

10028
10035

Optimalisering av ELISA Neogen-kit for måling av kortisol i fiskeplasma

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Cao, Yanran og Tveten, Ann-Kristin

Mai 2019

10028

10035

Optimalisering av ELISA Neogen-kit for måling av kortisol i fiskeplasma

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Cao, Yanran og Tveten, Ann-Kristin
Mai 2019

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

Sammendrag

Stressresponser representerer dyrets reaksjon i utfordrende situasjoner og blir brukt som en velferdsindikator. Kortisol er relevant for fiskevelferd og er en ofte målt komponent fra det primære stressresponssystemet. Målet for bacheloroppgaven er å se om vi kunne forenkle Neogen-kittet, ved å erstatte ekstraksjonstrinnet med SDR fra Enzo-kittet. Problemstillingen for oppgaven er «Kan Neogen-kittet forenkles, og samtidig beholde nøyaktigheten i måling av kortisol?». Det er viktig å kvalitetssikre at resultatene fra forsøket er repeterbare ved å sjekke korrelasjonen mellom to plater. Både ekstraherte- og ikke-ekstraherte prøver viste korrelasjon mellom platene. Deretter optimaliserte vi ekstraheringsmetoden der ekstraheringsvarianten med to minutt blanding ble utvalgt. Det neste trinnet var en stresstest, hvor en testet de ulike metodene med samme prøver fra fisk før og under stresspåvirkning. Testen gir en sterk antydning på forskjell i kortisolnivå mellom før og under stress. Til slutt så en etter korrelasjon og forskjeller mellom den ekstraherte og ikke-ekstraherte metoden, dette viser om det er mulig å forenkle Neogen-metoden og samtidig beholde den nøyaktige kortisolmålingen. Resultatet viste korrelasjon mellom metodene og at prosessen ble forenklet, samt en unngår ekstrakostnadene for Enzo-kittet. Imidlertid er det også en forskjell mellom metodene siden null-hypotesen ble forkastet pga. lavere konsentrasjon hos ikke-ekstraheringsmetoden. Fremtidige studier burde fokusere på å finne en SDR som er mer kompatibel med Neogen-kittet. Det anbefales også å bruke flere prøver for å få en tydeligere variasjon mellom gruppene og unngå at ekstremverdier påvirker resultatet negativt. En burde også finne den optimale fortynningen som gir resultat under 10 ng/ml for kortisol i fiskeplasma, for fullstendig nøyaktig avlesing av resultat.

Forord

Det har de siste årene blitt rettet mer oppmerksomhet mot dyrevelferd, og herunder fiskevelferd. Oppgaven vår «Optimalisering av ELISA-metode for nøyaktig måling av kortisol i fiskeplasma» er gjennomført ved NTNU i Ålesund. Den går ut på å prøve å forenkle en metode for måling av kortisol i fiskeplasma. Det å få være med på å optimalisere metoder ved å forenkle trinn i prosedyren har vært spennende da resultatet er knyttet opp til et dagsaktuelt tema. Det er også interessant at bioteknologiske metoder kan brukes for måling av ulike velferdsindikatorer hos oppdrettslaks og andre fiskearter.

Selve prosessen både på laboratoriet og skriveprosessen har i noen stunder vært krevende, men også lærerikt da vi har fått jobbet med noe som gir relevant kunnskap til fremtidige studier. Vi vil gjerne rette en stor takk til vår primære veileder Yanran Cao og sekundære veileder Ann-Kristin Tveten for hjelp og gode forslag underveis, både med laboratoriearbeid og i skrivearbeidet. Takk til våre nærmeste for støtte og gode tilbakemeldinger gjennom denne prosessen. Vi vil også takke NTNU i Ålesund for økonomisk støtte og bruk av deres laboratorier.

Ålesund, Mai 2019.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	i
Forord	ii
1 INNLEDNING	1
1.1 Målet for oppgaven	1
2 TEORI	2
2.1 Fiskevelferd	2
2.1.1 Stressrespons hos fisk	3
2.2 Syntese av kortisol	4
2.2.1 Kortisol	6
2.3 Metoder for å måle kortisol i plasma	6
2.3.1 Enzyme linked immunoabsorbant assay (ELISA)	7
2.3.2 ELISA formater	7
2.3.3 Radioimmunoassay (RIA) og High pressure Liquid Chromatography (HPLC)	9
3 MATERIALE OG METODER	11
3.1 Innhenting av prøver	11
3.1.1 Notspyling	12
3.2 Ekstraksjon av prøver	13
3.3 NEOGEN-prosedyre ekstraksjonsmetode	14
3.3.1 ENZO-prosedyre ikke-ekstraksjonsmetode	14
3.3.2 Kryssreaksjon	15
3.4 Tilleggsmaterialer	15
3.4.1 Nitrogenavdamper	15
3.4.2 Plateleser	16
3.4.3 Forarbeid	16
3.5 Statistiske metoder	16
4 RESULTAT	18
4.1 Standardkurver	18
4.2 Korrelasjon og forskjeller mellom plater	19
4.2.1 Korrelasjon og forskjeller mellom ekstraksjonsmetoden på plate 1 og 2	20
4.2.2 Korrelasjon og forskjeller mellom ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 1 og 2	20
4.3 Forskjeller mellom gruppene før stress (F) og under stress (U)	21
4.3.1 F og U gruppene for ekstraksjonsmetoden på plate 1	21
4.3.2 F og U gruppene for ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 1	22
4.3.3 F og U gruppene for ekstraksjonsmetoden på plate 2	23
4.3.4 F og U gruppene for ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 2	24

4.4 Forskjeller og korrelasjon mellom metoder.....	25
4.4.1 Forskjeller mellom ekstraksjonsmetoden og ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 1	25
4.4.2 Forskjeller mellom ekstraksjonsmetoden og ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 2	27
5 DISKUSJON	28
6 KONKLUSJON.....	31
7 REFERANSELISTE	33
8 VEDLEGG	I
8.1 Korrelasjonstest	I
8.2 Hypotesetest	III
8.3 Uavhengig hypotesetest.....	IV
8.4 Beregnet konsentrasjoner fra metode sammenligningen	V
8.5 NEOGEN-prosedyre	VI
8.6 ENZO-prosedyre	XIII

1 INNLEDNING

Mennesker har påvirket artene rundt seg i tusenvis av år, og fisk blir ofte sett på som et mindre evolusjonært utviklet virveldyr sammenlignet med pattedyr og fugler. Dette kan gi konsekvenser med tanke på fiskevelferd. Samtidig har dyrevelferd blitt et viktigere tema i dagens samfunn og som konsekvens har det blitt en økt interesse for fiskevelferd (1). Spesielt innenfor akvakultur og forskning er temaet relevant, da man er opptatt av å forsikre at fiskens velferd blir tatt hensyn til og ikke er truet av oppdrettsnæringens vekst. For at fisk sin individuelle velferdstilstand skal være positiv, burde dette være en direkte effekt av aktivisering av dens hedoniske belønningssystem. Likevel er det ikke godt nok kjent hvordan en fisk mentalt opplever og kommer seg etter plutselige miljøsvingninger, og hvordan dette korrelerer med deres fysiologiske håndteringsmekanismer (2). Det er en økende interesse for å forbedre fiskevelferd som korrelerer med veksten av akvakultur. For optimal trivsel og vekst vil oppdrettsanlegg bli nødt til å gi fisken ideelle forhold. Uten optimale forhold kan fiskens helse bli dårligere, og det vil gå utover oppdrettsnæringens økonomi. Det kan derfor være gunstigere å utføre preventive tiltak. Til tross for disse tiltakene vil fisken likevel bli utsatt for fysiologisk stress som man må ta hensyn til. Forholdene kan blant annet gjelde næring, kjønnsseparasjon, helse og sykdom, fangenskap og merdens dybde. Det å måle det fysiologiske stresset kan derfor være en objektiv og enkel måte å sammenligne blant annet oppdrettsanlegg og prosedyrer, evaluere velferden og kan gi store fordeler både for anlegget og individuell fisk. (3, 4).

1.1 Målet for oppgaven

Utgangspunktet for denne bacheloroppgaven baseres på forskningsgruppen Cao Y, Tveten A-K og Stene A (2017) sitt arbeid, hvor de har sett på en sammenligning av de kompetitive ELISA kittene fra Neogen og Enzo. Funnene viste relevans og repeterbarhet, som antyder at kittene kan brukes om hverandre (3). Neogen-kittet er tidskrevende da prøvene må ekstraheres. Imidlertid er Enzo-kittet enklere å bruke, men til gjengjeld er det dyrere. Basert på sammenligningen av kittene sine egenskaper resulterte det i konseptet at man kan bruke Steroid Displacement Reagens (SDR) fra Enzo-kittet i Neogen-kittet. Som startet prosessen for bacheloroppgaven. Neogen-kittet blir da forenklet og man unngår ekstra kostnader for Enzo-kittet. Kittet fra Neogen blir som et resultat optimalisert, og ble derfor grunnlaget for problemstillingen «Kan Neogen-kittet forenkles, og samtidig beholde nøyaktigheten i måling av kortisol?».

