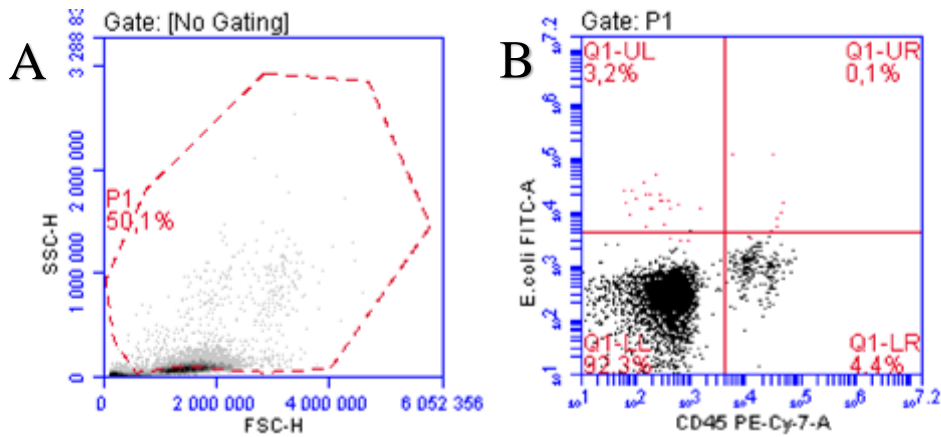
*Figur 3.6 – 2* viser en fordeling av celler som ligger i Q4-UR. Cellene er plassert innenfor og utenfor det som regnes som CD16-positivt. Det er også en del celler som ikke har FITC-fluorescens.



**Figur 3.6 – 2** Er samme prøve som i *figur 3.6 – 1B*. Viser cellene som ligger i UR, området hvor celler har fagocyttert konjugat.

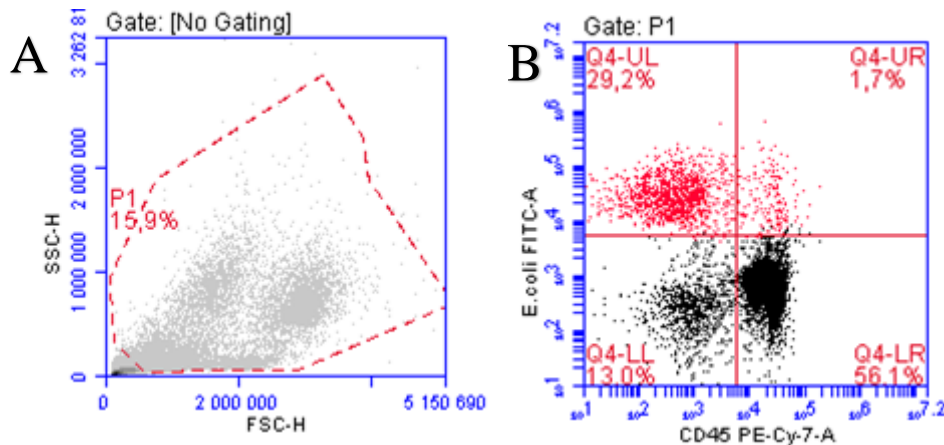
### 3.7 Lysering av erythrocytter og vaskesteg

I *figur 3.7 – 1* viser et eksempel på en utilfredsstillende prøve hvor det ble benyttet 0,5 ml erylisis buffer. Dette volumet resulterte i prøver som fikk en ulik grad av hemolyse. Flere av prøvene hadde en svak rosa farge, ikke klar og blank. Plot A viser at det ligger en stor gruppe helt nede i bunnen av plottet, innenfor P1-gaten. Det er relativt liten spredning innenfor P1. Dette sees også i plot B der en uvanlig stor gruppe ligger i Q4-LL, som er hverken positiv for anti-CD45 eller konjugat.



**Figur 3.7 – 1** Scatterplot av prøve med ufullstendig lysering av erythrocytter. **A:** FSC-H/SSC-H. **B:** Anti-CD45 mot konjugat.

Plot A og B i figur 3.7 – 2 viser resultater fra en prøve der det ble benyttet 1 ml erylisis buffer. Alle prøvene i dette oppsettet med denne mengden var klar og fargeløs etter vasketrinn. Plot A viser at gruppen i bunnen i P1 er betydelig mindre enn i figur 3.7 – 1A. Spredningen av celler har også blitt større.

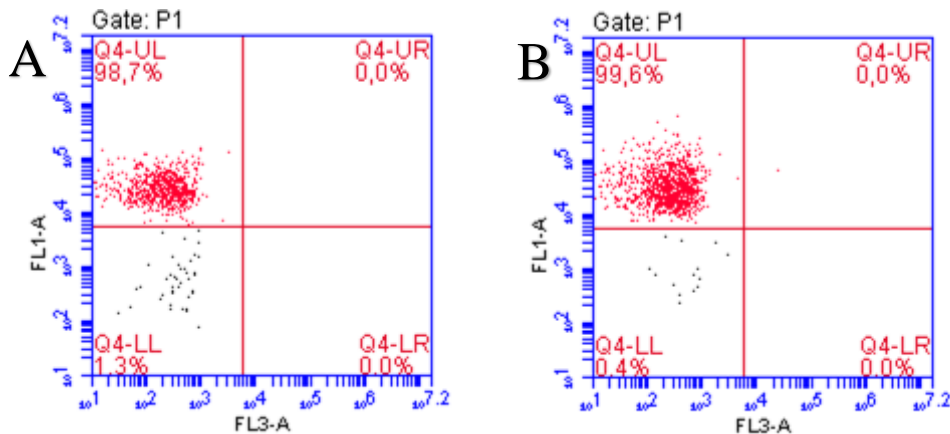


**Figur 3.7 – 2** Scatterplot av prøve med fullstendig lysering av erythrocytter. **A:** FSC-H/SSC-H. **B:** Anti-CD45 mot konjugat.

### 3.8 Test av konjugat

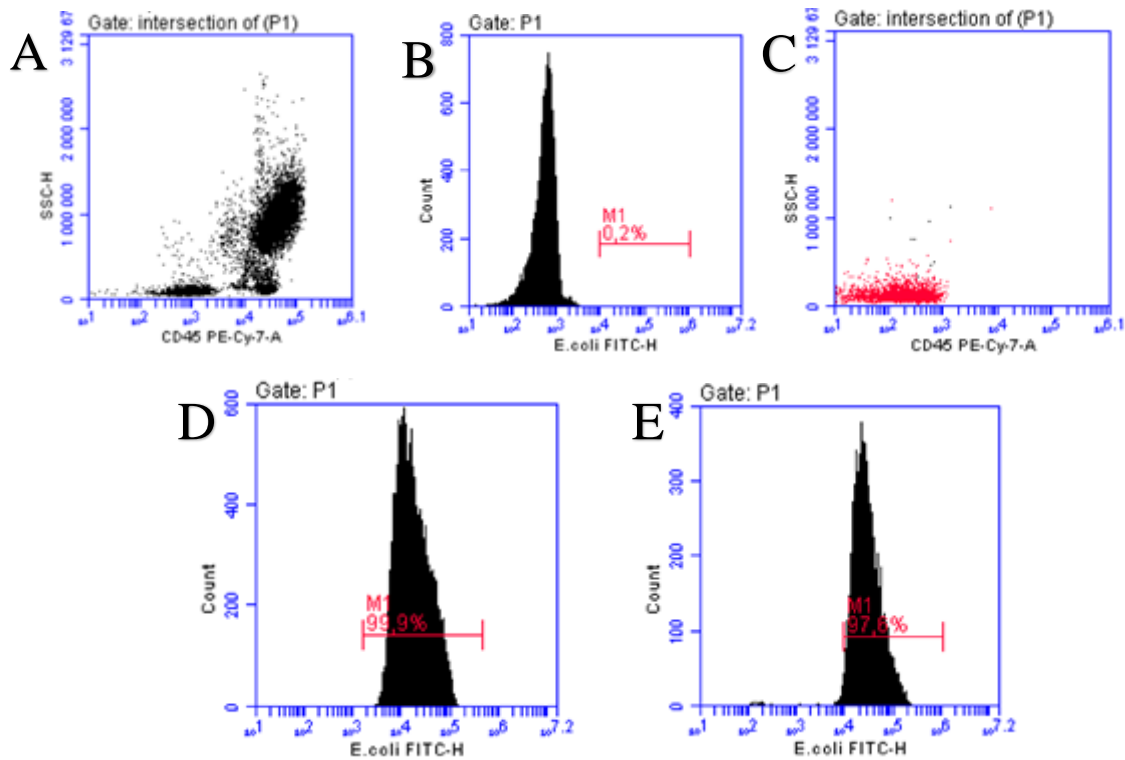
I figur 3.8 – 1 er det liten markant forskjell mellom tilsetning av sur buffer eller nøytral buffer til konjugatet. Prøve A har litt høyere spredning av partikler enn prøve B. Begge

plottene viser at hovedgruppen av konjugatpartikler ligger i UL, området positiv for konjugat og negativ for anti-CD45.



**Figur 3.8 – 1** Scatterplot av prøver tilsatt bare konjugat og buffere med ulik pH for å se om pH interfererer med fluorescensen. **A:** Prøve tilsatt konjugat og buffer med pH 5. **B:** Prøve tilsatt konjugat og buffer med pH 7,4.

Figur 3.8.2 viser histogram med konjugat/antall og scatterplot med CD45/SSC-H. Plot B viser signalstyrken til leukocytter i plot A. Plot D viser antall og fluorescensstyrken til konjugatet i plot C. Histogram E viser fluorescensstyrken til konjugat resuspendert i HBSS. Både histogram D og histogram E ligger over det som regnes som positiv for konjugatfluorescens.



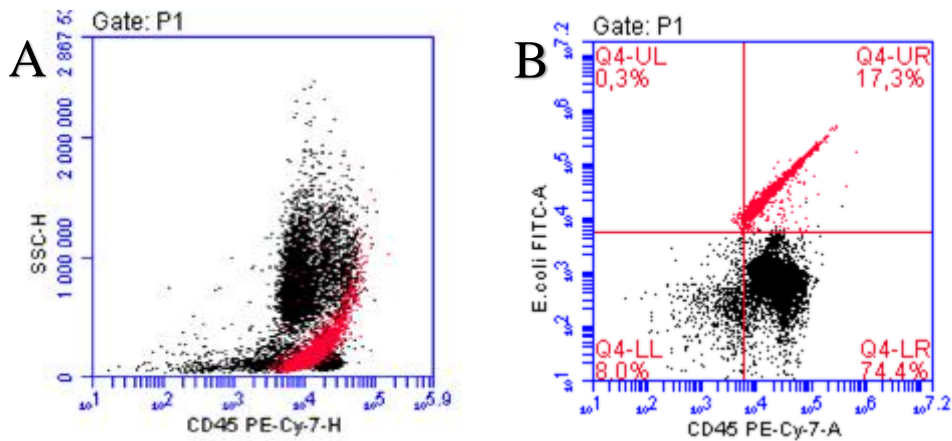
**Figur 3.8 – 2** **A:** Prøve tilsatt fullblod og anti-CD45. Scatterplot som enkelt viser hvor leukocytene legger seg. **B:** Histogram av prøve tilsatt kun fullblod. **C:** Scatterplot av prøve kun tilsatt konjugat. **D:** Histogram av prøve tilsatt konjugat som er resuspendert i RPMI 1640. **E:** Histogram av prøve tilsatt konjugat som er resuspendert i HBSS.

### 3.9 Quenching – Trypan Blue

#### 3.9.1 Trypan Blue som quencher

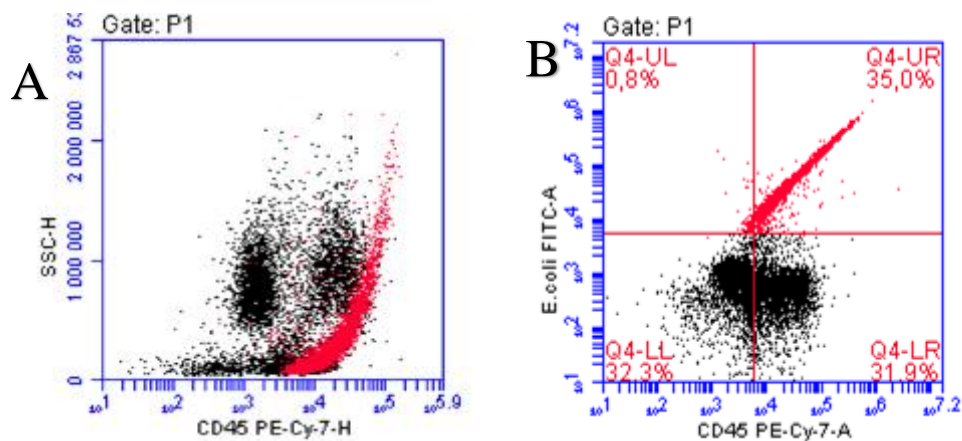
I figur 3.9.1 – 1 viser plot A en enkelt gruppe med fluorescens i området som er gatet i M1. Dette område ligger midt i de ulike gruppene for leukocytter. Det er ikke mulig å se hva som er fagocytterte celler og hva som er konjugat. Plot B viser noe av det samme. Leukocytgruppene ser også ut til å ha blitt flyttet. Det er ikke lengre mulig å skille gruppene i Q4-LL og Q4-LR. Overflødig fluorescens fra konjugatet har ikke blitt quenchet.





**Figur 3.9.1 – 1** Scatterplot av prøve tilsatt Trypan Blue med pH 4,4 for å se om den kan quenche overflødig fluorescens.

Plot A i *figur 3.9.1 – 1* viser et lignende resultat som i *figur 3.9.1 – 1A*, men leukocytgruppene har fått en uventet form med uspesifikke grupper. Det er få forskjeller mellom plott B og tilsvarende plot i *figur 3.9.1 – 1B*. Cellegruppen i Q4-LL og Q4-LR virker til å ha blitt flyttet mot venstre, men det er ikke mulig å se to ulike grupper her. Som ved utprøving av Trypan Blue med pH 4,4 har overflødig fluorescens ikke blitt quenchet.