2 TEORI

2.1 Fiskevelferd

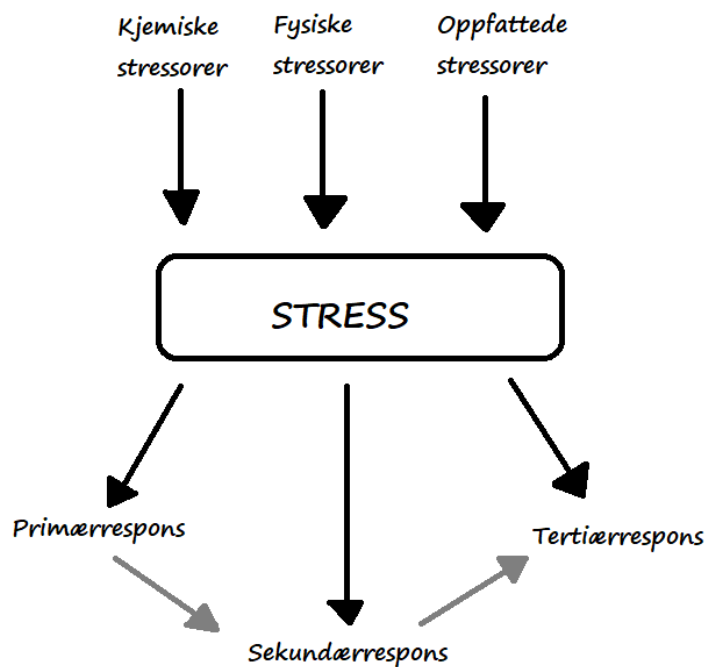
Det har over lang tid blitt testet ut ulike metoder for å måle stress i både laks og andre fiskearter på en human måte. Det å produsere repeterbare metoder som kan måle kronisk stress i fisk kan være lønnsomt både for hvert individ, men også for oppdrettsanlegg i storskala. Man kan differensiere og velge bort stressende håndteringsprosedyrer, minke sjansen for sykdom, forbedre og regulere lovgivninger som er laget for å sikre fiskekvalitet, velferd og overlevelse. Dette har resultert i utviklingen av både direkte og indirekte metoder for måling av stressorer i fisk. Noen eksempler inkluderer stressmarkører, sykdom og helse og dødelighet (3, 4).

En kan evaluere laksens erfaringer og velferd ved å måle dens fysiologiske stressrespons. Definisjonen av stress og stressorer har en lang historie som er fylt med mange kontroverser. Likevel, er konseptet stress bredt akseptert av blant annet av cellebiologer, fysiologer, toksikologer, etologer og økologer. De demonstrerer stress sin vitalitet og attraksjon ved å beskrive hvordan den påvirker ulike funksjoner ved organiserte nivå av celler, organ, organismer, populasjoner og økosystem (5, 6).

De fysiske responsene på stressorer er en viktig overlevelsesfunksjon hos fisk, og stressresponsens mønster blir aktivt studert. Repetitiv og kronisk eksponering for stressorer har en skadelig effekt på flere aspekter av en organismes fysiologi. Dette gjelder blant annet endringer i nervesystemets funksjon, vekst og utvikling, reproduktiv funksjon og immunsystemets funksjon. Studier fra de siste tiårene beskriver den cellulære stressresponsen i fisk og indikerer hvordan stress i fisk fører til dårligere vekst og andre skadelige helseeffekter. Et viktig fokus innenfor dagens forskning i akvakulturen er identifisering av stressmarkører i fisk. Dette gjelder både molekylære, biokjemiske og hormonelle markører som reflekterer fiskens helsestatus. Ved å finne en stressmarkør kan det føre til en utvikling i oppdrettspraksis for å redusere stress i akvakulturvirksomheten, som vil gi en forbedret kvalitet og produksjon (7).

2.1.1 Stressrespons hos fisk

Responsen på stress i fisk sørger for dens overlevelse, men kan også negativt påvirke dens helse og velvære. Definisjonen av stress hos fisk varierer, men blir ofte referert til som en tilstand hvor evnen til å opprettholde homeostase blir påvirket av ulike stressresponser. Både fysiske og kjemiske stressfaktorer i fisk kan fremkalle uspesifikke responser. En stressfaktor er en respons som anses å være en adaptiv mekanisme slik at fisken skal kunne takle påvirkningene og opprettholde dens homeostatiske tilstand. Dersom stresspåvirkningen er av alvorlig grad, eller er kronisk langvarig vil ikke fisken kunne gjenvinne homeostase, det vil etterhvert gå utover fiskens helse og velvære. Fisken kan da bli kronisk stresset (1, 4, 6, 8).



Figur 1 Kjemiske, fysiske og andre oppfattede stressorer påvirker fisk til å fremkalle fysiologiske effekter som er inndelt i primær- sekundær- og tertiærrespons. I noen tilfeller kan de primære og sekundære responsene ha en direkte påvirkning på de sekundære og tertiære responsene som er angitt av de grå pilene. (Figuren er basert på figur 1 fra (9))

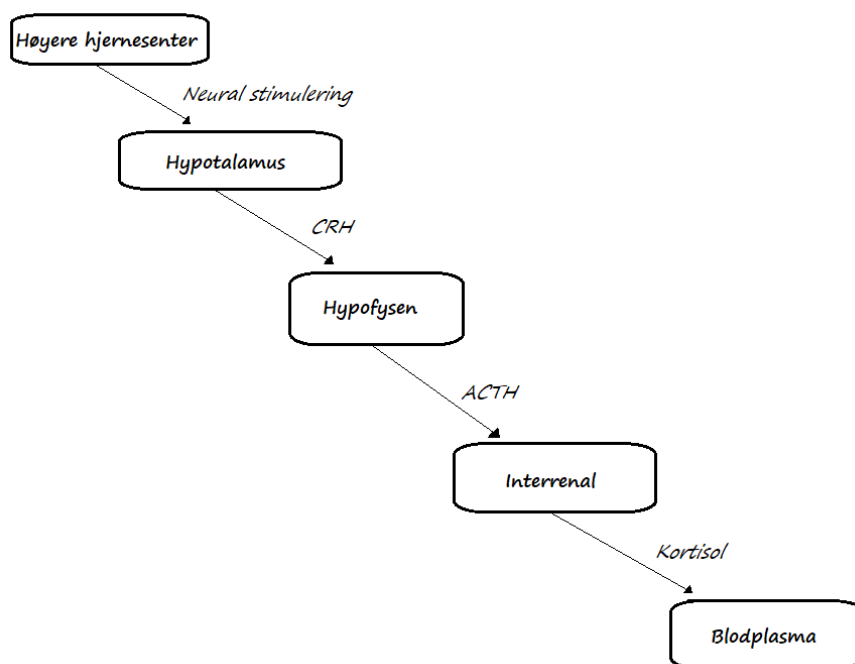
Stressresponser kan være av ulike nivå og blir delt inn i primær, sekundær og tertiærrespons, som vist i *Figur 1*. Primærrespons er den neuroendokrine responsen, hvor en oppfattet trussel utløser en frigjøring av stresshormonene katekolaminer og kortikosteroider. Dette utløser en sekundærrespons og gir umiddelbar endring i fiskens adferd. Her får man målbare endokrine forandringer av kortikosteroider og sirkulerende katekolaminer. Det er primærresponsen som er av spesiell interesse, da det blir målt kortisolnivå i plasma (10). I sekundærresponsen vil en

få metabolske endringer som for eksempel økt glukose i blodet og endringer i immunsystemets funksjon, eksempelvis økning av antistoffproduksjon. I tillegg vil det oppstå adferdsendringer slik at fisken reagerer på den oppfattede stressoren. Dette inkluderer endring i funksjoner relatert til metabolisme. Ved en vedvarende sekundærrespons kan en etterhvert få en tertiærrespons. Tertiærresponsen refererer til aspekter av fiskens ytelse som forandring i vekst eller reproduksjon, økt sykdomsfølsomhet og mortalitet. Den mest studerte komponenten av stressresponsen er forhøyelsen av kortisol i plasma, og dette steroidhormonet regnes som en av de beste indikatorene for stress i fisk (7, 9, 11).

2.2 Syntese av kortisol

Utskillelsen av kortisol i fisk skiller seg fra pattedyr. I fisk foregår utskillelsen av kortisol til blodbanen fra hodenyren. Fisk har ikke en diskret binyre som pattedyrene, de har i stedet steroidogene celler kalt interrenale celler som fordeles i hodenyren, langs de bakre kardinalårene. De steroidogene cellene ligger i nærheten av kromaffine celler som skiller ut katekolaminer, og øker dermed muligheten for en parakrin kontroll ved frigjøring av kortisol (5, 12, 13).

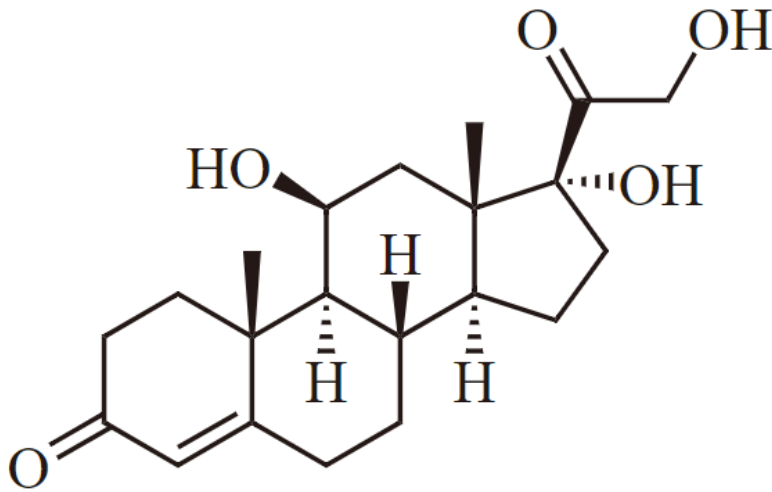
Det er to endokrine responser som kan bli aktivert av stress hos fisk. Den ene responsen fører til økt konsentrasjon av adrenalin og noradrenalin i blodplasma. Den andre er hypotalamus-hypofyse – interrenal-akse-responsen (HPI-akse-responsen) som fører til at kortisolkonsentrasjonen i blodplasma stiger. Siden kortisol er et steroidhormon er det umulig å lagre i kroppen, da det er fettløselig. Kortisol må derfor bli produsert på nytt hver gang interrenale celler i hodenyren stimuleres av en hormonell kaskade. HPI-aksen er en kaskade som består av forskjellige hormoner, hvor kortisol er viktigst. Som vist i *Figur 2* utløses kaskaden av det høyere hjernesenteret og er en av to nevroendokrine akser som utgjør primærresponsen til stress (5, 6).



Figur 2 viser en forenklet hypothalamus-hypofyse-interrenal-akse (HPI-akse) av fisk. (Figuren er basert på Figur 1 fra (10)).

Selve utskillelsen av kortisol starter ved at HPI-aksen aktiveres når hypothalamus reagerer på en stressor (10). Syntesen av kortisol i hodenyren stimuleres av hypofysen som skiller ut adrenokortikotropin (ACTH). Produksjonen av ACTH blir stimulert av kortikotropinfrigjørende hormon (CRH) som frigjøres av hypothalamus. ACTH øker konsentrasjonen av kolesterol i den indre mitokondriemembranen, via regulering av steroidogene akutte regulatoriske protein. Kortisol blir omdannet fra kolesterol når ACTH øker. Sekresjonen av kortisol er under kontroll av HPI-akse-responsen som fører til at kortisolkonsentrasjonen i blodplasma stiger. ACTH frigitt fra hypofysen er det viktigste hormonet for utskillelsen av kortisol. Mange faktorer inkludert hormoner, stress og negativ tilbakekobling av kortisol kan regulere ACTH-sekresjon i fisk og dermed også påvirke kortisolproduksjonen (5, 10, 12).

2.2.1 Kortisol



Figur 3 Strukturen til hormonet Kortisol med strukturformel $C_{21}H_{30}O_5$. (Figuren er hentet fra (14)).

Kortisol er et kjent stresshormon fordi det spiller en viktig rolle i kroppens stressrespons. Det er et kortikosteroid som er en gruppe av steroidhormoner. Strukturen til kortisol er vist i *Figur 3*. Dersom organismen er i en situasjon der den føler seg truet eller det er kritisk for overlevelse, vil den omfordele energi ved å skille ut blant annet noradrenalin og kortisol for å skape en fight-or-flight respons. Dette gjøres ved å undertrykke funksjoner som ikke er nødvendig for umiddelbar overlevelse, inkludert reproduksjon, immunrespons, fordøyelse og smerte. Samtidig fremmes viktige funksjoner som økt hjertefrekvens og blodtrykk, mens energi blir produsert for at hjernen og musklene skal kunne starte overlevelsesresponsen. Det påvirker protein- og karbohydratmetabolismen under visse forhold. Kortisols viktigste rolle er å påvirke perifer bruk av glukose og å opprettholde blodtrykk, immunfunksjon og kroppens antiinflammatoriske prosesser (10, 15, 16).

2.3 Metoder for å måle kortisol i plasma

Ved måling av kortisol i plasma finnes det ulike apparater som tar for seg forskjellige analysemetoder. Immunoassay og kromatografiske metoder for kortisolmåling i forskjellige biologiske væsker vil variere i forhold til deres analytiske ytelse, referanseområde, diagnostisk spesifisitet og sensitivitet. Kortisolmålinger kan bli gjennomført blant annet ved bruk av infrarød spektroskopi, elektrokjemi, kromatografiske metoder, ligand-assay som radioimmunoassay og ikke-isotopisk immunoassay. Ulike analysemetoder kan blant

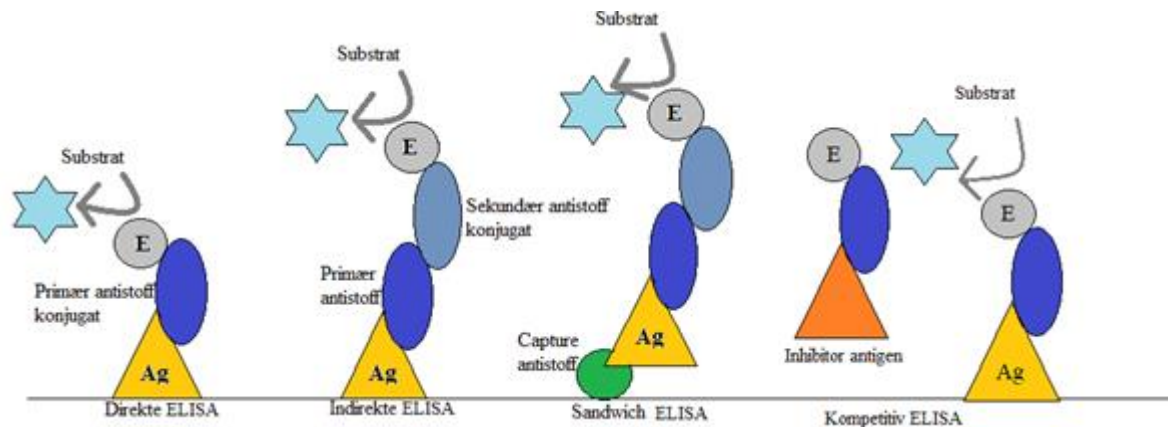
annet måle fritt kortisol, noen måler både bundet og fritt kortisol, og noen måler total kortisolnivå (17).

2.3.1 Enzyme linked immunoabsorbant assay (ELISA)

ELISA er en type immunoassay basert på enzymatiske reaksjoner for å lese av absorbansmålinger. Ordet ELISA er et samlebegrep på en rekke kvantitative og kvalitative analysemetoder som baseres på den samme teknikken, med ulike modifikasjoner. En ELISA-analyse kan blant annet analysere substanser som peptider, hormoner og proteiner. Det samme hovedprinsippet gjelder for alle ELISA; et antigen må bli immobilisert på en fast overflate, før et antistoff blir introdusert til brønnene. Dette antistoffet har et enzym bundet til seg. Antigen og antistoff bindes sammen og danner et kompleks. Deteksjon blir gjennomført ved analysering av den konjugerte enzymaktiviteten under inkubering med et substrat for å produsere et målbart produkt. Det kritiske punktet i en ELISA er reaksjonen mellom enzym og substrat som må avsluttes til riktig tid for å få riktig avlesing (18, 19).

2.3.2 ELISA formater

Det finnes en rekke gjennomførbare ELISA-formater som baseres på den grunnleggende prosedyren. Nøkkeltrinnet i en ELISA er immobiliseringen av det antigenet en ønsker å påvise. Den første metoden er direkte ELISA, hvor det er direkte adsorpsjon til platen og deteksjonen er direkte ved hjelp av et merket primært antistoff. Formattypen som blir brukt under dette forsøket er kompetitiv ELISA som ligner på den direkte metoden. Den skiller seg fra de andre formatene fordi man bruker et inhiberende antigen og det er denne som har et merket primært antistoff festet til seg. Det vil oppstå konkurranse mellom det inhiberte antigenet og det umerkede antigenet fra prøven for binding til capture-antistoffet. Den andre metoden er en indirekte ELISA hvor antigen fortsatt bindes med direkte adsorpsjon til platen, men har et sekundært antistoff som er merket. Sandwich ELISA baseres på indirekte ELISA, men den analytten en ønsker å måle blir bundet mellom to primære antistoff; capture-antistoff og deteksjonsantistoff. Det sekundære antistoffet som er merket, bindes til deteksjonsantistoffet for deteksjon. De ulike typene av ELISA blir illustrert i *Figur 4* (18, 19).



Figur 4 viser de fire omtalte ELISA formatene; direkte-, indirekte-, sandwich- og kompetitiv ELISA. Formatene viser hvordan antigenet blir immobilisert vha. direkte adsorpsjon eller bundet til et capture-antistoff. Deteksjon av antigen blir utført ved enten et merket primært eller sekundært antistoff. De er merket med et enzym som vil reagere med substratet for å danne et målbart produkt. Kompetitiv ELISA har i tillegg et inhibitor-antigen som vil konkurrere om bindingssetet. Figur er basert på (20).

Deteksjonsstrategien til de ulike formatene varierer. Det er hovedsakelig deteksjonstrinnet som bestemmer sensitiviteten til en ELISA, og det er uavhengig av hvordan antigenet bindes til platen. Den direkte metoden bruker et merket primært antistoff som reagerer direkte med antigenet. Direkte deteksjon kan bli utført enten med et antigen som er direkte immobilisert på prøveplaten eller immobilisert med capture-formatet. For kompetitiv ELISA er deteksjonen unik. Det er bare det inhiberende antistoffet som har merket primært antistoff, som vil konkurrere med den umerkede prøven/standarden. For å kunne måle responssignal er det derfor nødvendig å skille ubundne og bundne antistoff etter inkubering. En nedgang i signal fra det merkede, inhiberende antigenet indikerer tilstedeværelse av antigen i prøven/standard. Dette resulterer i at det registrerte responssignalet vil gi en omvendt proporsjonal kurve. Den indirekte deteksjonsmetoden bruker merket sekundært antistoff for deteksjon, som er spesifikt for det primære antistoffet. For sandwich-ELISA er det kritisk at det sekundære antistoffet er spesifikt bare for det primære deteksjonsantistoffet. Hvis ikke vil ikke prøven være spesifikk for antigenet (18, 19).

2.3.2.1 De ulike formatene sine styrker og svakheter

Både direkte og indirekte deteksjonsmetoder for ELISA har sine styrker og svakheter. Direkte ELISA sine fordeler er at den er rask, siden den bare bruker ett antistoff og har færre trinn i prosedyren. I tillegg er sjansen for kryssreaksjoner for sekundært antistoff eliminert. Dens svakheter er at man har minimal signalamplifikasjon og immunreaktiviteten av det primære antistoffet kan bli negativt påvirket av merkingen med enzym/merke. Det er både tidkrevende

og dyrt å merke primære antistoff for spesifikke ELISA-system og valget er ikke-fleksibelt. Som en variant av den direkte metoden er kompetitiv ELISA en strategi som normalt blir utført når man har liten mengde av antigenet eller antigenet bare har en epitop, eller antistoff bindingssted. En variasjon av denne metoden består av at man merker rensset antigen i stedet for antistoffet, hvor en nedgang i signal indikerer tilstedeværelsen av antigen i prøven sammenlignet med prøvebrønner med bare merkede antigen (18, 19).