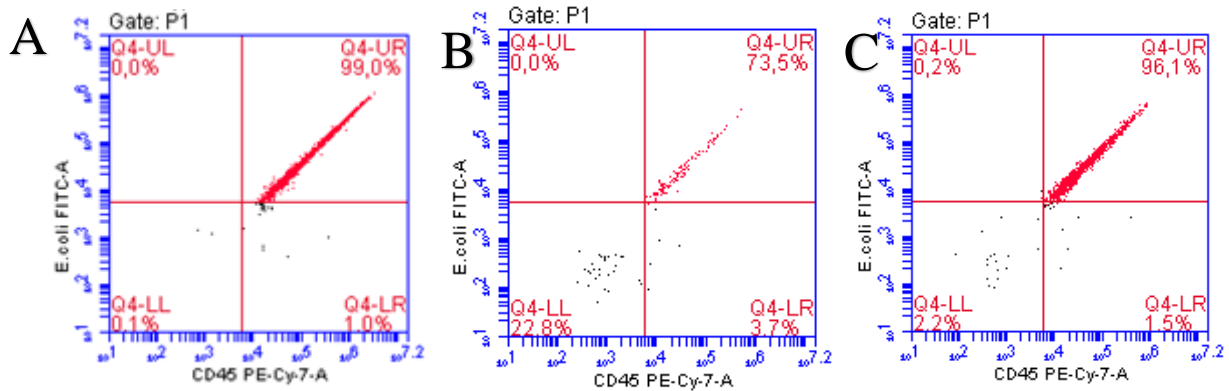


**Figur 3.9.1 – 2** Scatterplot av prøve tilsatt Trypan Blue med pH 7,4.

### 3.9.2 Test av Trypan Blues inkubasjonstid med konjugat

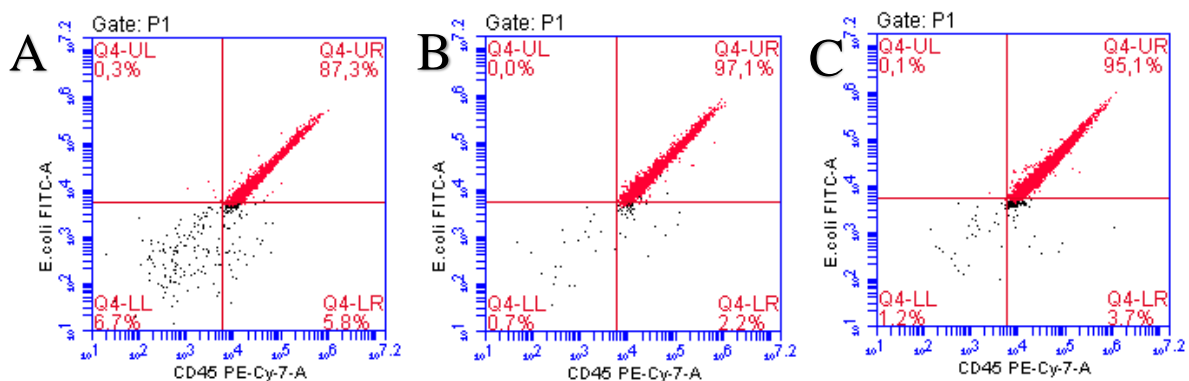
Plottene i *figur 3.9.2 – 1* viser fordelingen til konjugatet mot anti-CD45 og konjugatets egen fluorescens når konjugatet ble inkubert med Trypan blue. Fordelingen i plot A viser at 99% av konjugatet ligger innenfor Q4-UR, som tyder på at den er positiv for både Per-Cy 7

fluorescens og FITC. Det er en tilnærmet lineær sammenheng mellom styrken på fluorescens i FL1 og FL3 kanalene. Plot B har et lavere antall telte celler, men de fleste av cellene, 73%, befinner seg innenfor Q4-UR. Plot C har 96% av cellene innenfor Q4-UR.



**Figur 3.9.2 – 1** Inkuberingstid med Trypan Blue pH 4,4. **A:** 2 minutter. **B:** 6 minutter. **C:** 10 minutter

I figur 3.9.2 – 2 viser resultatene en lignende fordeling som i figur 3.9.2 – 1, der alle plottene viser et stort flertall av cellene innenfor Q4-UR. Det er også her en lineær sammenheng mellom de to ulike fluorescensparameterene.



**Figur 3.9.2 – 2** Inkuberingstid med Trypan Blue pH 7,4. **A:** 2 minutter. **B:** 6 minutter. **C:** 10 minutter

## 4. Diskusjon

### 4.1 Resultater og tilpasninger

#### 4.1.1 Test av metode

Problemstillingen førte til teoretiske og praktiske oppgaver. En prosedyre for metoden skulle utvikles basert på hvilke utstyr som var tilgjengelig ved NTNU Ålesund, og metoden skulle testes ut for å se om den fungerte og kan brukes i senere forsøk. Den teoretiske delen ble utført gjennom innhenting av informasjon. Dette gjaldt litteratursøk etter tidligere forskning og dermed få en oversikt over hvilke utstyr og instrumenter som trengtes. Resultatet av dette var en midlertidig prosedyre som var klar for utprøving. Prosedyren ble testet ut for å se om metoden fungerte med de reagenser og utstyr som var tilgjengelig.

*Figur 3.1 – 1* viser en negativ kontroll hvor det kun er tilsatt fullblod og anti-CD45. Negative kontroller ble tatt med for å sikre at inkubering med anti-CD45 var vellykket i det oppsettet, og for å kunne sette M1-gaten. M1-gaten ble justert i hvert oppsett på grunn av forskjeller mellom oppsettene. Gaten ble satt utenfor hvor den negative kontrollen plasserte seg i histogrammet, og i forhold til FITC-fluorescens. Cellene som lå innenfor M1-gaten ble definert som røde av softwaren. Dette var de cellene med høyere fluorescens enn celler funnet i den negative kontrollen. Dette gir et tydeligere bilde av hvor disse cellene og partiklene legger seg i forhold til andre parametere. Ved å ha med en prøve som ikke er tilsatt konjugat får en kontrollert at de ulike leukocyttopulasjonene er tilstede, og dermed kontrollert at lysering av erytrocytter og binding med anti-CD45 er tilfredsstillende. Det ble observert små forskjeller i populasjonene fra oppsett til oppsett. Dette ble observert i kontroller og i prøvene, men hovedgrupperingene av leukocytgruppene lå der det var forventet å finne dem. Årsaken til ulikhetene kan være preanalytisk, postanalytisk eller skyldes normale biologiske endringer (40). Ved kvantitative analyser er det en hvis analytisk variasjon mellom to prøver, i tillegg til den biologiske variasjonen til den personen prøven er tatt av. Ved håndtering av disse prøvene var det ingen forskjell i det preanalytiske og det postanalytiske arbeidet. Det ble dermed konkludert at årsaken til ulikhetene mellom prøvene henger sammen med den naturlige biologiske variasjonen, og ikke som følge av analytiske feil. Fagocyttering av fremmedlegemer skal uansett skje i fullblod. Som følge av dette ble det antatt at ulikhetene ikke ville påvirke resultatet.

*Figur 3.1 – 2* viser en standard prøve hvor fullblod, anti-CD45 og konjugat er tilsatt. I plot A og B kan en se en gruppe av FITC-fluorescerende celler i prøven, men cellegruppen er tydeligst i plot B. Cellegruppen ligger i ruten UR som viser anti-CD45 mot konjugatet, som vil si at cellene emitterer fluorescens fra både anti-CD45 og konjugatet. Dette indikerer at CD45-positive celler har tatt opp og fagocyttert de fluorescerende biopartiklene i konjugatet. Disse cellene kan sees i plot A hvor de ligger nær øvre del av granulocytgruppen. At fagocytterende celler legger seg litt høyere i scatterplottet henger sammen med at en celle som har fagocyttert vil ha noe mer kompleks intracellulær matriks enn celler som ikke har fagocyttert. En ser også FITC-fluorescens rundt cellegrupper som antas å være monocyt- og lymfocytgrupper. Monocytter og granulocytter er celler som ofte fagocytterer og det er dermed naturlig at en observerer FITC-fluorescens i disse områdene. Dermed konkluderes det med at fagocytose trolig har blitt påvist i standard prøvene.

Det var et fåtall celler med både FITC og PE-Cy7 i iskontrollen, se *figur 3.1 –*

3. Iskontrollen var en standard prøve som lå på is gjennom hele prøvebehandlingen. Det var ikke forventet opptak av konjugat i denne prøven, og dermed ikke signal i UR. Det ble sterkere fluorescenssignal i iskontrollen enn i en negativ kontroll. Dette kan skyldes at det var vanskelig å holde iskontrollen kjølig gjennom hele prøvebehandlingen. Under sentrifugering eller under tilsetning av PBS var det rom for stigning i temperatur. Det ble jobbet med små volum, og PBS ble ikke kjølt ned før tilsetning. I ettertid viser det seg at dette burde ha blitt gjort. Ved sammenligning med standardprøve i samme oppsett, se *figur 3.1 – 2*, var fluorescensen i iskontrollen betydelig lavere. Dette tyder på at inkubasjon i 37°C har en direkte sammenheng med prosentandel fagocyttert konjugat.

#### 4.1.2 Fargekompensering

I en analyse som bruker fluorokromer med ulike emisjonsbølglengder er det viktig å ta hensyn til behovet for eventuell fargekompensering. Dette er fordi fotoner fra de ulike fluorokromene vil kunne gi utslag på andre detektorer enn den detektoren som er beregnet for det fluorokromet. Om en partikkel eller celle gir utslag på flere detektorer vil programmet plassere dem i plottet ut ifra hvilke fluorescenssignal flowcytometeret detekterer. For eksempel observeres dette i *figur 3.2 – 1* plot A. Dette plottet viser fordelingen til en kontroll bestående utelukkende av konjugatet på et scatterplot som viser CD45 mot SSC-H, før kompensering. Konjugatet har FITC-fluorescens som skal detekteres av FL1-detektoren. Anti-

CD45 er PE-Cy7-fluorescens og skal detekteres av FL3-detektoren. Til tross for dette viser scatterplottet at store deler av konjugatet emitterte anti-CD45 fluorescens. Ettersom det ikke er tilsatt anti-CD45 i denne kontrollen virker det svært usannsynlig at den observerte fluorescensen er reel. Dermed måtte FITC-fluorescensen fra konjugatet fargekompenseres mot PE-Cy7-fluorescensen, uten at det skulle påvirke fluorescens fra andre fluorokrom. *Figur 3.2 – 1* plot B viser FITC-fluorescensen etter fargekompensering. Ved å sammenligne med plot A, der partiklene i konjugatet virket CD45-positivt, blir det klart at fargekompensasjonen har blitt stilt inn til å gi et resultat som virker mer nøyaktig i forhold til hva konjugat-kontrollen inneholder. I *figur 3.2 – 2* ser en derimot at leukocyttopulasjonene i liten grad ble påvirket av fargekompensasjonen. En sammenligning mellom plot A og B, som viser en negativ kontroll før og etter kompensasjon, viser at det er lite som skiller plottene fra hverandre. Dermed konkluderes det med at fargekompenseringen i liten grad påvirker fluorescensen fra anti-CD45, samtidig som fluorescens fra overflødig konjugat dempes.

Resultatet av fargekompenseringen er interessant i forhold til *figur 3.2 – 3*. Denne figuren viser plottene til en standard prøve før og etter kompensasjon. Når plottene til denne prøven sammenlignes er det stor forskjell. Den største gruppen med FITC-positive celler har flyttet seg fra å være CD45-positiv til å være CD45-negativ etter fargekompensasjon. Likevel ble individuelle celler og små cellegrupper liggende igjen som CD45-positive. Celler som er FITC-negative har ikke flyttet på seg etter kompensasjonen. Når fargekompensasjonen ble justert frem og tilbake, for å se hvilke verdier for kompensasjonen som passet best, beholdt disse cellene posisjonen. Dette tyder på at de FITC-positive cellene faktisk er CD45-positive. Dette er viktig å påpeke da disse cellene antas å ha fagocyttert konjugatet. Resultatet forsterker tilliten til at metoden er egnet til å påvise leukocytters evne til å fagocyttere.

#### *4.1.3 Volum fullblod mot volum konjugat*

En svakhet ved bruk av konjugatet fra Thermofisher er det økonomiske. Om en skulle fulgt anbefalinger i pakningsvedlegget til konjugatet ville et rør med konjugat være nok til 20 analyser (se vedlegg 3). I vedlegget ble det anbefalt 100 µl fullblod mot 100 µl konjugat. For å være mest kostnadseffektiv var det ønskelig å se om en kunne bruke mindre konjugat, og fortsatt få pålitelige resultater. Tidlig i forsøket ble det bestemt at 20 µl skulle være nok konjugat til å observere en reaksjon. Da med mulighet for å oppjustere volumet om ønsket reaksjon ikke ble oppnådd. Det ble testet med 100 µl fullblod og med 50 µl fullblod. Dette

kan sees i *figur 3.3.1 – 1* plot A og B. Med hensyn til anti-CD45 var det liten forskjell mellom de to ulike plottene. Ettersom det var ønskelig å bruke minst mulig konjugat av økonomiske og praktiske grunner virket det mest hensiktsmessig å benytte det laveste volumet av fullblod, da mindre celler ville kreve mindre konjugat for en god reaksjon. Det ble tydelig at 50 µl fullblod med 20 µl konjugat ga best resultat, da prosentandel i UR var betydelig høyere enn i prøven med 100 µl fullblod. Sammenligningen av 50 µl fullblod mot 100 µl fullblod er fremvist i tabell 3.3.1 – 1. Det ble telt ca. like mange celler men en ser at 50 µl fullblod ga større FITC-fluorescens i M1-gaten enn 100 µl, som førte til at det også var større andel celler i UR-området.

Volum konjugat mot volum fullblod ble også testet. Som vist i *figur 3.3.2 – 1* ble 20 µl konjugat sammenlignet med 100 µl konjugat. Som vist i tabell 3.3.2 – 1 førte økt mengde konjugat til høyere prosentandel av mistenkte fagocytterende leukocytter, men økningen var ikke proporsjonal med konsentrasjonen av konjugat. Det ble observert en økning av FITC-fluorescens i UR på over det dobbelte ved 100 µl konjugat, men denne prøven inneholdt også fem ganger mer konjugat. Dessverre ble flere av prøvene forstyrret av dårlig lysing av erytrocyttene, og resultatene i de aktuelle prøvene var for uklare til å tolkes. Oppsettet ble ikke satt opp på nytt da det ble observert en betydelig mengde konjugat til overs i de fleste prøver. Mengden overflødig konjugat varierte noe, men det var likevel nok til at det ikke virket fornuftig å tilsette mer enn 20 µl konjugat. Resultatene viste at dette var tilstrekkelig mengde konjugat, som førte til at det optimale volumet ble 20 µl konjugat per 50 µl fullblod.

#### *4.1.4 Inkubering med konjugat*

Inkubering av fullblod med konjugat i 37°C var et av de punktene som ga størst resultatvariasjoner. Dette er et viktig steg i metoden da inkubering i 37°C ble gjort for å simulere kroppstemperatur, og dermed kunne aktivere leukocytene. Inkuberingen skulle stimulere leukocytene til å fagocyttere konjugatet. For å se om lengre inkubering ville gi bedre resultater, ble det forsøkt inkubering fra 15 minutter opptil 60 minutter. I *figur 3.4 – 1* plot A ble prøven inkubert i 15 minutter. Dette ga et svakt resultat av både FITC- og PE-Cy7-fluorescens. Andel celler i UR var svært lav, og det ble dermed avgjort at inkubasjonstiden måtte økes.

Det ble testet inkuberingstider på 15, 23, 30, 45 og 60 minutter. Prøvene i *figur 3.4 – 1* er fra ett oppsett, mens *figur 3.4 – 2* er et annet oppsett. I begge oppsettene får en høyest FITC- og PE-Cy7-fluorescens når inkubasjonstiden er mellom 23 og 30 minutter. I *figur 3.4 – 1* er dette en fornuftig økning da det gir leukocytene lengre tid til å fagocyttere konjugatet. I *figur 3.4 – 2*, hvor prøvene er inkubert i 30, 45 og 60 minutter, er FITC- og PE-Cy7-fluorescens blitt lavere i de prøvene med lengst inkubasjonstid. Dette kan være fordi de nøytrofile granulocytene fagocytterer hurtigere partikler enn for eksempel monocytter (7), og dermed kan granulocytene ha deaktivert fluorescensen til konjugatet i løpet av denne tiden. Det kan ha vært en bestanddel av konjugatet som ble påvirket av den høye inkuberingstiden i 37°C, eller en uheldig reaksjon med rekonstitueringsbufferne RPMI 1640 og HBSS. Dette virker lite sannsynlig da dette er buffere som ofte brukes i analyser av levende celler.

Det er vanskelig å sammenligne prøver fordelt på flere oppsett. Plot C i *figur 3.4 – 1* og plot A i *figur 3.4 – 2* er et eksempel på dette. De to prøvene inneholder samme mengde konjugat og fullblod, og begge ble inkubert i 37°C i 30 minutter. Likevel er det en større forskjell i prosentandelen innenfor UR. Resultatene gjorde at slike verdier ikke kunne sammenlignes på tvers av oppsett. Dette var noe som det ble tatt hensyn til ved planlegging av oppsett, hvor det i senere oppsett alltid ble tatt med en prøve med 20 µl konjugat, 50 µl fullblod og 30 minutters inkuberingstid i 37°C. Selv om det er vanskelig å si akkurat hva som er grunnen til at 30 minutter fungerte bedre enn 45 og 60 minutter, viser disse resultatene at den optimale inkuberingstiden ligger mellom 23 og 30 minutter.

#### *4.1.5 Inkubering med anti-CD45*

Inkubering med anti-CD45 var et annet viktig punkt i prosedyren. Selv om målet med oppgaven var å påvise fagocytose kvalitativt var tanken at anti-CD45 kunne hjelpe med visualisering av hvor i leukocyttopulasjonene de fagocytterende cellene la seg. Det ble tidlig oppdaget at anti-CD45 ville få en utvidet rolle i forsøket, særlig da det ble oppdaget at konjugatet ikke virket som beskrevet av produsenten. Ved å merke CD45 på cellene med et antistoff ble det mulig å skille ulike leukocyttopulasjoner i prøven, samt skille ut konjugatet og det som antas å være fagocytterende celler.

Forsøk med ulike tider av inkubering med anti-CD45 ble gjort av to grunner. Den første grunnen var for å se om en høyere inkubasjonstid ville føre til tydeligere leukocyttopulasjoner i prøvene. Den andre grunnen var for å se om det ville påvirke

konjugatet eller den fagocytotiske aktiviteten til leukocytene i prøven. Plottene i *figur 3.1 - 1* og *figur 3.5 - 1*, og plottene i *figur 3.5 - 2* og *figur 3.5 - 3* ble sammenlignet. Det er cellepopulasjonenes form og fordeling som ble sammenlignet. Både ved inkubering i 20 minutter og i 30 minutter ble verken konjugatet eller leukocytene påvirket, samtidig som det var få forskjeller mellom plottene. En får dermed tilfredsstillende resultater uavhengig av om en inkuberer i 20 minutter eller i 30 minutter.

#### *4.1.6 Inkubering med anti-CD16*

Antistoff mot CD16 ble valgt fordi det er et overflateantigen som i hovedsak blir presentert på et utvalg av de profesjonelle fagocytterende celler (21). Dette inkluderer granulocytter, monocytter, makrofager, og mastceller. Da mastceller og makrofager finnes i andre vev enn blod er det grupperinger av granulocytter og monocytter som forventes å se. Hensikten med å inkubere med anti-CD16 var for å se om det bare var disse cellene som fagocytterte konjugatet.

*Figur 3.6 - 1* plot A viser en oversikt over en negativ kontroll i et CD45/CD16 scatterplot. Dette viser at det i hovedsak er 3 ulike cellegrupper; en gruppe består av celler som er CD45- og CD16-negativ, en cellegruppe som er CD45-positiv og CD16-negativ, og en cellegruppe som er CD45- og CD16-positiv. Det virker som at det er noen celler utenfor cellegruppene. Et fåtall celler virker CD16-positive, men CD45-negative. Dette er litt rart da det er få celler som uttrykker CD16 men ikke CD45. Det kan være en konsekvens av mangelfull fargekompensasjon eller uspesifikke celler. Det er nevnt at enkelte umodne leukocytter kan ha liten ekspresjon av CD45 (18), og i teorien kan dette være kombinert med uttrykk av CD16. Det er også noen celler som ligger mellom gruppene som kan være CD45-positiv og svakere CD16-positiv.

Plot B i *figur 3.6 - 1* viser et scatterplot av en standard prøve. Plottet viser cellegrupper med lignende struktur som i plot A, men viser også grupper med FITC-fluorescens. Den ene cellegruppen med FITC-fluorescens ser ut til å være CD45- og CD16-positiv, mens den andre cellegruppen ser ut til å bare være CD45-positiv. Denne gruppen blir vurdert nærmere i *figur 3.6 - 2*. Det bør merkes at plot B viser en høyere andel av celler enn plot A. Dette ble gjort fordi at plottet i *figur 3.6 - 2* skulle bli tydeligere. Det er også verdt å nevne at en høyere



spredning med mindre definerte populasjoner også er en naturlig konsekvens av at det ble samlet inn flere celler.

*Figur 3.6 – 2* er tatt ut ifra UR fra plot B i *figur 3.6 – 1* som viser en fordeling av celler som har fagocyttert konjugatet. Innenfor UR er det de røde cellene som regnes som celler med intracellulært konjugat. Dette er CD45-positive celler med varierende grad av CD16-uttrykking, inklusiv det som virker som CD16-negative celler. Dette tyder på at det er celler som er CD16-negativ som hadde fagocyttert konjugat. Ettersom det ble observert at det trolig var flest granulocytter og monocytter som hadde fagocyttert konjugatet virket ikke dette til å stemme overens med teorien, da begge skal uttrykke CD16. En forklaring på dette er at de ulike leukocytterne uttrykker CD16 i ulik grad (35). Av de cellene som finnes i blodet er det særlig nøytrofile granulocytter som vil uttrykke høy grad av CD16. Da er det også naturlig at dette vil være den cellegruppen som ligger høyest oppe på CD16-aksen. Den populasjonen som ligger under og uttrykker mindre CD16 kan være negative, eller den kan bestå av celler som har mindre CD16-antigener på overflaten. Dette stemmer overens med at det ikke er to definerte populasjoner i *figur 3.6 – 2*, men at det derimot virker til å være en skala. Ut ifra *figur 1.3.4 - 4* er dette sannsynligvis monocytter, men det kan også være andre celler slik som umodne granulocytter eller B-lymfocytter. Om dette stemmer viser resultatene at det er flere ulike grupper av leukocytter som trolig har fagocyttert konjugatet.

## 4.2 utfordringer og feilkilder

### 4.2.1 Lysering av erytrocytter og vaskesteg

Tidlig i forsøksfasen ble det observert en varierende effekt av den lyserende bufferen. Dette viste seg ved at noen av prøvene fikk en svak rødfarge etter vaskesteg, og i ved å gi uregelmessige punkter innenfor P1. Et eksempel på en slik prøve sees i *figur 3.7 – 1*. Det ble tydeliggjort i SSC-H/FSC-H plottet, plot A, at fordelingen innenfor P1 ikke lå som forventet. Spesielt så en at leukocytter, som har ulik grad av kompleksitet med ulike former for cellekjerner og granulocytter, ikke fordelte seg som forventet i scatterplottet. Det var få av cellene i disse prøvene som hadde høy grad av kompleksitet, og de ble istedenfor liggende helt nede på x-aksen. Resultatene i de andre scatterplottene for disse prøvene ble også lite tilfredsstillende. *Figur 3.7 – 1* plot B er et eksempel på et slikt plot. Det tok lang tid å samle inn data, og mesteparten av cellene og partiklene plasserte seg i området som tydet på at de

hadde lite kompleksitet og manglet overflateantigenet CD45. Det at de heller ikke hadde FITC-fluorescens tydet på at dette var celler og partikler utenfor oppgavens interesseområde.

Ved å øke fra 0,5 ml til 1 ml lyseringsbuffer ble effekten av lyseringen bedre mellom de ulike prøvene. Dette gjorde at man unngikk å få prøver som *figur 3.7 – 1*. *Figur 3.7 – 2* viser en prøve med tilfredsstillende lysering av erytrocytter, samt et brukbart resultat av uttrykking av FITC- og PE-Cy7-fluorescens. Sammenlignet med *figur 3.7 – 1* har denne figuren større variasjon i kompleksitet i cellene som sett i plot A, og bedre fordeling av de ulike cellene i plot B. På grunn av at lyseringseffekten økte og ga bedre resultater ved tilsetning av 1 ml lyseringsbuffer ble det avgjort at dette var nødvendig mengde for å få tilfredsstillende lysering.

#### 4.2.2 Test av konjugat

Et av de vanskeligste punktene som ble jobbet med viste seg å være konjugatet. Det ble tidlig oppdaget at det var noe som ikke så ut til å stemme overens med beskrivelsen av produktet. Konjugatet skulle ha en svak fluorescens i løsninger med pH 7,4, hvor denne fluorescensen skulle øke betraktelig ved lavere pH (32). På denne måten skulle metoden kunne brukes til å identifisere celler som hadde fagocyttert konjugatet. Etter en del forsøk virket det som om det var en betydelig mengde fluorescens fra fritt konjugat. Det ble observert i prøver hvor konjugatet var tilsatt at en større gruppe av FITC-positive celler hadde lagt seg utenfor hvor leukocytgruppene ville plassert seg. Det var ingen forskjell mellom intensiteten til konjugatets fluorescens og fluorescensen til de cellene som ble tolket som FITC-positive. Styrken til fluorescensen virker til å stemme overens med positive resultater fra andre forsøk som bruker pHrodo fluorescens (36, 39).

En lengre inkubasjonstid i 37°C forandret ikke fluorescens intensitet, bare prosentandel i UR. Eksempler på dette kan sees i *figur 3.4 – 1* og *figur 3.4 – 2*. Dette tydet på at inkubasjonstiden bare endret hvor mange konjugat-partikler som ble tatt opp i celler som var CD45-positive. Det var forventet at i alle fall en del av de cellene som hadde fagocyttert konjugatet ville hatt en sterkere fluorescens enn konjugatet alene. Spesielt etter at inkubasjonstid i 37°C ble økt til 30 minutter, som vist i *figur 3.4 – 1* plot C, eller 60 minutter, som vist i *figur 3.4 – 3* plot C. Dette ville i så fall blitt vist ved at populasjonen i UR ville ha plassert seg høyere opp på y-aksen enn populasjonen i UL. Dette kan ikke sees.

Konjugatet ble testet på flere måter. Konjugatet ble forsøkt inkubert i en buffer med pH 5 for å etterligne pH i de senere stadiene av fagocytosen. Dette ble gjort for å se om funksjonen til konjugatet kunne påvises ved å gi sterke FITC-fluorescens. Dette vises i *figur 3.8 – 1* der en ser svært liten variasjon mellom konjugatet inkubert i pH 5, plot A, og konjugatet under vanlige forhold, plot B. Det er mulig at konjugatet ville avgitt høyere fluorescens om det hadde vært suspendert i lav pH når det ble analysert, men dette ble ikke gjort fordi det ble informert om at det kunne skade flowcytometeret.

Det ble vurdert om det kunne være en uventet reaksjon mellom konjugatet og RPMI 1640 som forårsaket overflødig FITC-fluorescens. Det ble derfor forsøkt å benytte en annen tilsvarende buffer, HBSS, som rekonstitueringsbuffer. HBSS hadde blitt brukt som buffer i et annet forsøk (39). Direkte etter rekonstituering med HBSS ble konjugatet analysert. Resultatet, som vist i *figur 3.8 – 2* plot E, var veldig likt resultatet fra konjugat i RPMI 1640, som vist i plot D. Dette viste at det trolig ikke var rekonstitueringsbufferen som førte til de uventede resultatene.

ThermoFisher ble kontaktet i forbindelse med problemene med konjugatet. Ingen av tilbakemeldingene fra dem sa at det var noe galt med metoden. Kommentar til problemstillingen hadde de heller ikke. I pakningsvedlegget til konjugatet beskrives mulig problem som kan oppstå og hva som skal gjøres for å unngå eller fikse det. Ingen av problemene eller løsningene sa noe om hva som kunne forklare årsaken til den uspesifikke fluorescensen fra konjugatet. Det er ikke funnet informasjon om at konjugatet er blitt testet på et instrument fra BD Science, verken fra produsent eller i andre publikasjoner fra leverandør. På grunn av dette kan en ikke med sikkerhet si at konjugatet virker som det skal ved bruk av BD Accuri C6 Flow Cytometer. I tillegg ble fullblod tappet på EDTA-rør istedenfor Na-Heparin-rør som var anbefalt (37). Dette kan ha ført til reaksjonen i prøvene. Dette virker lite trolig da EDTA ikke ville påvirket kontroll av konjugatet i prøver der fullblod ikke ble tilsatt. Uansett grunn så tyder resultatene på at konjugatet ikke fungerte som forventet.

#### 4.2.3 Quenching – Trypan Blue

Etter flere tester av konjugatet ble det vurdert at ytterligere justeringer ikke ville føre til at den overflødig fluorescensen fra konjugatet ville forsvinne. Neste steg ble dermed å forsøke å slukke, eller quenche, overflødig fluorescens. Det er ikke beskrevet bruk av quenchingbuffer i prosedyrene til pHrodo konjugat. Litteratursøket måtte dermed utvides. Valg av quenching

-buffer ble tatt ut ifra hvilke reagenser som var tilgjengelig ved NTNU Ålesund.