Indirekte ELISA regnes som det mest populære formatet for ELISA. Styrkene til indirekte ELISA er at det finnes mange variasjoner av sekundære antistoff kommersielt tilgjengelig. Sekundære antistoffer er også mer variable da en kan bruke det samme sekundære antistoffet for flere primære antistoff fra den samme vertsarten. Siden det primære antistoffet ikke er merket beholder det maksimum immunoreaktivitet, og sensitiviteten øker fordi hvert primære antistoff inneholder flere epitoper som tillater signalamplifikasjon. Den største ulempen er at kryssreaktivitet kan forekomme med sekundære antistoff, noe som resulterer i feilsignal. Man trenger også flere trinn for prosedyren, inkludert inkubering, som er tidskrevende. Sandwich ELISA er et populært format som blir brukt fordi den er sensitiv og robust. Den er mer robust på grunn av når fritt antigen isoleres vil det dannede antigen-antistoff-komplekset begynne å dissosiere, noe som tar lenger tid for sandwich-ELISA grunnet dens struktur (18, 19).

2.3.3 Radioimmunoassay (RIA) og High pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Andre analysemetoder som kan måle kortisol er RIA og HPLC. RIA bruker antistoff og radioaktive reagenser til å beregne konsentrasjoner av hormon i et serum. Det anbefales at antistoffet har en høy affinitet for binding, selv ved svært lave konsentrasjoner. I tillegg bør antistoffet være spesifikt for å unngå uønsket binding med andre stoff, noe som resulterer i falske forhøyede verdier. Binding mellom antigen og antistoff foregår i en konkurranse, hvor man har en kjent mengde antigen som er radioaktivt merket. Dess flere antigen som er i prøven, desto mindre radioaktivt antigen vil binde seg til antistoffet som resulterer i en omvendt proporsjonal kurve. Antigen som ikke bindes til antistoff vaskes bort og man isolerer antigen-antistoffkompleksene fra løsningen. RIA er utviklet for å være effektiv og er som regel en spesifikk målemetode, men den har noen feilkilder. Selv om analysemetoden baseres på en immunologisk gjenkjennelse av det som måles sier den ingenting om den biologiske aktiviteten. Derfor kan inaktive fragmenter av et hormon som reagerer med antistoffet kunne bli medregnet. I tillegg kan uspesifikke faktorer interferere med bindingen mellom antigen og antistoff og føre

til falske høye/lave verdier. Dette kan delvis kompenseres ved å utvikle bedre antistoffer og bruke analyseprinsipper som tar i bruk to antistoffer i stedet for ett (21-23).

HPLC er en type høytrykk væskekromatograf som vil separere partikler i en væske. Metoden brukes blant annet i analyser av blod, medikamenter og vannprøver (22). Alle kromatogram følger prinsippet om at separasjoner av analytter i en prøve skyldes forskjell i analyttens fysiske og/eller kjemiske egenskaper. Den stasjonære- og mobile fasen interagerer med analytten. Noen analytter har større affinitet til den stasjonære fasen som holder analytten tilbake, mens andre tiltrekkes av den mobile fasen som resulterer i at den går fortere gjennom kolonnen. Anvendelsesområdet til HPLC er stort da det kan benyttes for analytter med høy molekylvekt og høyt kokepunkt, hormon i blod, metabolitter, medikament, bestemme gen og arvelige sykdommer og å undersøke giftige stoffer i matvarer. (23). Væskekromatografi (LC) med UV måling, samt LC-MS/MS kan separere og kvantifisere plasma/serum total kortisol, selv med andre steroider og metabolitter i prøven og er derfor mer nøyaktig for måling av kortisol enn immunoassay. Likevel er de også mye mer tidskrevende, arbeidskrevende og dyrere for rutinebruk (17).

3 MATERIALE OG METODER

For dette forsøket blir kompetitive kit fra Neogen og Enzo tatt i bruk. Fordelen med å bruke kompetitiv ELISA ovenfor en indirekte metode er at det er raskere, da det er mindre trinn i prosedyren. I tillegg unngår man faren for sekundære kryssreaksjoner. Hovedgrunnen til at en kompetitiv ELISA blir brukt for dette forsøket er at man ikke vet konsentrasjonen av kortisol i prøven. Kompetitiv ELISA er spesialisert for tester ved lave konsentrasjoner av analytter som skal detekteres, noe som er tilfellet i dette forsøket.

3.1 Innhenting av prøver

Prøvene som er brukt i forsøket er plasmaprøver som ble innhentet fra atlantehavslaks ved et tidligere forsøk. Atlantehavslaksen som ble brukt kommer fra et oppdrettsanlegg fra nordvestkysten av Norge. Prøvene kommer fra et «net-cleaning»-prosjekt hvor buret blir vasket med en notspylere, som vil stresser fisken. Prøvene vist i *Tabell 1 og 2* ble tatt før og under vasking av noten, for å se hvor mye dette påvirket laksen. Fisken ble oppbevart i bur på størrelse for vekst i henhold til gjeldende industristandarder for økologisk lakseproduksjon (3, 24).

Før prøvetaking ble fiskene raskt fjernet fra nettet og umiddelbart drept med et hardt slag mot hodet, håndtering under 5 min. En 4ml blodprøve ble umiddelbart tatt ved venepunktur i halen med en 24-gauge nål, plassert i et 4,5 ml samlerør som inneholder litiumheparin som antikoagulant. Blodprøvene ble transportert i land på is. Plasma ble separert ved sentrifugering (1500 rpm i 10 minutter) ved 4°C, fjernet og porsjonert i 1,5 ml mikrosentrifugerør. Prøvene ble lagret ved -20°C frem til analysering, det var disse prøvene som ble brukt i dette forsøket (3, 24).

All håndtering og prøvetaking følger operasjonsprosedyren til oppdrettsanlegget, og prosedyren følger norsk dyrevelferdslov (LOV-1009-06-19-97). Handlingen (§13) og tilhørende regulering (FOR2015-06-18-76) dekker også bruken overordnet i forskning, utdanning og medisinsk testing. NTNU i Ålesund er godkjent av Mattilsynet til å gjøre dyreforskning i henhold til forskriften (3, 25).

Tabell 1 gir informasjon om hvilken prøver som kommer fra hvilken fisk før stresspåvirkning. Prøvene ble tatt 11.10.2017. (Før vasking 10.45 - 12.30)

Fisk (blod)	Lengde (cm)
F1	44
F2	49
F3	43
F4	41
F5	41
F6	42
F7	47
F8	38

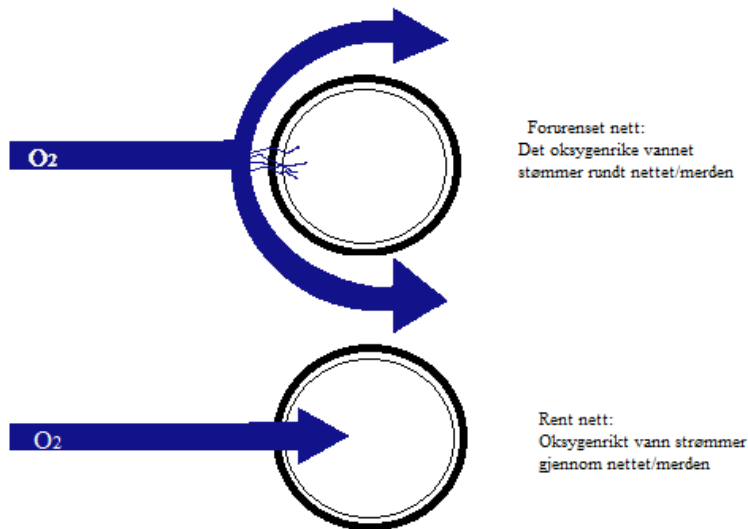
Tabell 2 gir informasjon om hvilken prøver som kommer fra hvilken fisk under stresspåvirkning. Prøvene ble tatt 11.10.2017. (Under vasking 12.30- 14.30)

Fisk (blod)	Lengde (cm)
U1	44
U2	43
U3	45
U4	40
U5	46
U6	44
U7	43
U8	38

3.1.1 Notspyling

God vannstrøm er essensielt for fiskeoppdrett. Som nevnt over ble prøvene innhentet fra et «net-cleaning»-prosjekt der det ble tatt prøver før og under spyling med notspyler. Dette vil stresse fisken, men er essensielt for god vanngjennomstrømning. En god vanngjennomstrømning forsikrer at algeveksten er minimal, spesielt ved høye vanntemperaturer, da veksten av alger øker eksponentielt med temperaturen. Som illustrert i *Figur 5* vil økt sjøforurensing føre til redusert vannstrømning, som igjen fører til at oksygenrikt vann strømmer rundt burene i stedet for igjennom (26). Fiskeoppdretterne sørger for å holde garnene rene ved å bruke rengjøringsutstyr for å fjerne forurensing fra sjøen. Det mest brukte rengjøringsutstyret er en notspyler, som er en roterende rengjøringskive, montert på en

støtteramme som er drevet av en høytrykkspyler og filtrert sjøvann. Selve renseprosessen starter med å senke rammen på innsiden av nettet, mens de roterende platene fjerner den marine forurensingen ved å blåse ut høytrykksaltvann fra innsiden av nettet og ut til omgivelsene (26, 27).



Figur 5 illustrerer hvordan forurenset nett vil påvirke vannstrømmen i et oppdrettsanlegg. Ved et forurenset anlegg vil det oksygenrike vannet strømme rundt burene, i stedet for igjennom. Basert på figur 12 fra (26).

3.2 Ekstraksjon av prøver

Flere faktorer kan påvirke ekstraksjonen av plasmaprøver. Ekstraksjonsmetoden som ble fulgt er beskrevet under «sample preparation» i Figur 28 (Vedlegg 8.5). Det ble pipettert 120 µl plasma over i et glassrør fra hver prøve og ble ekstrahert ved å tilsette 1,2 ml dietyleter. Ekstraksjonsmetoden går ut på å tilsette dietyleter til plasma som blir blandet i ulike tidsintervall, 30 sekund for standard ekstraksjon eller variasjonen to minutt. Deretter blir den organiske delen overført til et nytt rør hvor den blir tørket i en nitrogenavdamper. De andre variasjonene som blir brukt er at prøvene blir ekstrahert to eller tre ganger. Dette gjøres ved å overføre den organiske fasen fra prøverøret til sluttrøret og tilsette dietyleter til prøverøret og blande den i 30 sekunder en gang til. Man overfører den organiske fasen igjen til det samme sluttrøret, og repeterer det samme trinnet en gang til for en tredje ekstraksjon. De ulike variantene blir satt i nitrogenavdamperen for å bli tørket. Når prøvene er tørket blir ekstraksjonsbuffer tilsatt slik at man kan separere fasene. Ekstraksjonstrinnet blir gjort for å

forhøye mengden kortisol som blir løslatt i den organiske fasen. Ut fra optimaliseringen av ekstraksjonsmetoden ble det diskutert frem en løsning fra resultatene, om hvilken ekstraksjonsvariant som gir best resultat med tanke på antall ekstraheringer og hvor lenge prøvene blir blandet.