Trypan Blue er et stoff som har blitt brukt som fluorescensquencher i tilsvarende forsøk, men da med bruk av andre fluorokrom (30, 36, 38). I forsøket ble bruk av Trypan Blue som quencher ikke vellykket. Trypan Blue med pH 4,4 ga et resultat som gjorde det vanskelig for instrumentet å skille, og dermed detektere, overflødig konjugat fra fagocyttert konjugat. Dette kan sees i *figur 3.9.1 – 1* plot A. Det påvirket også FITC- og PE-Cy7-fluorescensen som vist i plot B. Fordi konjugatet i teorien skal emitte sterkere fluorescens ved lav pH ble det også forsøkt å benytte Trypan Blue med en pH på 7,4 som vist i *figur 3.9.1 – 2*. Dette ga ikke et bedre resultat. Inkubasjonstid med konjugatet ble testet for å se om konjugatet kunne påvirkes på en annerledes måte, f.eks. ved lengre inkubasjon med Trypan Blue. Også her var det lite forbedring. Resultat av de ulike inkuberingstid kan sees i *figur 3.9.2 – 1*, som viser ulike inkubasjonstid med Trypan Blue pH 4,4, og i *figur 3.9.2 – 2*, som viser ulike inkubasjonstid med Trypan Blue pH 7,4. Det ble observert at ved tilsetning av Trypan Blue ble det en lineær sammenheng mellom konjugatet og anti-CD45. Dette tyder på at både FL1- og FL3-kanalene i instrumentet detekterer lik intensitet i fluorescensen emitert fra konjugatet. Årsaken til dette er ukjent, og resultatet blir ikke forbedret ved fargekompensering.

På grunn av reaksjonene til både konjugatet og anti-CD45 ble det vurdert å ikke videre bruke Trypan Blue. Det hadde vært mulig å undersøke om et annet stoff kunne blitt brukt som quencher, men ettersom *pHrodo Green E. coli bioparticles conjugate* blir beskrevet som en 'no quench, no wash'-metode (37,39) var det vanskelig å finne et stoff som kunne slukke den ekstracellulære fluorescensen. I tillegg er det sannsynlig at stoffer som ville hatt en quenching effekt på FITC-fluorescens også ville ha påvirket antistoffenes fluorescens.

### **4.3 Svakheter med oppgaven**

Den største svakheten med oppgaven er at man ikke kan bekrefte at konjugatet har blitt fagocyttert av cellene i forsøkene. Det er mulig at de cellene som er positive for både FITC-, PE- og PE-Cy7-fluorescens ikke har fagocyttert cellene, men at fluorescensen skyldes at konjugatets biopartikler istedenfor er bundet til utsiden av cellene. På den andre siden er dette usannsynlig, ettersom disse cellene økte i antall ved å justere inkubasjonstider i 37°C, og at det er en forskjell mellom is-kontrollen og prøver inkubert i mer enn 23 minutter. Det er

likevel en mulighet som må tas hensyn til. Om konjugatet hadde fungert som forventet ville dette vært mulig å vurdere ved observasjon av økende fluorescens intracellulært under fagocytosen. Dessverre skjedde ikke dette. En måte å kompensere for dette ville vært og vurdert prøvene under et fluorescensmikroskop for å se om FITC-fluorescensen intra- eller ekstracellulært.

Ettersom årsaken til at konjugatet ikke fungerte som forventet er ukjent, vil det å bestille og teste en ny leveranse og nytt lotnummer av konjugatet være en annen måte å vurdere metoden. Vedlegg fra Thermofisher antyder at de beste resultatene vil kunne sees etter inkubering i 37°C mellom 60-90 minutter (33, 37). Ved mer tid og mer anti-CD45 tilgjengelig ville det vært fornuftig med flere oppsett der inkubasjonstider ble sammenlignet, kanskje opptil 90 minutter. Dette måtte i så fall ha blitt vurdert i sammenheng med hvorvidt resultatene fra prøver med lenger inkuberingstider gjorde at man var villig til å øke inkubasjonstiden opptil 90 minutter.

En annen svakhet er at der er en del variasjoner mellom plot som er vanskelige å forklare. Det var variasjoner fra oppsett til oppsett, selv i prøver som hadde blitt behandlet likt. Selv om metoden er ment for kvalitativt bruk og skal påvise fagocytose, er det likevel en del forskjeller mellom analyseserier som gjør det vanskelig å sammenligne dem. Et eksempel på dette er plot C i *figur 3.4 – 1*, og plot A i *figur 3.4 – 2*. Selv om prøvene er analysert ved to forskjellige dager inneholder de det samme, ble behandlet likt og håndtert av samme person. De inneholder samme mengde konjugat og begge prøvene ble inkubert i 30 minutter ved 37°C. Det samme utstyret ble brukt og flowcytometeret ble kalibrert på samme måte. Likevel har den ene prøven en betydelig høyere andel positive celler enn den andre. Dette gjør at det kan se ut som om resultater i hovedsak burde vurderes i sammenheng med andre prøver og kontroller fra samme oppsett. Det forekommer også forskjeller innenfor samme oppsett der prøvene har blitt behandlet likt. Det mest merkbare er at det observeres høyere prosentandeler av ufagocyttert konjugat i enkelte prøver. Dette ser ikke ut til å ha påvirket hvor høy andel av positive celler som finnes i prøven, men det er likevel en svakhet at det er slike variasjoner. En måte å jobbe videre med dette ville vært å gjøre flere oppsett med helt identiske prøver, gjerne på samme dag slik at man kan bruke samme blodprøve. På grunn av tidsbegrensinger og at røret med anti-CD45 ble brukt opp var det ikke mulig å jobbe videre med dette.

## 5. Konklusjon

Oppgaven tar for seg optimalisering av en metode for påvisning av fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri. En midlertidig prosedyre ble utarbeidet som ga lovende resultater etter fargekompensering. Vi observerte cellepopulasjoner som emitterte både FITC- og PE-Cy7-fluorescens, og som dermed virket til å ha fagocyttert konjugatet. Det ble likevel observert at prosedyren hadde forbedringspotensial, hvor det ble besluttet å prøve å få et bedre resultat. Som følge av dette ble flere parametere testet ut.

Det ble testet ut ulike volum konjugat mot volum fullblod. Der observerte vi at 50µl fullblod tilsatt 20µl konjugat ga det beste resultatet. Etter testing av inkuberingstider med *pHrodo Green E. coli Bioparticles Conjugate* i 37°C fant vi ut at en inkuberingstid mellom 23-30 minutter virket til å ha best effekt. Test av tider ved inkubering med anti-CD45/CD16 gav resultater som bekreftet at 20-30 minutter var tilstrekkelig. Etter å ha observert ufullstendig lysing i enkelte prøver ble det forsøkt å gå fra 0,5 ml lysesbuffer til 1ml. Dette hadde god effekt.

Det ble observert uventede mengder FITC-fluorescens i noen av populasjoner. Dette var sannsynligvis overflødig fluorescens fra konjugatet. Resultatene stemte ikke overens med produsentens beskrivelse av konjugatets egenskaper. Det ble undersøkt om det var som følge av vår behandling og bruk av konjugatet, men det ble ikke funnet noe som tydet på dette. Konjugatet virket ikke til å ha den forventede økningen i fluorescensstyrken ved lavere pH. Dette gjorde at fritt konjugat hadde samme fluorescens som det antatt fagocytterte konjugatet. Som følge av dette ble det forsøkt å bruke Trypan Blue som quencher for å prøve å slukke ekstracellulær fluorescens. Dette var ikke vellykket. Trypan Blue førte til uventede resultater med både konjugatet og antistoffene, uavhengig av pH til Trypan Blue og inkuberingstider. I disse resultatene var det ikke mulig å skille mellom fritt og intracellulært konjugat. Det ble derfor besluttet å ikke benytte Trypan Blue som quencher.

Forsøkene førte til at vi fikk utarbeidet en endelig prosedyre. Metoden beskrevet i prosedyren virker til å kunne påvise fagocytose, men har likevel sine svakheter. På grunn av at konjugatet ikke fungerte som forventet kan vi ikke konkludere med at vi har bekreftet at konjugatet har blitt fagocyttert. Vi antar at en viss mengde konjugat har blitt fagocyttert siden noen celler er positiv for både FITC- og PE-Cy7-fluorescens. Ved videre bruk av prosedyren foreslår vi i første omgang å studere cellene under fluorescensmikroskop for å kontrollere at konjugatet

har blitt fagocyttert. Utvidet inkuberingstid av konjugatet i 37°C kan også være hensiktsmessig.

## 6. Referanseliste

1. Etikk for Bioingeniører: Etisk refleksjon for engasjerte bioingeniører. 2 utg. Oslo: NITO: Bioingeniørfaglig Institutt; 2013.
2. Etikkportalen [Internett]. Trondheim: NTNU [hentet 2019-04-24]. Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.no/etikkportalen>
3. Husøy A-M. Blodprøvetakning i praksis. 2 utg. Oslo: Cappelen Damm; 2012
4. Cross SS, Underwood J. Underwood's pathology: a clinical approach. 6 utg. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2013.
5. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. 5 utg. St. Louis: Elsevier Saunders; 2016.
6. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3 utg. Bergen: Vigmostad & Bjørke AS; 2006.
7. Coico R, Sunshine G. Immunology: A Short Course. New York: John Wiley & Sons, Incorporated; 2015.
8. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7 utg. Philadelphia: Elsevier; 2011.
9. Russell DG, Gordon S. Phagocyte-Pathogen Interaction: Macrophages and the Host Response to Infection. Washington: ASM Press; 2009.
10. Sand O, Sjaastad Ø, Haug E, Bjåle J. Menneskekroppen: Fysiologi og anatomi. 2 utg.: Gyldendal Akademisk; 2006.
11. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Essential Cell Biology. 4 utg. New York: Garland Science; 2014.
12. Robinson J, Babcock G. Phagocyte Function: A Guide for Research and Clinical Evaluation. Michigan: Wiley; 1998.
13. Paul WE. Fundamental Immunology. 7 utg. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2012.
14. Degre M, Hovig B, Rollag H. Medisinsk Mikrobiologi. 3 utg. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2010.
15. Gabius H-J, Kaltner H, Kopitz J, André S. The glycobiology of the CD system: a dictionary for translating marker designations into glycan/lectin structure and function. Trends in Biochemical Sciences 2015;40(7):360-76.
16. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, et al. CD molecules 2006 - Human cell differentiation molecules. Journal of Immunological Methods 2007;319(1-2):1-5.



17. Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clinical & Translational Immunology* 2016;5.
18. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunology and Cell Biology* 1997;75:430-45.
19. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters* 2018;196:22-32.
20. Goetz C, Hammerbeck C, Bonnevier J. *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Sveits: Springer, Cham; 2018.
21. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, et al. *Williams Hematology*. 9 utg.: McGraw-Hill Education; 2016.
22. Pappas D. *Practical Cell Analysis*. 2 utg. Hoboken: John Wiley & Sons, Incorporated; 2010.
23. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7 utg. St. Louis: Saunders; 2014.
24. Fenstad MH, Rø AD. Bioingeniøren. Flowcytometri i klinisk praksis [Internett]. 2012 [hentet 22.03.2019]; 47(10):[14-9 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/contentassets/7374cb802ccf4dc69258d79a06a1a5ef/flowcytometri-i-klinisk-praksis.pdf>
25. Vollen Ø. *Mekanikk: Hydraulikk*. 2 utg. Kristiansand: Fagbokforlaget; 2000
26. Turgeon ML. Linné & Ringsrud's *Clinical Laboratory Science: The Basics and Routine Techniques*. 6 utg. St Louis: Elsevier Health Sciences; 2012
27. Cibas ES, Ducatman BS. *Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates*. 4 utg. London: Elsevier Health Sciences; 2014.
28. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2004;4:648.
29. BD Accuri™ C6 Plus System User's Guide [Internett]. BD Biosciences [hentet 2019-05-02]. Tilgjengelig fra: [http://static.bdbiosciences.com/documents/BD-Accuri-C6-Plus-Users-Guide.pdf?\\_ga=2.35579937.1026523374.1556789509-456511786.1552995068](http://static.bdbiosciences.com/documents/BD-Accuri-C6-Plus-Users-Guide.pdf?_ga=2.35579937.1026523374.1556789509-456511786.1552995068)
30. Lehmann AK, Sørnes S, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2000;243:229-42.
31. BD Biosciences; Fluorochrome/Laser Reference Poster [Internett]. BD Biosciences [hentet 2019-04-28]. Tilgjengelig fra: [https://www.bdbiosciences.com/documents/multicolor\\_fluorochrome\\_laser\\_chart.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/multicolor_fluorochrome_laser_chart.pdf)

32. pHrodo™ Green *E. coli* BioParticles™ Conjugate for Phagocytosis; Figures [Internett]. Thermofisher [hentet 2019-04-24]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P35366>
33. Quick Ref: pHrodo Red and Green BioParticles Conjugates [Internett] Thermofisher: [Hentet 2019-04-27] Tilgjengelig fra: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pHrodo\\_bioparticles\\_QR.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pHrodo_bioparticles_QR.pdf)
34. Spectrum Guide Page [Internett]. BD Biosciences [Hentet 2019-04-27]. Tilgjengelig fra: <http://www.bdbiosciences.com/us/applications/s/spectrumguidepage>
35. CD16 Antibody Clone B73-1 Monoclonal [Internett]. Thermofisher [Hentet 2019-04-27]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD16-Antibody-clone-B73-1-Monoclonal/12-0167-42>
36. Wan C, Park C, Lau B. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *Journal of Immunological Methods* 1993;162:1-7.
37. pHrodo BioParticles Phagocytosis Kits for Flow Cytometry [Internett]. Thermofisher: [Hentet 2019-04-27] Tilgjengelig fra: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10025.pdf>
38. Fabbrini M., Samiccheli C., Margarit I., Maione D., Grandi G., Guilana MM., et.al. A New Flow-Cytometry-Based Opsonophagocytosis Assay for the Rapid Measurement of Functional Antibody Levels Against Group B Streptococcus. *Journal of Immunological Methods* 2012;378:11-19.
39. A No-Wash No-Quench Assay for Phagocytosis Based on a Fluorogenic BioParticles® Conjugate Made with the Novel pH Sensitive pHrodo™ [Internett]. Technologynetworks: [Hentet 2019-04-27] Tilgjengelig fra: <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/posters/a-nowash-noquench-assay-for-phagocytosis-based-on-a-fluorogenic-bioparticles-conjugate-made-with-the-novel-ph-sensitive-phrodo-dye-230513>
40. Nasjonal brukerhåndbok i Medisinsk Biokjemi; Tolking av prøvesvar [Internett] Den Norske Lægeforeningen: [Hentet 2019-05-16] Tilgjengelig fra: <https://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=f044f82838363540e73d>

**Oppsummering, resultat og endelig vurdering**

I oppsummeringen presenteres en oversikt over farer og uønskede hendelser, samt resultat for det enkelte konsekvensområdet.

<b>Farekilde:</b>	<b>Prøvetakning</b>
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>Blødning</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>Stikkskade</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>Personskade</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
<b>Farekilde:</b>	<b>Reagens</b>
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>pHrodo</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
Ytre miljø	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>RPMI 1640 buffer</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
Ytre miljø	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>BD FACS lysing solution</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
Ytre miljø	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
<b>Uønsket hendelse:</b>	<b>Trypan blue</b>
<b>Konsekvensområde:</b> Helse	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:
Ytre miljø	Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak:



**Farekilde:** Reagens

---

**Uønsket hendelse:** PBS

**Konsekvensområde:** Helse  
Ytre miljø

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:   
Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:

**Uønsket hendelse:** HBSS

**Konsekvensområde:** Helse

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:

**Uønsket hendelse:** SSC

**Konsekvensområde:** Helse

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:

**Uønsket hendelse:** HCI 2M

**Konsekvensområde:** Helse

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:

**Farekilde:** Thermo Scientific SL 40 FR Centrifuge

---

**Uønsket hendelse:** Instrumentskade

**Konsekvensområde:** Materielle verdier

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:

**Farekilde:** BD Accuri C6 Flow Cytometer

---

**Uønsket hendelse:** Instrumentskade

**Konsekvensområde:** Materielle verdier

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:

**Farekilde:** VWR Digital Heat Block

---

**Uønsket hendelse:** Instrumentskade

**Konsekvensområde:** Ytre miljø

Risiko før tiltak: Risiko etter tiltak:



**Farekilde:** VWR Digital Heat Block

---

**Uønsket hendelse:** Brannskade

**Konsekvensområde:** Helse

Risiko før tiltak:  Risiko etter tiltak: 

**Endelig vurdering**

Ok og klar

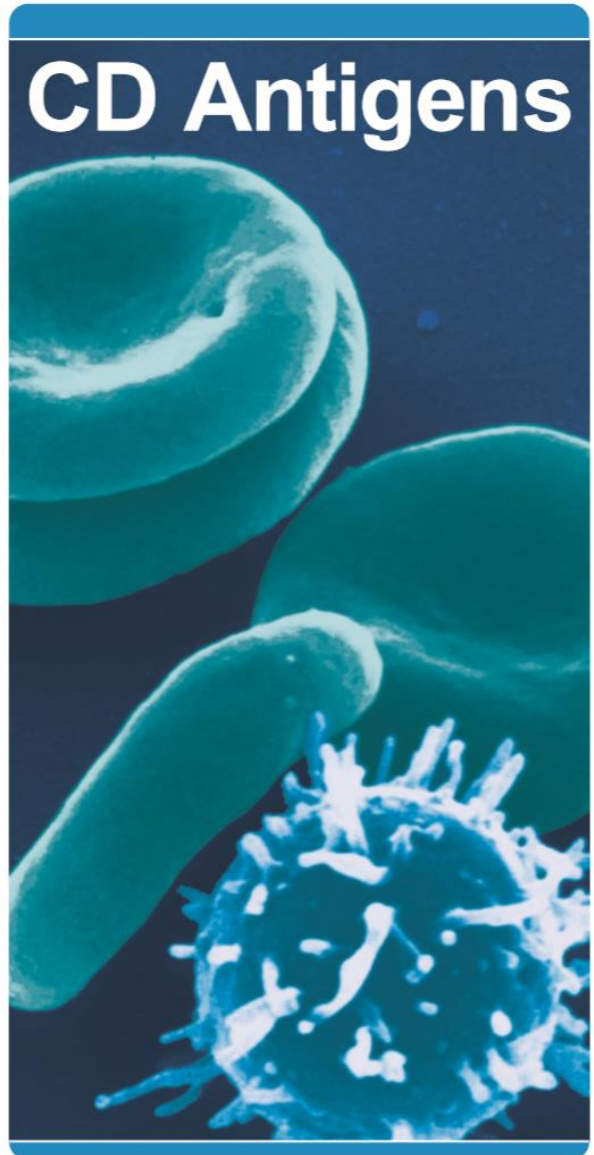
## Risikoanalyse med vurdering av sannsynlighet og konsekvens

I denne delen av rapporten presenteres detaljer dokumentasjon av de farer, uønskede hendelser og årsaker som er vurdert. Innledningsvis oppsummeres farer med tilhørende uønskede hendelser som er tatt med i vurderingen.

**Følgende farer og uønskede hendelser er vurdert i denne risikovurderingen:**

- **Prøvetakning**
  - Blødning
  - Stikkskade
  - Personskade
- **Reagens**
  - pHrodo
  - RPMI 1640 buffer
  - BD FACS lysing solution
  - Trypan blue
  - PBS
  - HBSS
  - SSC
  - HCl 2M
- **Thermo Scientific SL 40 FR Centrifuge**
  - Instrumentskade
- **BD Accuri C6 Flow Cytometer**
  - Instrumentskade
- **VWR Digital Heat Block**
  - Instrumentskade
  - Brannskade

**Vedlegg 2. Oversikt over CD-antigen fra ABCAM.**



**Text & Colour Key:**

<b>Text abbreviations:</b>		<b>Key to Conjugations:</b>	
Baso .....	Basophils	Text Colour	Conjugation
Endo .....	Endothelial cells		Allophycocyanin
Eos .....	Eosinophils		FITC
Epi .....	Epithelial cells		Phycoerythrin
Eryth .....	Erythrocytes		Biotin
ESC .....	Embryonic stem cells		Unconjugated
FDC .....	Follicular dendritic cells		
Fib .....	Fibroblasts		
Gran .....	Granulocytes		
HSC .....	Hematopoietic stem cells		
LK .....	Leukocytes		
Lph .....	Lymphocytes		
Mac .....	Macrophages		
MegK .....	Megakaryocytes		
Mono .....	Monocytes		
Neu .....	Neutrophils		
NK .....	Natural killer cells		
Plt .....	Platelets		
Tc .....	Cytotoxic T Cells		
Th .....	Helper T Cells		
Thy .....	Thymocytes		

<b>Key to Research Topics:</b>	
Text Colour	Topic
	Immunology
	Stem Cells
	Neuroscience
	Endothelial
	Cancer

[www.abcam.com/CDmarkers](http://www.abcam.com/CDmarkers)



**Abcam in the USA**  
 Abcam Inc  
 1 Kendall Square, Ste 341  
 Cambridge, MA 02139-1517  
 USA

Tel: 1 617-225-2272  
 Toll free: 1-888-77-ABCAM  
 Fax: 1-866-739-9884

**Abcam in Europe**  
 Abcam plc  
 330 Cambridge Science Park  
 Milton Road  
 Cambridge CB4 0FL  
 UK

Tel: +44 (0) 1223 696000  
 Fax: +44 (0) 1223 771600

**Abcam in Japan**  
 Abcam KK  
 1-16-8 Nihonbashi  
 Kajibaracho  
 Chuo-ku,  
 Tokyo 103-0014 Japan

Tel: +81-(0)3-6231-0940  
 Fax: +81-(0)3-6231-0941

Copyright © 2009 Abcam. All Rights Reserved. The Abcam logo is a registered trademark. All information/label is correct at time of going to print. Image: Scanning electron micrograph of rat blood cells. Courtesy of the Biomedical Imaging Unit, University of Southampton, UK







## Vedlegg 3.

# pHrodo™ Red and Green BioParticles® Conjugates for Phagocytosis

Table 1 Contents and storage

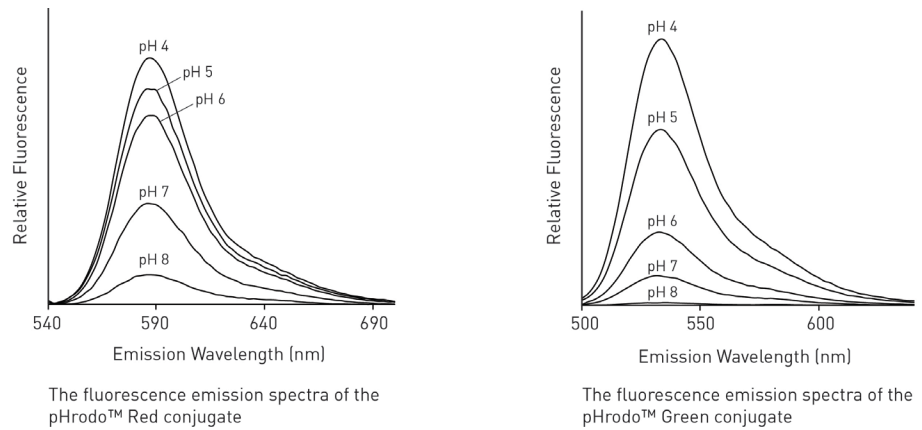
Material	Cat. no.	Amount	Ex/Em Maxima	Storage*
pHrodo™ Red <i>E. coli</i> BioParticles® Conjugate	P35361	5 vials each containing 2 mg lyophilized product	560/585 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≤-20°C</li> <li>• Desiccate</li> <li>• Protect from light</li> </ul>
pHrodo™ Green <i>E. coli</i> BioParticles® Conjugate	P35366		509/533 nm	
pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles® Conjugate	P35364	5 vials each containing 1 mg lyophilized product	560/585 nm	
pHrodo™ Green Zymosan A BioParticles® Conjugate	P35365		509/533 nm	
pHrodo™ Red <i>S. aureus</i> BioParticles® Conjugate	A10010	5 vials each containing 2 mg lyophilized product	560/585 nm	
pHrodo™ Green <i>S. aureus</i> BioParticles® Conjugate	P35367		509/533 nm	
* When stored as directed, the product is stable for at least 6 months.				
<b>Number of assays:</b> Sufficient for 100 assays when using described protocol.				

## Introduction

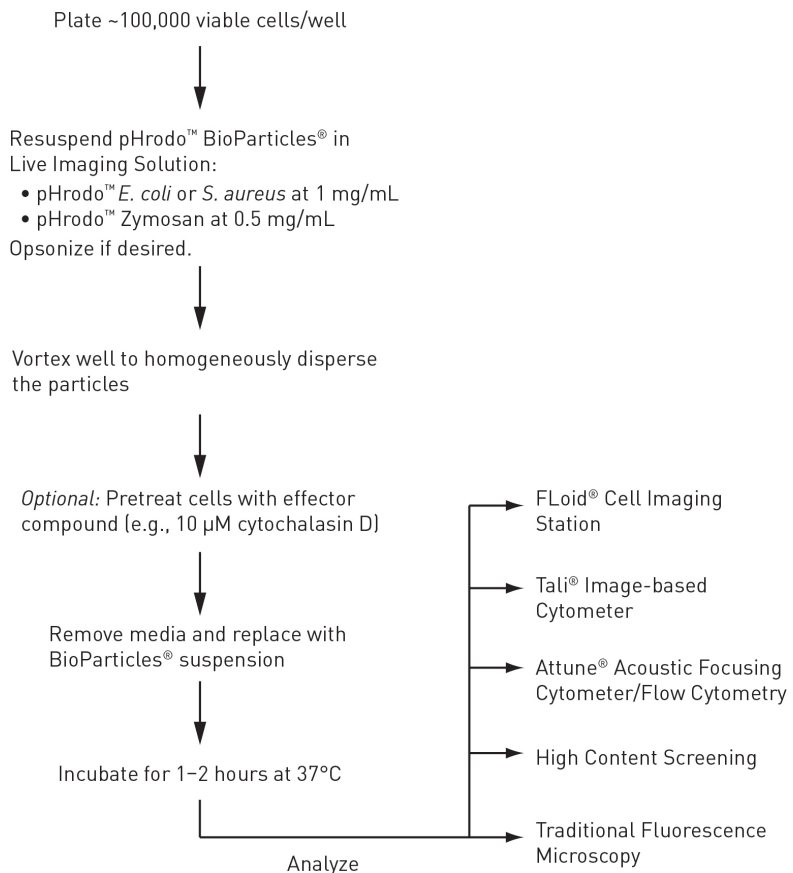
pHrodo™ BioParticles® Conjugates are novel, no-wash fluorogenic reagents developed for quantitative measurements of phagocytosis and its regulation by drugs, genetic, or environmental factors. With an optional no-cell background subtraction method, a large and specific signal is obtained from cells that ingest the particles, providing a specific index of phagocytosis with a variety of pretreatments or conditions. The unique pHrodo™-based system measures phagocytic activity based on acidification of the particles as they are ingested, eliminating the wash and quenching steps that are necessary with nonfluorogenic indicators of bacterial uptake.<sup>1-2</sup> To achieve this, the particles are conjugated to pHrodo™ dye, a novel, fluorogenic dye that dramatically increases in fluorescence as the pH of its surroundings becomes more acidic (Figure 1, page 2). We have included sufficient pHrodo™ BioParticles® Conjugate for ~100 wells in a 96-well format, with step-by-step instructions for performing this assay in a fluorescence microplate reader. With proper changes to the protocol, other plate formats can easily be adapted to platforms such as traditional imaging, high-content screening (HCS), high-throughput screening (HTS), fluorescent microplate reader, and flow cytometry. With proper settings, these reagents can also be adapted for bectop instruments, such as FLoid® Cell Imaging Station, Tali® Image-based Cytometer, and Attune® Acoustic Focusing Cytometer.

The methodology for this reagent's use was developed using adherent RAW and MMM (J774A.1) murine macrophage cells,<sup>2</sup> but can be adapted for use with other adherent cells, primary cells, or even cells in suspension.<sup>3</sup> Cells assayed for phagocytic activity with pHrodo™ BioParticles® conjugates may also be fixed with standard 2–4% paraformaldehyde solutions for later analysis, preserving differences in signal between control and experimental samples with high fidelity for up to 48 hours. pHrodo™ BioParticles® conjugate preparations are also amenable to opsonization (Cat. nos. E2870, S2860), which can greatly enhance their uptake and signal strength in the assay.

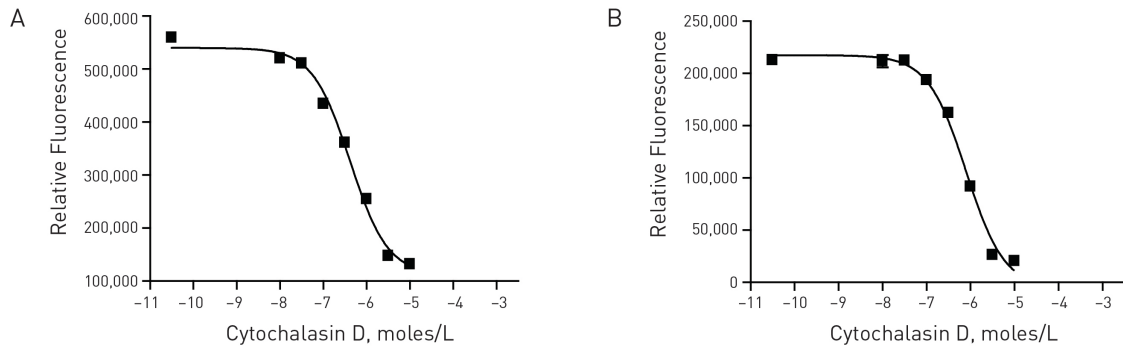
**Figure 1** The fluorescence emission spectra of pHrodo™ Red and pHrodo™ Green conjugates



**Figure 2** Workflow for pHrodo™ BioParticles® conjugates



**Figure 3** Effect of different concentrations of Cytochalasin D in MMM cells detected with **(A)** pHrodo™ Red E. coli BioParticles® or **(B)** pHrodo™ Green E. coli BioParticles® conjugates in RAW cells while using a fluorescent microplate reader (shown here without the background subtraction, with N=3, ± SEM).