3.3 NEOGEN-prosedyre ekstraksjonsmetode

Neogen-kittet bruker ekstrahert plasma for å kunne detektere kortisol. Ekstraksjonen separerer plasmaproteiner slik man får fritt kortisol i plasma. Det ble brukt 120 µl plasma og 1,2 ml dietyleter, som deretter ble blandet slik at væsken delte seg i to faser. Den organiske fasen ble overført til et nytt glassrør, og deretter tørket ved hjelp av N₂-gass i en nitrogenavdamper. Restene fra tørkingen ble så løst opp i 120 µl ekstraksjonsbuffer. Løsningene i den første platen ble fortynnet to ganger, 60 µl ekstrakt og 60 µl EIA-buffer, mens hos plate to ble det fortynnet fem ganger, 25 µl ekstrakt og 100 µl EIA-buffer. Forsøket starter med å lage til standardfortynningene som beskrevet i *Figur 28 (Vedlegg 8.5)*. 50 µl av alle de ekstraherte prøvene og standardfortynningene ble tilsatt i gitte brønner og 50 µl fortynnet kortisol-konjugat ble tilsatt til prøvene. Prøven og kortisol-konjugatet ble blandet forsiktig sammen, og mikroplaten ble dekt med plastfilm, og så inkubert ved romtemperatur i en time. Etter inkubering ble innholdet tømt ut av brønnene og vasket grundig tre ganger med 300 µl fortynnet vaskebuffer. Det ble tilsatt 150 µl substrat til hver brønn, blandet forsiktig og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. For å stoppe reaksjonen ble 50 µl 1N HCl tilsatt i alle brønnene og resultatet ble lest av ved 450 nm av en plateleser. For en mer detaljert prosedyre se *Vedlegg 8.5; Neogen-prosedyre*.

3.3.1 ENZO-prosedyre ikke-ekstraksjonsmetode

Enzo-kittet bruker et steroid displacement reagens (SDR) som erstatter ekstraksjonstrinnet til Neogen. Begge metodene brukte de samme plasmaprøvene, forskjellen er at prøvene ikke ble ekstrahert først ved den direkte metoden. Plasmaprøvene ble applisert i sine bestemte brønner etter at reagenset SDR ble tilsatt. Reagenset vil kutte bindinger kortisol har med plasmaproteiner, slik at man får fritt kortisol som kan detekteres. Det er viktig å bemerke at SDR skal varmes opp i romtemperatur i 30 minutter før åpning. Plasmaet ble fortynnet med 59.5 µl plasma til 59.5 µl EIA-buffer. 1.2 µl SDR ble så tilsatt, slik at fortynningen ble 1:100. 50 µl av løsningen ble tilsatt i sin tilegnede brønn i duplikat. Neogen-prosedyren ble så fulgt for resten av prosedyren, fra og med tilsetningen av kortisol-konjugat. For mer detaljert

prosedyre se *Vedlegg 8.6*; *Enzo-prosedyre* for Enzo og *Vedlegg 8.5*; *Neogen-prosedyre* for detaljert Neogen prosedyre.

3.3.2 Kryssreaksjon

Begge kittene fra *Vedlegg 8.5* og *8.6* inneholder en spesifikk seksjon som beskriver kryssreaksjoner som kan oppstå i forsøket. Det er alltid en fare for kryssreaksjon og de som er rapportert for Neogen og Enzo kittene er: kortisol 100%, prednisolon 47.42%, kortison 15.77%, 11-deoxykortisol 15%, prednison 7.8%, kortikosteron 4.8%, 6 β -hydroxykortisol 1.4% og 17-hydroxyprogesteron 1.4%. Den analytiske sensitiviteten for kortisolprøven var 0.04 ng/ml. Selv om prednisolon har en høy prosentandel, vil det ikke oppstå i prøvene som ble brukt. Grunnen til dette er at prednisolon er et legemiddel for å redusere inflammatoriske tilstander, og er ikke relevant for oppdrettslaks.

3.4 Tilleggsmaterialer

Med noen unntak inneholdt kittene mesteparten av det materialet som var nødvendig for dette forsøket. Ekstraksjonstrinnet i Neogen-kittet krever selvskaffede materialer som vortex-mikser, dietyleter, nitrogenavdamper og 1N HCl. En plateleser ble brukt for å lese av resultatene. Dietyleteren er fra sigma og har en konsentrasjon på ≥ 99.70 %. (Sigma-Aldrich, A: Sigma aldrich 258148) Dietyleter ble brukt til ekstrahering av plasmaprøvene under ekstraksjonsmetoden. Ved slutten av prosedyren ble 1 N HCl (Sigma Aldrich, A: 1003171000) tilsatt som en stoppsyre for å stoppe den enzymatiske reaksjonen i brønnene, før platen ble avlest. Dette gjorde at prøvene ble avlest ved 450 nm, i stedet for 650 nm som ble nevnt i *Figur 29 (Vedlegg 8.5)* under «optional test procedures».

3.4.1 Nitrogenavdamper

En nitrogenavdamper brukes under ekstraksjonsmetoden for å bevare mest mulig kortisol fra prøvene. Ekstraheringen avsluttes av at neogen-prøvene ble tørket i en nitrogenavdamper for at mest mulig kortisol fra den organiske fasen skal bli igjen i prøvene. Nitrogenavdamperen som ble brukt er en «Reacti-Vap Evaporator» fra Thermo Scientific. Man kan regulere antall nåler som er festet til apparatet etter hvor mange prøver som trenger tørking. Under rørene er det en blokk med tilsvarende mange hull, som reagensrørene kan bli plassert i for lettere tørking. Til maskinen kobles det på en nitrogengassflaske som man kan regulere trykket på. Reguleringen

av gass gjør det mulig å kontrollere hvor fort en ønsker å tørke prøven, og samtidig unngå søling ved for høyt trykk. (Thermo Scientific, A: 11551064)

3.4.2 Plateleser

En plateleser ble brukt til å lese av resultatene fra mikroplatene. Plateleseren som ble brukt var en «Multiskan GO microplate spectrophotometer» fra Thermo Scientific. Apparatet er basert på monokromatisk lys, UV/VIS og blir brukt til spektral avlesing og leser av absorbans ved 200 til 1000 nm bølgelengde. Plateleseren gir mulighet til å lese av plater med 96 brønner og forskjellige typer kyvetter. Instrumentet kan også inkubere prøver ved temperaturer opp til 45°C og risting av mikroplaten før avlesing (Thermo Scientific, A:51119200).

3.4.3 Forarbeid

Forarbeid blir utført for å forbedre teknikker og gir et mer nøyaktig resultat. For å observere pipetteringsteknikkens nøyaktighet ble plasmaprøver fortynnet i standardløsninger i duplikat. Standardløsningene ble deretter lest av i plateleser for å sammenligne nøyaktigheten mellom duplikatene. Standardfortynningsøvelser ble gjort i duplikat på striper fra et Neogen-kit og prosedyren for standardfortynning fra *Figur 28 (Vedlegg 8.5)* ble brukt.

3.5 Statistiske metoder

For å regne ut konsentrasjoner og lage de ulike tabellene til resultatdelen ble forskjellige statistiske metoder brukt. Programmet Excel ble brukt til å kalkulere optisk densitet (OD) av resultatene til konsentrasjonen av kortisol i ng/ml. Til dette forsøket ble programvaren «IMB SPSS Statistics» versjon 25.00 for Windows, brukt til beregninger av all statistikk og tillaging av diagrammer i resultatdelen. Alle boksplokkene som ble laget med SPSS vil vise resultatene som gjennomsnitt \pm standardavvik (SD) (28, 29).

Hypotesetester og korrelasjonstester ble tatt i bruk for å finne korrelasjon og forskjeller mellom prøvene. Eksempler på hypotesetester som ble brukt er «Related Sample Wilcoxon Signed rank test» og «Independent mann-Whitney U test», disse ble utført for å se om det er noen forskjeller mellom prøvene. Wilcoxon viser om det er en forskjell mellom to variabler, f.eks. to metoder som er relaterte til hverandre. En kan teste begge metodene opp mot hverandre på samme ELISA-plate for å se om metodene må optimaliseres. I dette forsøket ble det også gjort en sammenligning av to grupper med forskjellige prøver, før og under stress. Whitney er en

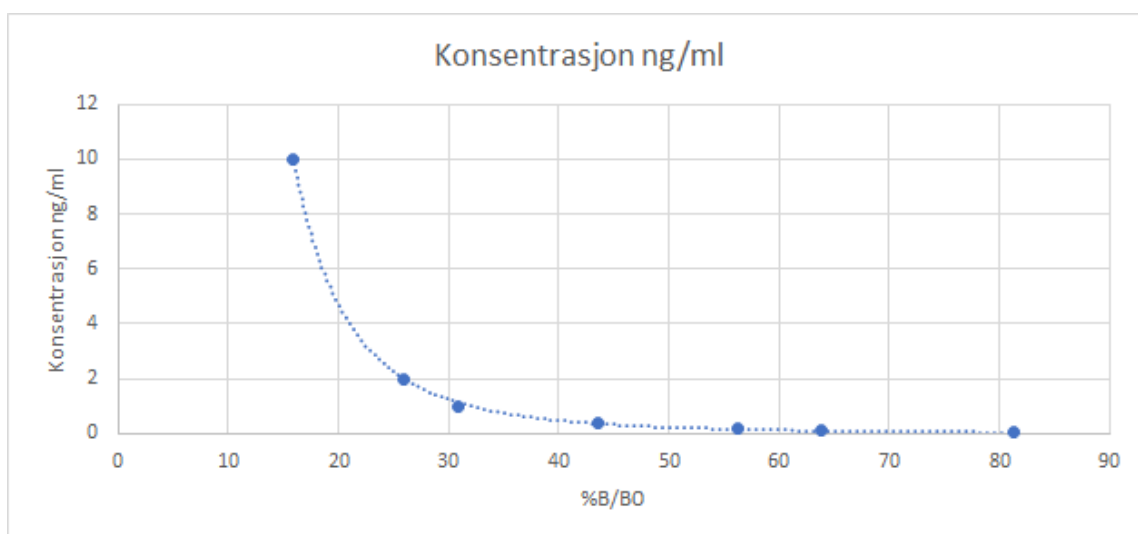
uavhengig hypotesetest som viser om det er forskjell innenfor hver enkelt gruppe av prøver. Det er en signifikant verdi på 5% som bestemmer om null hypotesen forkastes eller beholdes. Dersom resultatet av testene er under 5% blir den avvist, mens om den er høyere enn 5% blir den godkjent. Av resultatene fra ELISA-forsøket ble det i tillegg gjennomført en korrelasjonstest av typen Pearson-korrelasjon. Den korrelasjonstesten gir oss et tall mellom -1 og 1 , og angir i hvilken grad to variabler x og y er lineært relaterte. 1 er total positiv lineær korrelasjon, 0 er ingen lineær korrelasjon og -1 er total negativ korrelasjon. Positiv korrelasjon oppstår når høye verdier av den ene størrelsen ofte vil finnes sammen med høye verdier av den andre størrelsen (28, 29).

4 RESULTAT

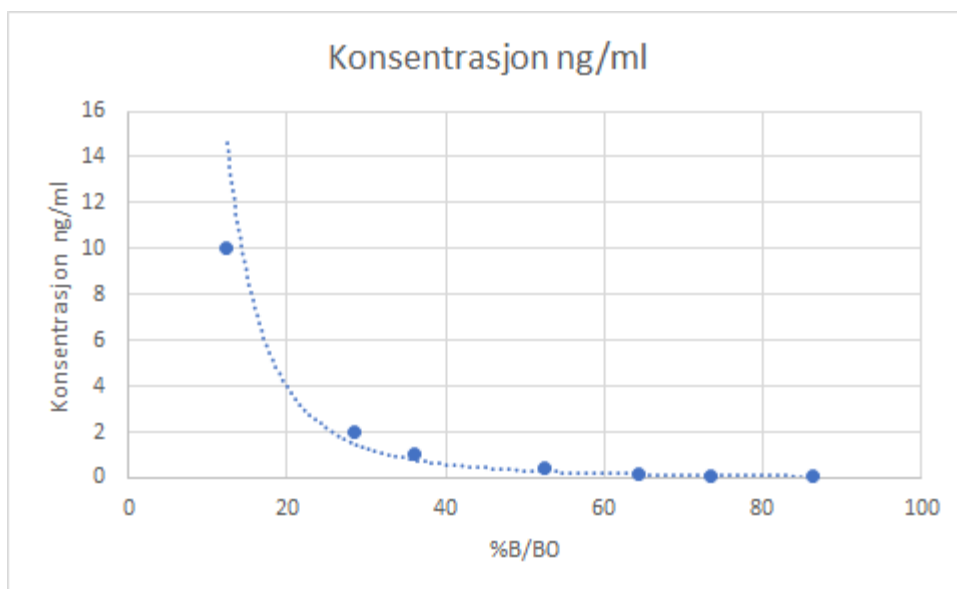
4.1 Standardkurver

Eksperimentet ble fullført når plateleseren leste av prøvene og ga et resultat i optisk densitet, en absorbanverdi. Hver brønn ga en absorban og ut fra de kunne man gjøre nye utregninger. For å lage standardkurver av de to platene blir gjennomsnittet av absorbanverdien til duplikatene av standardene regnet ut. Den nye gjennomsnittlige verdien kalles B og den blir brukt videre i tabeller. Neste trinn er å regne ut prosenten av maksimal binding ($\%B/B_0$), som gjøres ved å dele gjennomsnittet av hver standard absorban.

Standardkurven ble laget med $\%B/B_0$ langs x-aksen og den ekte konsentrasjonen langs y-aksen. Deretter ble det satt inn en trendlinje som gir selve kurven. Ut fra kurvens funksjon kan man regne ut den beregnende konsentrasjonen av kortisol i forsøket. Prøvene i dette eksperimentet har blitt fortynnet, så konsentrasjonene som blir bestemt ut fra standardkurven vil bli multiplisert med fortynnings-faktoren. Standardkurvene ble basert på standardløsninger i ulike fortynninger med gitt konsentrasjon, slik at det er mulig å regne ut konsentrasjonen i prøvene. Standardfortynningene ble brukt til å lage en standardkurve som viser om resultatet er innenfor 10 ng/ml. Det er den høyeste oppløsningen som er brukt for resultatene. Om prøvene er over 10 ng/ml blir de beregnet som unøyaktige da en ikke vet nøyaktig prøvens kortisolkonsentrasjon. For hver plate ble det laget en standardkurve, som vist i *Figur 6 og 7*, ut ifra samme prosedyre i *Figur 29 og 30 (Vedlegg 8.5)*. Ut fra standardkurvene kan man regne ut konsentrasjonen av kortisol i prøvene.



Figur 6 viser standardkurven for forsøk 1. Ut fra grafen og dens verdier kan man regne ut konsentrasjonen av kortisol i prøvene. Maksimumsverdi for standardfortynningen er 10 ng/ml. $\%B/B_0$ med verdi 100 og 0 ble ikke med i grafen da man ikke hadde fått til en trendlinje av typen potens.



Figur 7 viser standardkurven for forsøk 2. Ut fra grafen og dens verdier kan man regne ut konsentrasjonen av kortisol i prøvene. Maksimumsverdi for standardfortynningen er 10ng/ml. Siden man ikke hadde fått til en trendlinje av typen potens, ble ikke %B/BO med verdi 100 og 0 med i grafen.

Forkortelser i resultat:

EP1 – Ekstrahert kortisol fra plasma, plate 1

EP2 – Ekstrahert kortisol fra plasma, plate 2

SDR1 – Ikke-ekstrahert plasma med tilsatt SDR, plate 1

SDR2 – Ikke-ekstrahert plasma med tilsatt SDR, plate 2

F - Før stresspåvirkning

U - Under stresspåvirkning

4.2. Korrelasjon og forskjeller mellom plater

Den statistiske målingen korrelasjon, viser hvor mye to målbare størrelser henger sammen med hverandre. I denne delen av forsøket ble det derfor gjennomført en korrelasjonsanalyse for å se om det er en sammenheng mellom Neogen- og Enzo-kittet og deres resultat. En positiv korrelasjon mellom platene viser at arbeidet er repeterbart. Hypotesetesten «Related samples Wilcoxon signed rank test» er en forskjells-test som ble utført for å se om det var forskjeller mellom platene. Hypotesen som ble valgt er «Det er forskjell mellom platene» og null-hypotesen «det er ingen forskjell mellom platene». Dette betyr at om null-hypotesen

forkastes så er det en forskjell mellom platene. Resultatet for de statistiske målingene står nedenfor med henvisning til relevante resultat og figurer.

4.2.1 Korrelasjon og forskjeller mellom ekstraksjonsmetoden på plate 1 og 2

En korrelasjonstest vil gi et tall mellom -1 og 1 , som angir hvilken grad variablene EP1 og EP2 er relatert til hverandre. Mellom EP1 og EP2 ble korrelasjonskoeffisienten $0,753$, som vist i *Figur 15 (Vedlegg 8.1)*. Korrelasjonen vil stige desto nærmere resultatet er tallet 1 , som tyder på en positiv korrelasjon for EP1 og EP2. Hypotesetesten som vist i *Figur 8*, viser en signifikans på $0,005$. Dette er mindre enn $0,05$ og null-hypotesen blir forkastet.

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between EP1 and EP2 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,005	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Figur 8 viser en «Wilcoxon Signed Rang test» for relaterte prøver. Den brukes til å se om det er forskjell mellom EP1 og EP2. Beregningene ble gjort i programmet SPSS og viser utregnet signifikans, null-hypotesen og avgjørelsen om null-hypotesen skal forkastes eller ikke.

4.2.2 Korrelasjon og forskjeller mellom ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 1 og 2

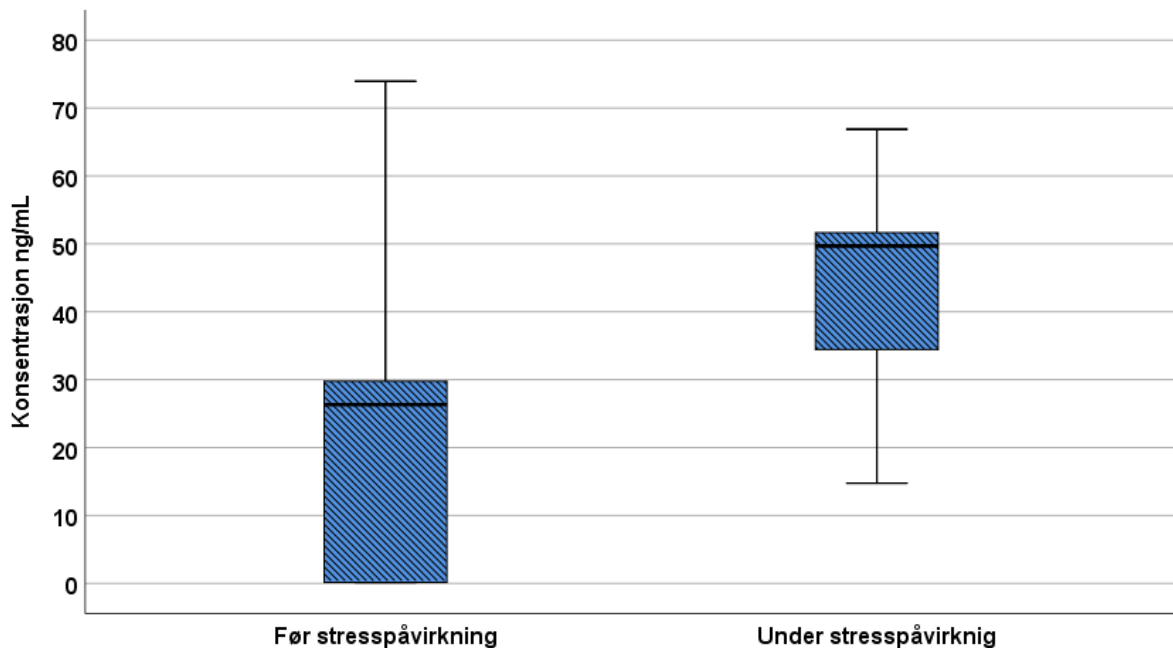
Korrelasjonsanalysen mellom SDR1 og SDR2 ga korrelasjonskoeffisienten $0,833$, som tyder på en positiv korrelasjon mellom prøvene. Resultatet kan ses i *Figur 16 (Vedlegg 8.1)*. Etter gjennomført hypotesetest, fikk man et signifikansnivå på $0,006$, som vist i *Figur 19 (Vedlegg 8.2)*. Dette er mindre enn $0,05$ og null-hypotesen blir forkastet.