## Before You Begin

### Materials Recommended but Not Provided

- Macrophage RAW and MMM cells cultured in cell growth medium. Other cell lines may also be used, if preferred.
- Uptake Buffer; we recommend using Live Cell Imaging Solution (Cat. no. A14291DJ) for best results. Alternatively, you may use any other appropriate buffer at pH 7.4.
- 96-well microplate or any other plate, with proper installment capable of detecting fluorescence according to emission/excitation maxima given in Table 1 (page 1).
- *Optional:* Opti-MEM® culture medium (Cat. no. 31985-062).
- *Optional:* Stock solutions of experimental effector compounds for testing their influence on phagocytosis (for example, cytochalasin D inhibits phagocytosis by inhibiting actin cytoskeletal rearrangements).

## Experimental Protocol

### Phagocytosis Assay Protocol

The following protocol describes an experimental test of phagocytic function with appropriate controls in a 96-well plate; however, other plate formats can be adopted with proper adjustments to the protocol. Cellular auto fluorescence background is determined with cells plated free of pHrodo™ BioParticles® Conjugates (but otherwise under control and experimental conditions), and reagent background fluorescence is determined using wells that contain the pHrodo™ BioParticles™ Conjugates but no cells. This protocol describes the use of one vial of particles, prepared at 1 mg/mL in the buffered saline solution of your choice. To minimize background fluorescence from non-ingested pHrodo™ BioParticles® Conjugate, we strongly recommend controlling the extracellular pH by adding Live Cell Imaging Solution (Cat. no. A14291DJ) for best results. Alternatively, you may use any other appropriate buffer at pH 7.4.

### Assay Controls

To minimize experimental errors, we recommend making measurements from a minimum of three replicates of positive control, experimental, and no-cell control samples, though the numbers of experimental and control wells can be adjusted as required to meet the needs of the particular study.

**Amount of BioParticles®** A single vial of pHrodo™ BioParticles® conjugate dilutes to 2 mL of volume that will be used in the assay, which is distributed across 20 wells. 100 µL of this suspension is used per sample well, including no-cell background controls. The average fluorescence value of these no-cell background control wells is subtracted from all cell-containing wells at the end of the assay to yield a cell-specific, net phagocytosis signal. Note that a large specific signal can readily be obtained with or without background subtraction, as shown in Figure 3, page 3.

### Preparing the Cells

- 1.1 Subculture the RAW or MMM macrophage cells (or preferred cell type) in complete medium for 3–4 days in advance of performing the assay.
- 1.2 On the day of the assay, harvest the cells from the culture plates and centrifuge the suspension. Resuspend the pellet in Opti-MEM® medium or preferred culture medium at 10<sup>6</sup> cells/mL. Scale your culture to aim for ~2 × 10<sup>6</sup> cells per vial of pHrodo™ BioParticles® Conjugate. Alternatively, cells can be plated into the 96-well plate a day or more in advance, with the aim of having 100,000 viable cells per well on the day of the assay.

If you are using cells other than RAW or MMM, you may need to determine optimal cell culture conditions and densities for your specific cell type. In general, better signals in the plate reader are obtained with maximal cell densities.

- 1.3 Plate the cells into a 96-well plate at 100,000 cells/well using 100 µL per well. We recommend plating your positive control and experimental wells in triplicate or greater. Be sure to leave one well empty of cells for every positive control well, so that a no-cell control background subtraction may be performed.

For example, plate four columns of four wells, leaving the fifth column of four empty for the no-cell control. Note that higher background fluorescence levels may be seen with acidic poly-D-lysine coated microplates.

- 1.4 Add 100 µL of Opti-MEM® medium or complete culture medium to the wells left aside for the no-cell background determination.
- 1.5 Cover the loaded microplate and allow the cells to settle and adhere to the microplate for at least one hour in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.
- 1.6 Prepare the experimental wells by adding the experimental phagocytosis effector (e.g., Cytochalasin D) at the desired concentrations, taking care to add vehicle controls to untreated wells. Note that the time and concentration of experimental effector pretreatment may vary greatly with the agent or treatment under study.

### Preparing the BioParticles® Conjugate

- 2.1 Thaw one vial each of the pHrodo™ BioParticles® fluorescent particles for every 20 wells to be tested. This number includes the no-cell control wells that will receive fluorescent particles, but no cells. Pipette 2 mL Uptake Buffer such as the Live Cell Imaging Solution (Cat. no. A14291DJ) into the vial containing lyophilized product and briefly vortex the solution to completely resuspend the particles so that you have 1 mg/mL for pHrodo™ *E. coli* or *S. aureus* BioParticles®, or 0.5 mg/mL for pHrodo™ Zymosan A BioParticles®.
- 2.2 Transfer the suspension into a clean glass tube and sonicate for 5 minutes, until all the fluorescent particles are homogeneously dispersed.

## Adding the Fluorescent Particles

- 3.1 After the cells have adhered and the phagocytosis effectors have been added, remove the culture medium from each of the microplate wells by vacuum aspiration.
- 3.2 Quickly replace the culture medium with 100  $\mu$ L of the prepared pHrodo™ BioParticles® suspension from step 2.2, adding it to the positive control, experimental, and no-cell background subtraction wells. Experimental effector solutions may be prepared ahead of time with separate vials of pHrodo™ BioParticles® suspension to keep them present throughout the assay.
- 3.3 Cover and transfer the microplate to an incubator warmed to 37°C for 1–2 hours to allow phagocytosis and acidification to reach its maximum. Although aseptic techniques have been used to produce pHrodo™ BioParticles® conjugates, these products are not sterile and incubation of more than 4 hours is not recommended. Do not use an elevated CO<sub>2</sub> cell culture incubator unless the Uptake Buffer in use has a bicarbonate buffering system, because elevated CO<sub>2</sub> levels will artificially acidify the buffer and elevate the background fluorescence.

## Fluorescence Measurements and Results

- 4.1 Scan or image all experimental, control, and no-cell control wells of the microplate in the fluorescence plate reader or any other appropriate fluorescent instrument using the appropriate settings according to the excitation and emission maxima given in Table 1, page 1.
- 4.2 If using a fluorescence plate reader, calculate the net phagocytosis and the response to the phagocytosis effector agent. Net phagocytosis is calculated by subtracting the average fluorescence intensity of the no-cell negative-control wells from all positive-control and experimental wells. The mean and standard deviation of the net positive control and net experimental wells should then be calculated. The phagocytosis response to the experimental effector (% Effect) can then be calculated as a fraction of the net positive control phagocytosis as follows:

$$\% \text{ Effect} = \frac{\text{Net experimental phagocytosis} \times 100\%}{\text{Net positive control phagocytosis}}$$

## References

---

1. J Immunol Methods 60, 115 (1983); 2. J Immunol Methods 162, 1 (1993); 3. J Biol Chem 273, 14813 (1998); 4. Methods Enzymol 58, 141 (1979).

**Product List** Current prices may be obtained from our website or from our Customer Service Department.

Cat #	Product Name	Unit Size
A10010	pHrodo™ Red <i>S. aureus</i> BioParticles® conjugate for phagocytosis	5 × 2 mg
P35361	pHrodo™ Red <i>E. coli</i> BioParticles® conjugate for phagocytosis	5 × 2 mg
P35364	pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles® conjugate *for phagocytosis*	5 × 1 mg
P35365	pHrodo™ Green Zymosan A BioParticles® conjugate *for phagocytosis*	5 × 1 mg
P35366	pHrodo™ Green <i>E. coli</i> BioParticles® conjugate *for phagocytosis*	5 × 2 mg
P35367	pHrodo™ Green <i>S. aureus</i> BioParticles® conjugate *for phagocytosis*	5 × 2 mg
<b>Related Products</b>		
P10361	pHrodo™ Red dextran, 10,000 MW *for endocytosis*	0.5 mg
P35368	pHrodo™ Green dextran, 10,000 MW *for endocytosis*	0.5 mg
P36600	pHrodo™ Red, succinimidyl ester (pHrodo™ Red, SE)	1 mg
P35370	pHrodo™ Green C <sub>2</sub> -maleimide	1 mg
P35371	pHrodo™ Red C <sub>2</sub> -maleimide	1 mg
A10025	pHrodo™ Red <i>E. coli</i> BioParticles® Phagocytosis Kit *for flow cytometry* *100 tests*	1 kit
A10026	pHrodo™ Red Phagocytosis Particle Labeling Kit *for flow cytometry* *100 tests*	1 kit
P35362	pHrodo™ Red Avidin *Fluorogenic pH sensor*	1 mg
P35363	pHrodo™ Red Microscale Labeling Kit *Fluorogenic pH sensor* *3 labelings*	1 kit
A14291DJ	Live Cell Imaging Solution	500 mL
R37602	Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit	1 kit
R37603	BackDrop™ Background Suppressor *for live cells*	1 kit
R37605	NucBlue™ Live Cell Stain *Hoechst 33342 special formulation*	1 kit
R37606	NucBlue™ Fixed Cell Stain *DAPI special formulation*	1 kit
E2870	<i>Escherichia coli</i> BioParticles® opsonizing reagent	1 unit
S2860	<i>Staphylococcus aureus</i> BioParticles® opsonizing reagent	1 unit

**Related Platforms**



Attune® Acoustic Focusing Cytometer  
(Cat. no. 4469120)



Tali® Image-based Cytometer  
(Cat. no. T10796)



FLoid® Cell Imaging Station  
(Cat. no. 4471136)

# Purchaser Notification

---

## Corporate Headquarters

5791 Van Allen Way  
Carlsbad, CA 92008  
USA  
Phone: +1 760 603 7200  
Fax: +1 760 602 6500  
Email: techsupport@lifetech.com

## European Headquarters

Inchinnan Business Park  
3 Fountain Drive  
Paisley PA4 9RF  
UK  
Phone: +44 141 814 6100  
Toll-Free Phone: 0800 269 210  
Toll-Free Tech: 0800 838 380  
Fax: +44 141 814 6260  
Tech Fax: +44 141 814 6117  
Email: euroinfo@invitrogen.com  
Email Tech: eurotech@invitrogen.com

## Japanese Headquarters

LOOP-X Bldg. 6F  
3-9-15, Kaigan  
Minato-ku, Tokyo 108-0022  
Japan  
Phone: +81 3 5730 6509  
Fax: +81 3 5730 6519  
Email: jpinfo@invitrogen.com

Additional international offices are listed at  
[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

These high-quality reagents and materials must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Read the Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

## Obtaining Support

For the latest services and support information for all locations, go to [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com).

At the website, you can:

- Access worldwide telephone and fax numbers to contact Technical Support and Sales facilities
- Search through frequently asked questions (FAQs)
- Submit a question directly to Technical Support ([techsupport@lifetech.com](mailto:techsupport@lifetech.com))
- Search for user documents, SDSs, vector maps and sequences, application notes, formulations, handbooks, certificates of analysis, citations, and other product support documents
- Obtain information about customer training
- Download software updates and patches

## SDS

Safety Data Sheets (SDSs) are available at [www.lifetechnologies.com/sds](http://www.lifetechnologies.com/sds).

## Certificate of Analysis

The Certificate of Analysis provides detailed quality control and product qualification information for each product. Certificates of Analysis are available on our website. Go to [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support) and search for the Certificate of Analysis by product lot number, which is printed on the product packaging (tube, pouch, or box).

## Limited Product Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.lifetechnologies.com/termsandconditions](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

## Disclaimer

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

## Limited Use Label License: Research Use Only

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com) or Out Licensing, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) or their respective owners.

©2013 Life Technologies Corporation. All rights reserved.



## Vedlegg 4.

### Reagensliste for flowcytometri av Fagocytose

<b>Produktnavn</b>	<b>Leverandør</b>	<b>Referanse nr.</b>	<b>Lot nr.</b>
Flow Cytometer Fluid Kit	BD Biosciences	653158	18 1556540
GIBCO® Hanks' Balanced Salt Solution 1X	Thermofisher	14025-050	1189009
Invitrogen™ PBS (Phosphate-Buffered Saline) Tablets	Thermofisher	003002	73545917A
Lysing Solution 10X Concentrate	BD Biosciences	349202	3340517
PE CD16 Monoclonal Antibody (clone B73.1)	Thermofisher	12-0167-42	1978781
PE-Cy 7 Mouse Anti-Human CD45	BD Biosciences	557748	5254739
pHrodo™ Green E. coli Bioparticles® Conjugate	Thermofisher	P35366	2011575
RPMI Medium 1640 (1X) + Glutamax™	Gibco	61870-010	2026845
SSC buffer (20X) for molecular biology	AppliChem	A1396	2G006091
Spherotech 8-Peak Validation Beads	BD Biosciences	653144	AAD05
Spherotech 6-Peak Validation Beads	BD Biosciences	653145	AAD03
Trypan Blue Solution 0,4 %	Merck (Sigma)	T8154	RNBC4820

## Vedlegg 5.

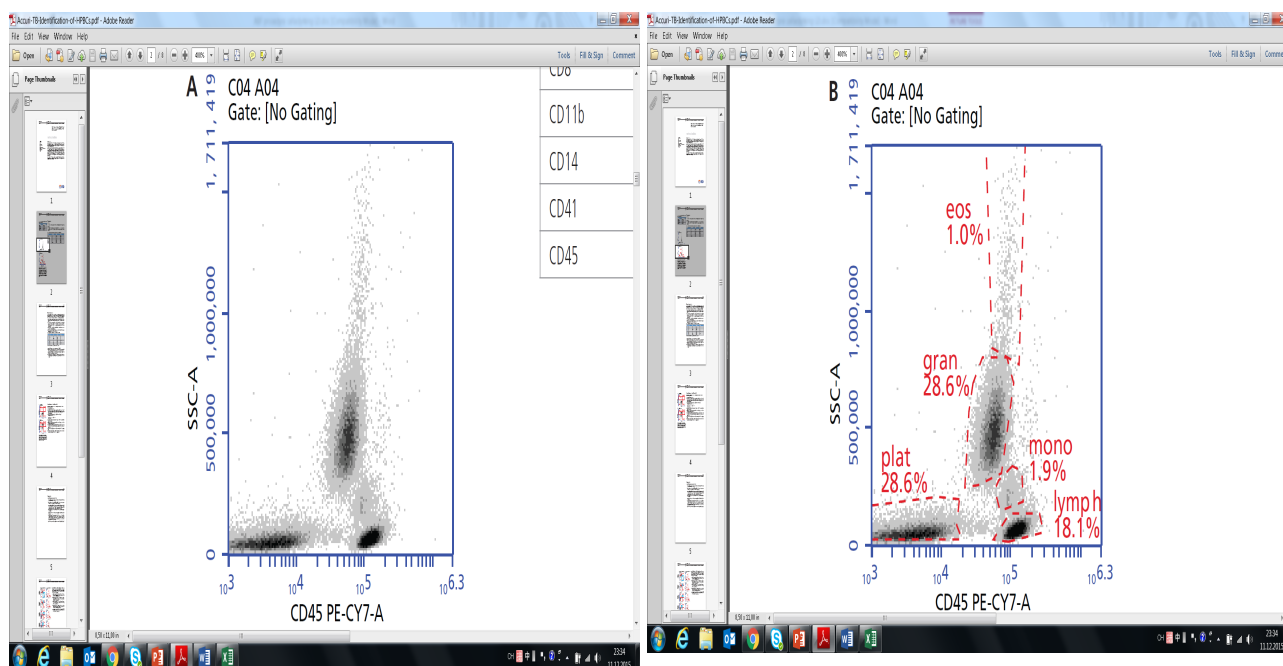
### Identifisering av blodplater, monocyttter og granulocytter i humant blod på BD Accuri™ C6 Flow Cytometer

#### Introduksjon

En vanlig oppgave når en analyserer humant blod, er å identifisere de forskjellige cellepopulasjonene. Det kan være blodplater, lymfocytter, monocyttter, granulocytter og eosinofile celler. Eller for eksempel skille B-lymfocytter fra T-lymfocytter. Flowcytometer er en rask og god metode for å identifisere disse populasjonene basert på deres immunfenotype. Altså bruke antigendeterminanter som en kan identifisere ved å bruke antistoffer som er merket med fluoroforer.