4.3 Forskjeller mellom gruppene før stress (F) og under stress (U)

For å se om kortisolnivået varierer med mengden stress fisken blir utsatt for, ble det tatt plasmaprøver ved ulike tidspunkt under en notspyling. Gruppe F representerer kortisolnivå før merden ble spylt og når fiskens stressrespons ikke har blitt aktivert. Gruppe U er under notspylingen som betyr at merden blir vasket med en høytrykkspyler. Dette er en stressende situasjon for laksen som vil aktivere dens stressrespons og dermed gi et høyere kortisolnivå. For å se denne forskjellen ble kortisolkonsentrasjonene fremstilt i boksplokk. Resultatet som fremstilles her underbygges av den uavhengige testen «Independent samples Mann-Whitney U test» med følgende hypotesetester; H1: «Det er en forskjell mellom F og U», og H0 «Det er ingen forskjell mellom F og U». Det er en uavhengig hypotesetest som betyr at prøvene er uavhengige av hverandre. Den brukes blant annet til å se om to uavhengige verdier fra forskjellige grupper har samme fordelinger.

4.3.1 F og U gruppene for ekstraksjonsmetoden på plate 1

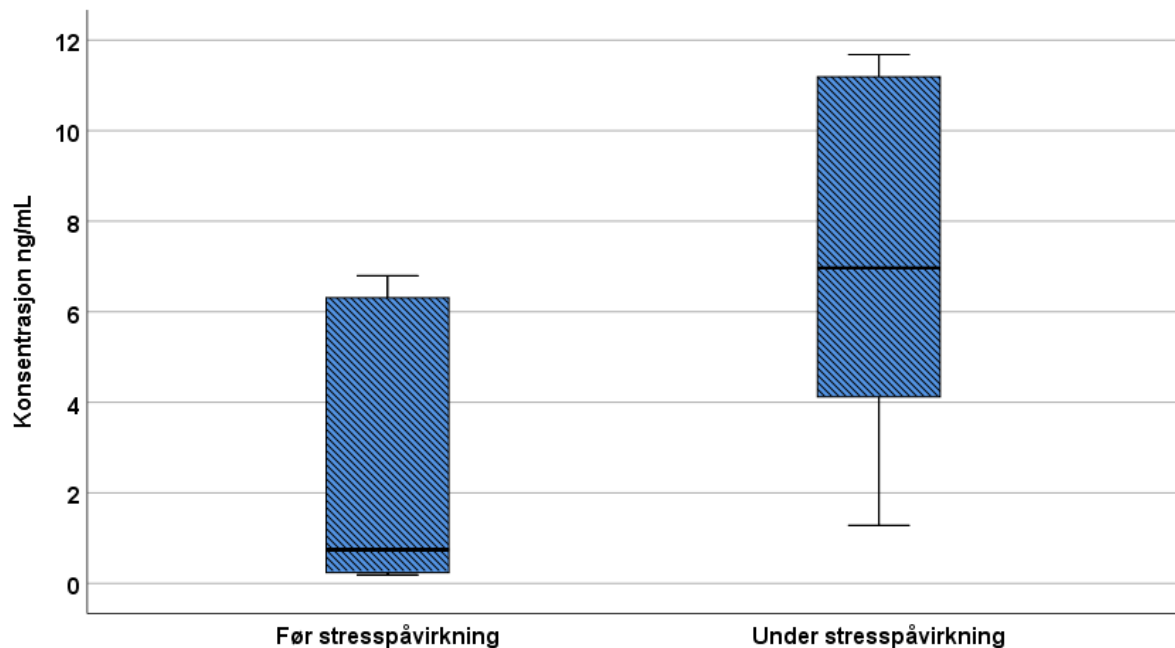
I boksplokket for EP1 blir gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i gruppene F og U fremstilt i hver sin boks, som vist i *Figur 9* nedenfor. Boksplokket viser de utregnende konsentrasjonene av kortisol i plasma i ng/ml langs y-aksen. X-aksen illustrerer hvilke prøver som tilhører gruppe F og gruppe U. Linjen i hver boks viser medianen til resultatet, der boksen viser 50% av fordelingene til resultatet. Over og under boksen vises whiskere som er minimum- og maksimumsverdi av resultatene. Man kan se at boksene er relativt høye og at det er tydelige forskjeller mellom gruppene. I F-gruppen er interkvartilområdet langt nede i forhold til dens maksimumsverdi. Dette viser at en prøve har en ekstremverdi, og de andre prøvene i gruppen har en lavere konsentrasjon. U-gruppen har et mer stabilisert interkvartilområde, uten noen ekstremverdier, og whiskerene går omtrent like langt ut fra boksen. Hypotesetesten i *Figur 22 (Vedlegg 8.3)* viser at innenfor EP1 har man en signifikans på 0,180. Dette er over signifikansnivået på 0,05 og en beholder null-hypotesen.



Figur 9 viser gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i de ulike prøvene i hver gruppe (F og U) for EP1, fremstilt i et boksplott. Medianen er linjen i hver boks, der boksene inneholder 50% av fordelingene av resultatet. Over og under boksen er det whiskers som viser minimum og maksimumsverdi av resultatet, de viser resultatene utenfor de midterste 50 prosentene.

4.3.2 F og U gruppene for ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 1

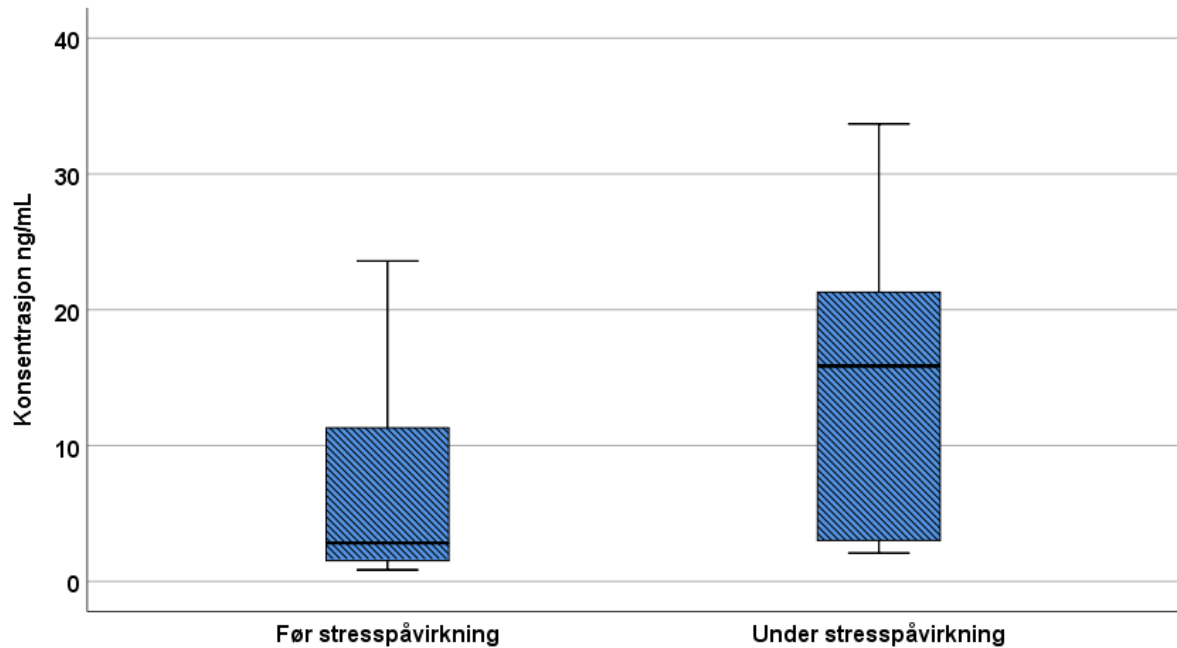
For SDR1 viser den utregnede konsentrasjonen at boksene har en forskjell i høyde. Som man ser av Figur 10 er F-gruppen mye kortere enn U-gruppen. Minimumsverdien til F-gruppen er plassert rett under interkvartilområdet, dette viser at konsentrasjonen av prøvene ikke er så forskjellig i nedre konsentrasjonsområde. Maksimumsgrensen går også så vidt over interkvartilområdet, som igjen tyder på svært like konsentrasjoner. Medianen er også relativt lav. Boksen til gruppe U har en mye høyere konsentrasjon. Medianen ligger rundt midten av boksen og maksimumsverdien er relativt lik interkvartilområdet. Minimumsverdien derimot er litt mer ekstrem og viser til en mye lavere konsentrasjon, som fremtrer mer i gruppe F. Hypotesetesten fra Figur 22 (Vedlegg 8.3) viser at signifikansen for SDR1 er 0,041 og man forkaster null-hypotesen.