Flere egenskaper med BD Accuri™ C6 flowcytometer gjør det egnet for en differensialanalyse av celler i humant blod (figur 1). Detektorene gjør det egnet for datasamling, og instrumentet har et stor dynamisk område som gjør det enkelt å analysere populasjoner som varierer i størrelse i samme datafil. Programvaren har også et Zoom verktøy som gjør det enkelt å sette nøyaktige «gater».

Denne prosedyren viser en metode for å skille blodplater fra monocyttter og granulocytter på BD Accuri C6.



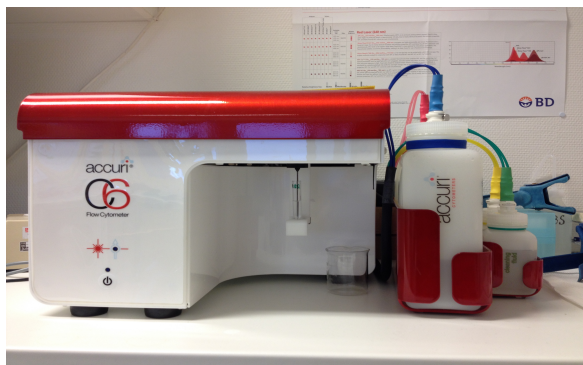
Figur 1. Identifisering av humane perifere blodcellepopulasjoner på BD Accuri C6.

A. Fullblod ble farget, røde blodlegemer ble lysert, og data samlet ved hjelp av programvaren til BD Accuri C6. Programvaren viser ikke-gatede plot av CD45 PE-Cy7 versus SSC-A. B. Her er det tegnet inn gater og disse ble tilpasset ved å bruke Zoom verktøyet for fem cellepopulasjoner; eosinofile (eos), blodplater (plat), T-lymfocytter (lymph), monocyttter (mono) og granulocytter (gran).

**Øvelsen er kun en demonstrasjon. Vi vil gjennomføre oppstart og kvalitetskontroll. Legger ved fremgangsmåte for hele prosedyren.**

## Utstyr og reagenser:

BD Accuri™ C6 Flow Cytometer



- Sentrifuge
- Polystyrenrør med rund bunn
- EDTA-blod
- PBS (fosfatbufret saltvann) – vaskebuffer
- Antistoffer til merking av ønskede markører

## Fremgangsmåte:

### Forberedelse av prøver

NB! Gjør all pipettering så nøyaktig som mulig, bytt pipettespiss mellom hver pipettering.

Ta en blodprøve på glass med tilsetning av EDTA, og sørg for at dette er godt blandet før du pipetterer fra glasset. Oppbevares ved RT.

Tabell 1 viser anbefalte antistoffer og kombinasjoner, for å identifisere dine cellepopulasjoner. Merk rørene i forhold til tabellen.

Tabell 1

Rør	FITC	PE	PE-Cy7	APC
1	-	-	-	-
2	CD41	-	CD45	-
4	-	-	CD45	-
8	CD14	CD11b	CD45	-

Blodplater er altså positiv for CD41+ og CD45-. Granulocytter er CD14-, CD11b+ og CD45+. Monocytter er CD14+, CD11b+ og CD45+.

1. Tilsett 100 µL fullblod til merket polystyrenrør.

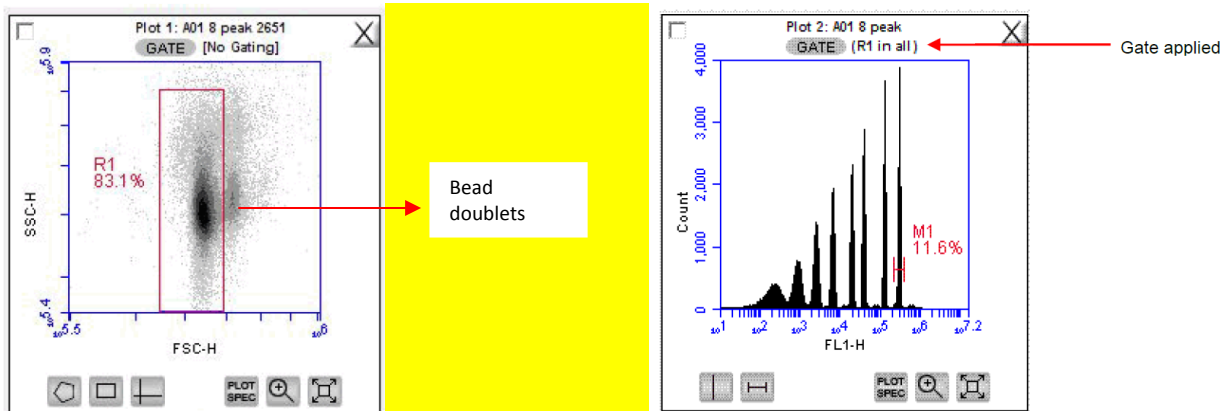
2. Tilsett 5 $\mu$ L av hvert fluorokromkonjugert monoklonale antistoff til rør jamfør tabellen over.
3. Vortex forsiktig og inkuber i 20 minutter i mørket ved RT (romtemp. 20° to 25°C).
4. Etter inkubering tilsettes 500  $\mu$ L 1X FACS Lysing Solution.
5. Vortex forsiktig og inkuber i 10 minutter i mørket ved RT.
6. Sentrifuger ved 1200 rpm i 5 minutter. Fjern supernatant forsiktig.
7. Tilsett 2 to 3 mL PBS og sentrifuger ved 1200 rpm i 5 minutter. Fjern supernatant.
8. Tilsett 500  $\mu$ L PBS og miks skikkelig. Lagre prøven ved 2° to 8°C til den analyseres.

**Oppstart og kvalitetskontroll (vask og kalibrering)**

1. Slå på instrumentet. Det krever minst 10 minutters oppvarming.
2. Åpne filen kalt Wash and Validation template. Dette er programmet for oppstart og klargjøring av instrumentet. Følg de anvisninger som er oppgitt for prøve A1 til A5. Start på A1...legg inn oppgitte parametere.
3. Før du starter må du lage til 6-peak beads og 8-peak beads. Følg bruksanvisningen for dette. I tillegg trenger du ionefritt vann og decon solution.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

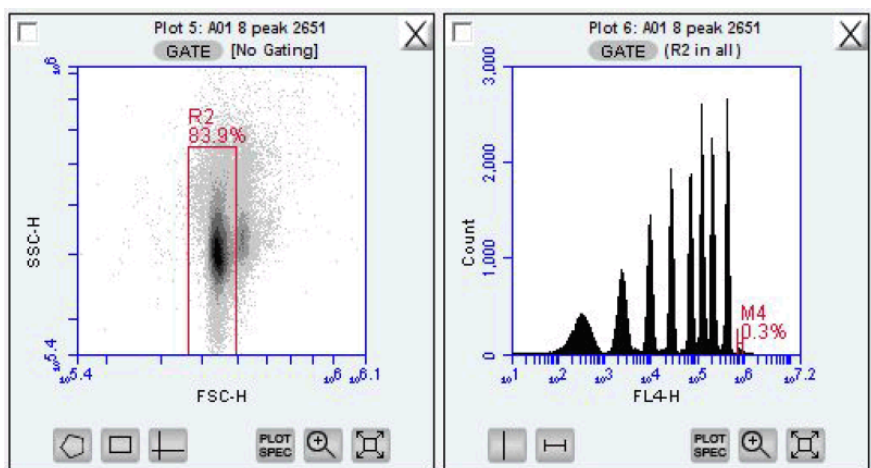
4. Sjekk om parameterne er innenfor angitte grenser.



Plasser R1 gate som eksempelet til venstre viser (ikke ta med doublets), og verifiser at der står «R1 in all» på plot2.

Mål CV til toppen lengst til høyre på plot 2,3 og 4. Sammenlign med leverandørens plot (bildet). Det skal være 8 adskilte topper i plot for FL1-H og FL2-H, samt minst 6 topper i FL3-H. Toppenes CV skal være mindre enn 5%.

Tilsvarende vurderes for 6-peak beads. Her skal en ha 6 topper, samt at en måler CV for toppen helt til høyre. Som en ser valideres FL4-H her.

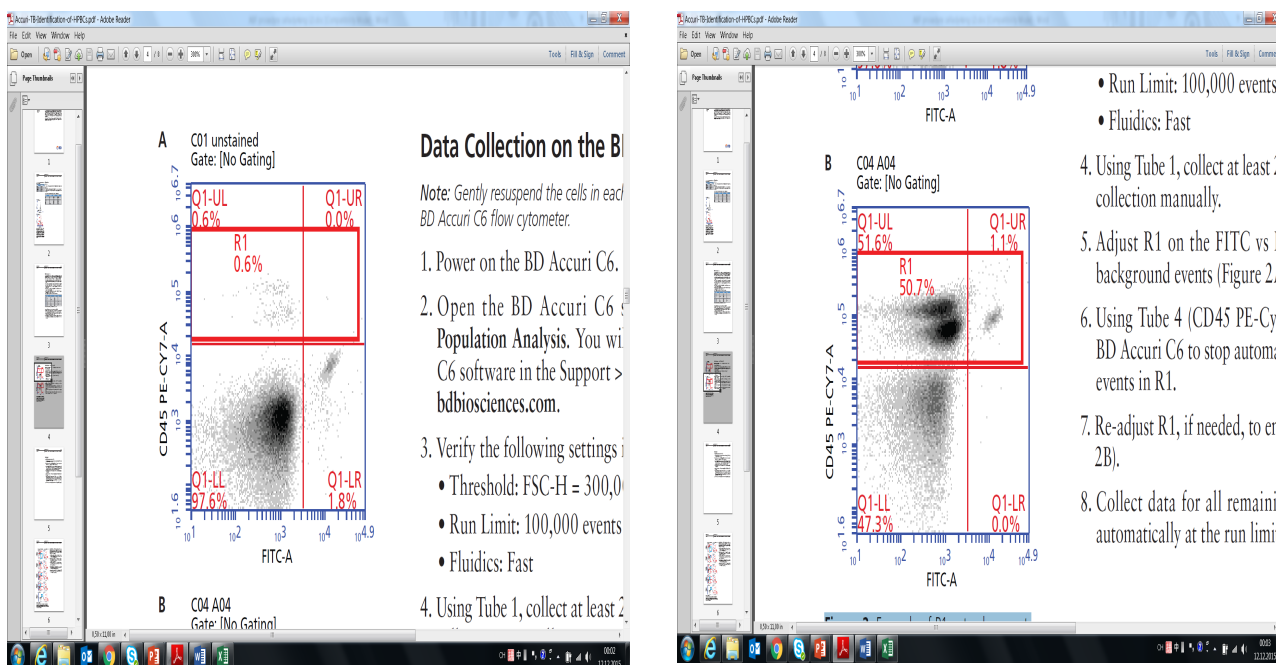


Lagre datafilen med dagens dato og klokkeslett. Da det samme skal gjøres etter analyse og lagres på samme måte. Dette benyttes for å monitorere instrumentet.

### Analysering av prøve/samle data

Note: Resuspender prøvene dine forsiktig før aspirering i instrumentet.

1. Åpne templat fil ..... for din analyse.
2. Verifiser følgende innstillinger er satt i «Collect Tab Control Panel»:
  - Threshold: FSC-H = 300,000
  - Run Limit: 20,000 events in R1
  - Fluidics: Fast
3. Start med rør 1 i kanal C1 (umerkede celler). Samle 10,000 events totalt, og trykk Pause manuelt.
4. Juster R1 på FITC vs PE-Cy7 plotet til å inneholde mellom 0% and 5% bakgrunns events (Figur 2A).
5. Bruk rør 4 i kanal C4 (CD45 PE-Cy7 positiv), og samle data i en ny kanal. Legg inn limit på 10000 events i R1, slik at instrumentet stopper automatisk her.
6. Rejuster R1, hvis nødvendig, for å inkludere den CD45 PE-Cy7 positive populasjonen (Figur 2B).
7. Samle data for gjenværende prøver, der en setter limit til 10000 events per rør i R1.



**Figur 2.** Eksempel på plassering av R1 gate. R1 gate (red boks) inkluderer UL (upper left) og UR (upper right) kvadrantene i FITC vs PE-Cy7 plotet.

A. I punkt 4, bruk rør 1 for å justere R1 for bakgrunn fra PE-Cy7. B. I punkt 6, bruk rør 4 for å justere R1 for å inkludere den CD45 PE-Cy7 positive populasjonen. See Table 2 for tube descriptions.

## Data Analyse

1. Verifiser kompenseringverdier for fluorescens.
  - a. Åpne «Set Color Compensation».
  - b. Sett kompenseringverdiene til verdiene gitt i figurene under.
  - c. Sett kompenseringverdiene til verdiene gitt i figurene under.
  - d. Velg «Apply & close».
2. Verifiser plasseringen av dine populasjoner på CD45 PE-Cy7 vs SSC plot (Plot 3) ved å backgate på hver populasjon's markør ved å bruke følgende prosedyre (figur 3). Bruk Zoom Tool ved behov for å tilpasse populasjonens gate.

**ANALYSEPROSEDYRE  
IBA**

Dato  
14.01.2015

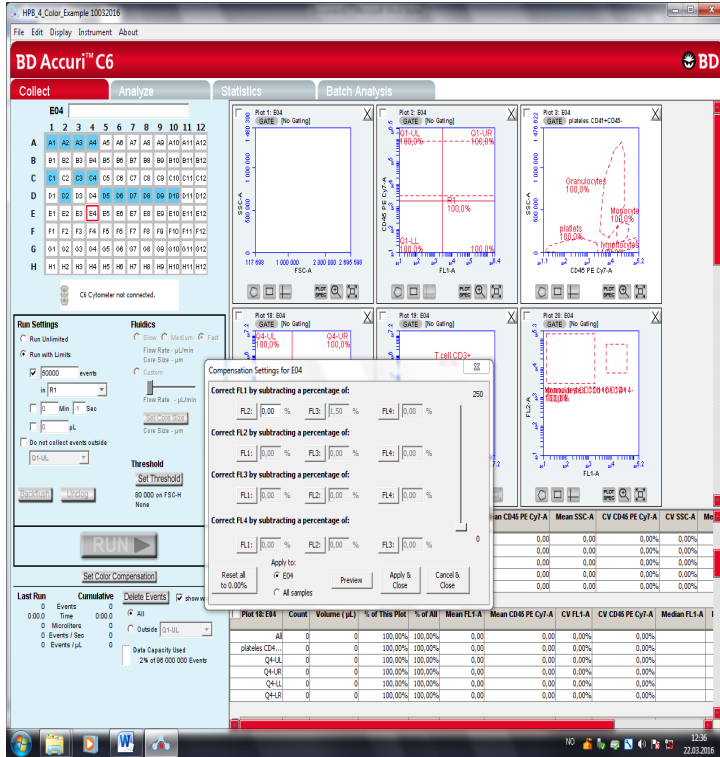
Sist revidert Side  
21.04.2016

Utarbeidet av (sign)  
Yanran Cao

Godkjent av (sign) Gyldig fra

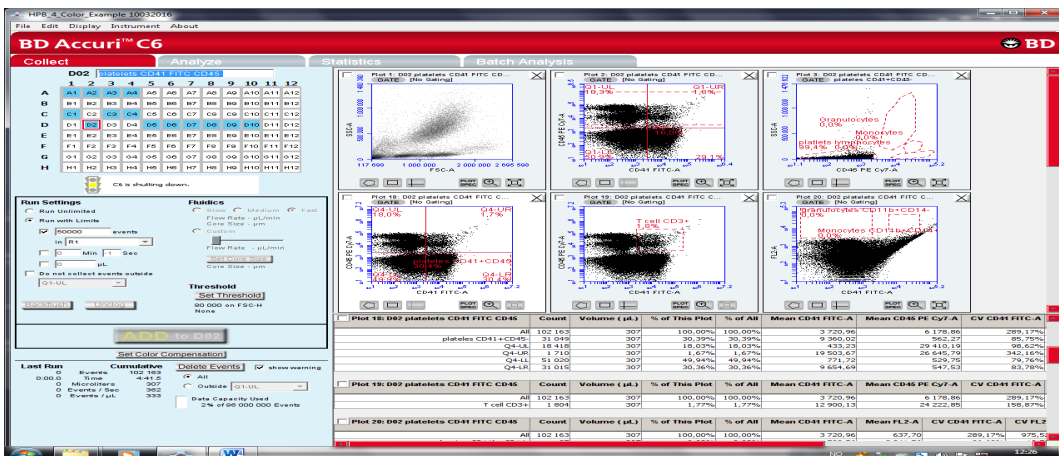
Rev. Nr.  
1

---

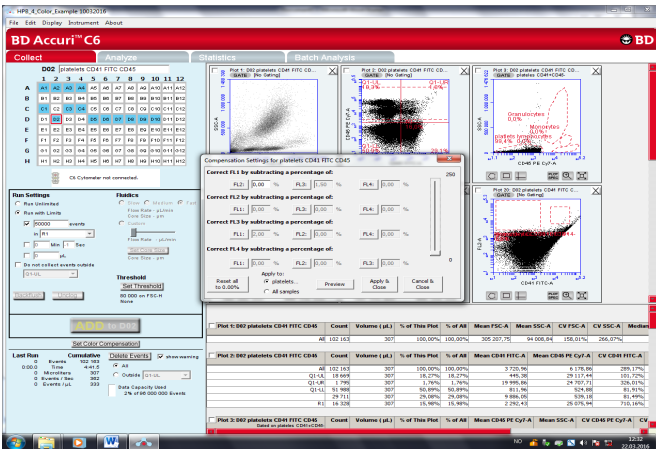
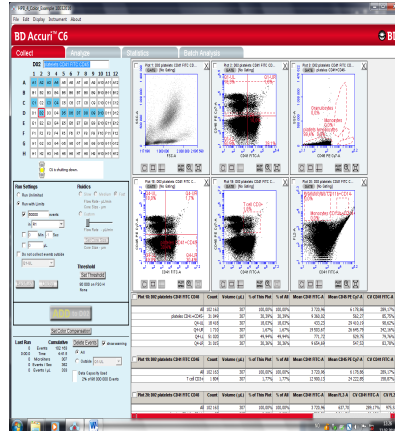
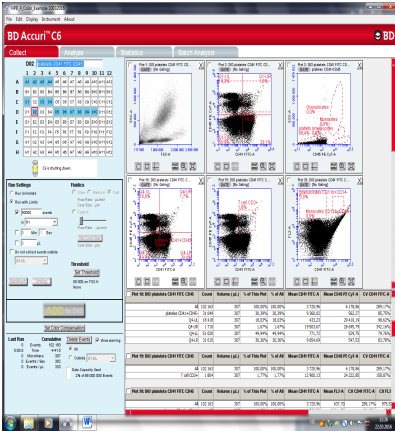


3.

- Blodplater: Bruk data fra rør D2 for å gate CD41+CD45- celler (Figur 3A) til Plot 3 (CD45 vs SSC), og tilpass platelet gate.
- Monocytytter: Bruk data fra rør D8 for å gate CD11b+CD14+ celler (Figur 3B) til Plot 3, og tilpass monocytt gate.
- Granulocytytter: Bruk data fra rør D8 for å gate CD11b+CD14- celler (Figur 3C) til Plot 3, and tilpass granulocyt gate.

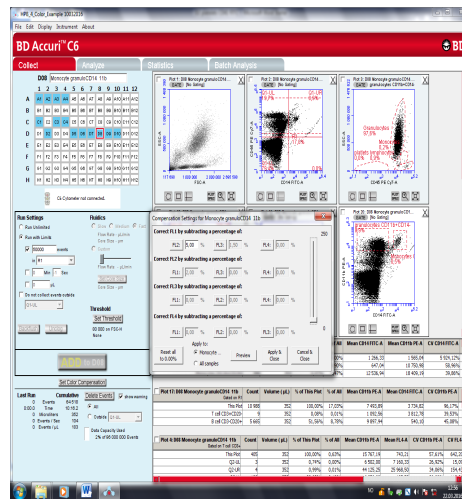
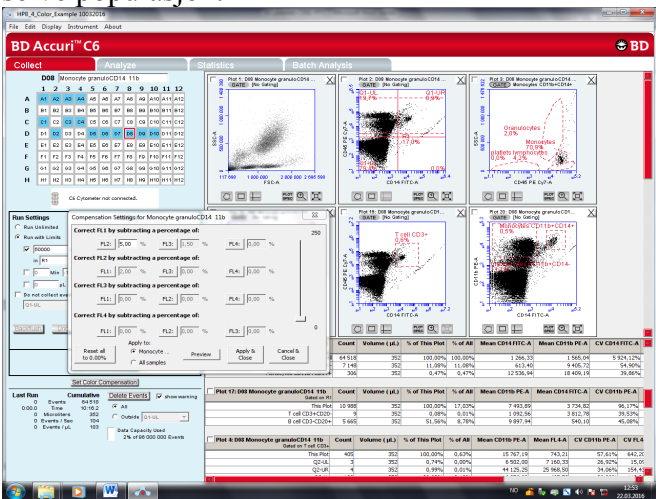


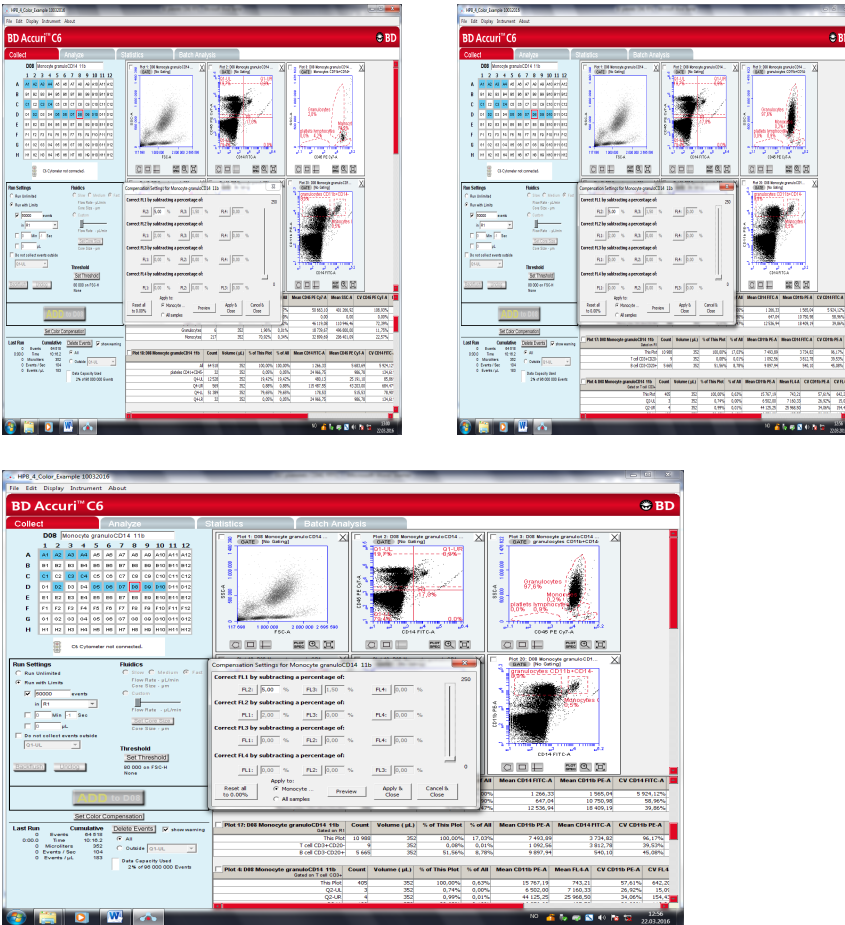




**Figur 3A. Blodplater (CD41+ CD45-)**  
**(Data D2: CD41 FITC CD45 PE Cy-7)**

Populasjonen identifiseres først ved hjelp av en overflatemarkør, som hjelp for å tilpasse polygonene for CD45 vs SSC populasjon identifisering. Plot 18. "Backgating" på overflatemarkør eller autofluorescens egenskaper for å identifisere spesifikke populasjoner. Plot3: CD45 vs SSC profilen av hver identifiserer selve populasjon.





**Figur 3B og 3C. Monocyttler (CD14+CD11b+ CD45+) og Granulocyttler (CD14- 11b+ CD45+) (Data D8: CD14FITC CD11bPE CD45 PE Cy-7)**

Populasjonen identifiseres først ved hjelp av en overflatemarkør, som hjelp til å tilpasse polygonene for CD45 vs SSC populasjon identifisering. Plot 20. "Backgating" på overflatemarkør eller autofluorescens egenskaper for å identifisere spesifikke populasjoner. Plot3: CD45 vs SSC profilen av hver identifiserer selve populasjon.

## Vedlegg 6.

### Egenutviklet metode for påvisning av fagocytose i leukocytter ved hjelp av flowcytometri

#### Forberedelser:

1. Løs opp et rør med Green E. coli Conjugate 2 ml i RPMI 1640, evt HBSS. Vortex i minst 1 minutt. Dette gir nok konjugat til 100 reaksjoner, og kan lagres i kjøleskap i 3-5 dager. Ferdig konjugat settes på is minst 10 minutter før bruk.
2. Ta blodprøve i EDTA-rør, eller i et annet fullblodsglass. Blodprøven kan lagres i opptil 12 timer ved 4 grader celsius. Blodprøven settes på is minst 10 minutter før bruk.
3. Varm opp varmeplate til 37 grader.
4. Forbered sterile 4 ml rør, 1 rør per prøve. Legg til kontrollene 'Negativ kontroll', 'Konjugat-kontroll' og 'Is-kontroll'.
5. Kalibrer flowcytometeret. Kjør eventuelle kontroller.

#### Fagocytosereaksjon:

6. Tilsett 50 µL fullblod i rørene som angitt under.
7. Tilsett 20 µL ferdig konjugat til rørene som angitt under.

	<b>50µl fullblod</b>	<b>20µl konjugat</b>
Negativ kontroll	Ja	Nei
Konjugat kontroll	Nei	Ja
Is-kontroll	Ja	Ja
Prøve	Ja	Ja

8. Sett prøvene og negativ kontroll i et stativ i varmebad. Pass på at dette kan tas opp slik at alle prøver og kontroller fjernes fra badet samtidig. Her skal de stå i 30 minutter. Kontrollen is-kontroll settes på is istedenfor i varmebad.

9. Etter inkubering settes alle prøver og kontroller på is for å stoppe fagocytosereaksjonen.

### **Lysering:**

10. Tilsett 1 ml BD lysesbuffer i alle rørene. Vortex raskt og la det stå i 5 minutter i romtemperatur.
11. Tilsett 1 ml PBS, vortex raskt, og la det stå i 5 minutter i romtemperatur.
12. Sentrifuger ved 350 x g i 5 minutter i romtemperatur.
13. Fjern supernatanten. Tørk av eventuell overflødig væske.
14. Tilsett 1 ml PBS. Gjenta steg 12 og 13.

### **Farging av overflateantigen:**

15. Tilsett 5  $\mu$ L PE-Cy7 anti-CD45, og eventuelle andre antistoffer, til alle rør unntatt konjugat kontroll.
16. Vortex kort, deretter inkuberes prøvene + kontrollene i 20-30 minutter i mørket ved romtemperatur.
17. Vask prøver og kontroller med 0,5 ml PBS og sentrifuger ved 350 x g i 5 minutter.
18. Supernatanten fjernes, og det tilsettes 0,5 ml PBS.
19. Gjenta steg 17.
20. Fjern supernatanten og tilsett 0,25 ml PBS.

Prøvene kan nå analyseres på flowcytometeret. Ved lang ventetid lagres de kjølig ved 2-8 grader, men de bør analyseres innen en time.