Figur 10 viser gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i de ulike prøvene i hver gruppe (F og U) for SDP1 fremstilt i et boksplott. Medianen er linjen i hver boks, der boksene inneholder 50% av fordelingene fra resultatet. Over og under boksen er det whiskers som viser minimum og maksimumsverdi av resultatet, de viser resultatene utenfor de midterste 50 prosentene.

4.3.3 F og U gruppene for ekstraksjonsmetoden på plate 2

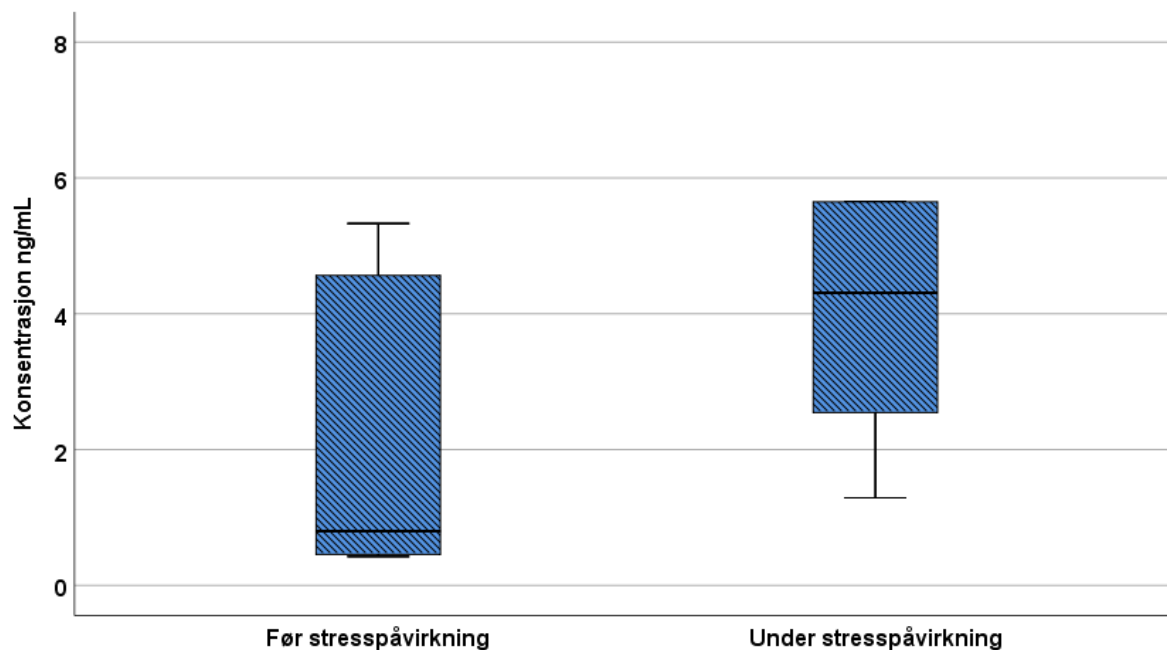
For EP2 kan man se i *Figur 11* at den ene boksen er litt høyere enn den andre. Begge gruppene har en maksimumsverdi som strekker seg en del unna interkvartilområdet, som tyder på en ekstremverdi. F-gruppens median er veldig lav, så halvparten av resultatene har en lavere konsentrasjon av kortisol. For U-gruppen er medianen litt over midten av boksen, som tyder på en større variasjon mellom konsentrasjonene, og at de fleste av prøvene i gruppe U er høyere enn i gruppe F. I *Figur 22* (Vedlegg 8.3) viser hypotesetesten for EP2 en signifikans på 0,240. Dette er over signifikansnivået og null-hypotesen blir beholdt.



Figur 11 viser gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i de ulike prøvene i hver gruppe (F og U) for EP2 fremstilt i et boksplott. Medianen er linjen i hver boks, der boksene inneholder 50% av fordelingene av resultatet. Over og under boksen er det whiskers som viser minimum og maksimumsverdi av resultatet, de viser resultatene utenfor de midterste 50 prosentene.

4.3.4 F og U gruppene for ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 2

For gruppene i SDR2 er det ene boksplottet litt mindre enn det andre som man kan se av *Figur 12*. U-gruppen har et mer konsentrert interkvartilområde, det betyr at konsentrasjonen av resultatet ligger tettere og har en høyere verdi. F-gruppen har en veldig lav median, som betyr at mesteparten av konsentrasjonene av kortisol i prøvene også er lave. U-gruppens median er litt over midten av boksen som viser en mer variert konsentrasjon, som er på den høyere siden. Hypotesetesten som vises i *Figur 22 (Vedlegg 8.3)* for SDR2 viser en signifikans på 0,093, som er høyere enn signifikansnivået på 0,05 og null-hypotesen blir forkastet.



Figur 12 viser gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i de ulike prøvene i hver gruppe (F og U) for SDP2 fremstilt i et boksplott. Medianen er linjen i hver boks, der boksene inneholder 50% av fordelingene av resultatet. Over og under boksen er det whiskers som viser minimum og maksimumsverdi av resultatet, de viser resultatene utenfor de midterste 50 prosentene.

4.4 Forskjeller og korrelasjon mellom metoder

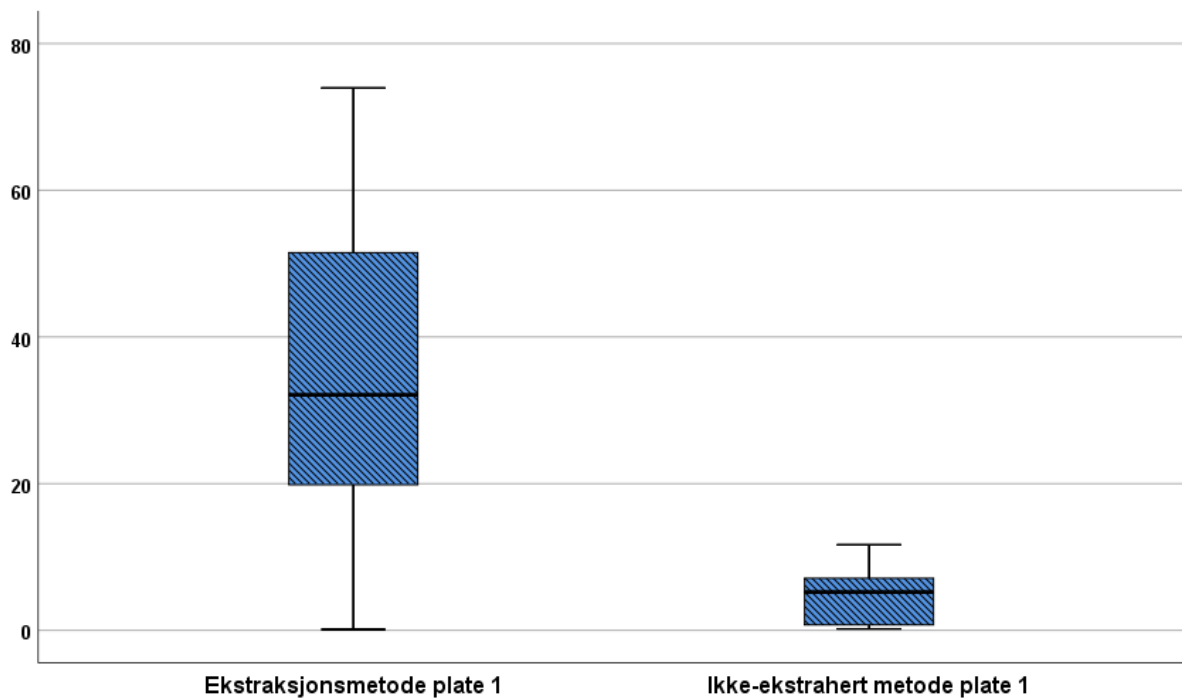
De statistiske analysemetodene som ble gjennomført var en Pearson-korrelasjonstest som sjekker om det er korrelasjon mellom metodene. Dersom det er positiv korrelasjon antyder det en sammenheng mellom metodene. Hypotesetesten «Related samples Wilcoxon signed rank test» er en forskjells-test som ble utført for å se om det var forskjell mellom metodene. Nullhypotesen som ble tatt i bruk er «det er ingen forskjell mellom metodene» og hypotesen er «det er en forskjell mellom metodene». Resultatene ble fremstilt i boksplott for å illustrere forskjellen i konsentrasjon mellom ekstraheringsmetoden og ikke-ekstraksjonsmetoden.

4.4.1 Forskjeller mellom ekstraksjonsmetoden og ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 1

Ved å se på boksplottet for EP1 og SDR1, er boksen for ekstraksjonsmetoden i *Figur 13* både større og har høyere konsentrasjon enn boksen for ikke-ekstraksjonsmetoden. Man kan også se forskjellen i kortisolnivå ved at interkvartilområdet strekker seg over et bredere området og at medianen er mye høyere. Boksen for ekstraksjonsmetoden har i tillegg whiskere som strekker

seg langt ut, som viser til en større forskjell mellom minimumsverdi og maksimumsverdi. Fordelingen av kortisolkonsentrasjon i plasma er derfor varierende og strekker seg over et større område enn kortisolkonsentrasjonen i ikke-ekstraheringsmetoden. Boksen for ikke-ekstraksjonsmetoden er veldig lav, og medianen ligger omtrent midt i boksen. I tillegg strekker ikke whiskere seg langt fra boksen, slik at maksverdi og minimumsverdi ikke skiller seg ut fra interkvartilområdet. Boksen for ikke-ekstraksjonsmetoden er veldig lav fordi fordelingen av kortisolkonsentrasjonen er lav.

Mellom EP1 og SDR1 ga korrelasjonsanalysen korrelasjonskoeffisienten 0,783, som kan ses i *Figur 17 (Vedlegg 8.1)*. Dette tyder på en positiv korrelasjon mellom EP1 og SDR1. Hypotesetesten fra *Figur 20 (Vedlegg 8.2)* ga et signifikansnivå på 0,005, som er mindre enn 0,05. Man forkaster dermed null-hypotesen.

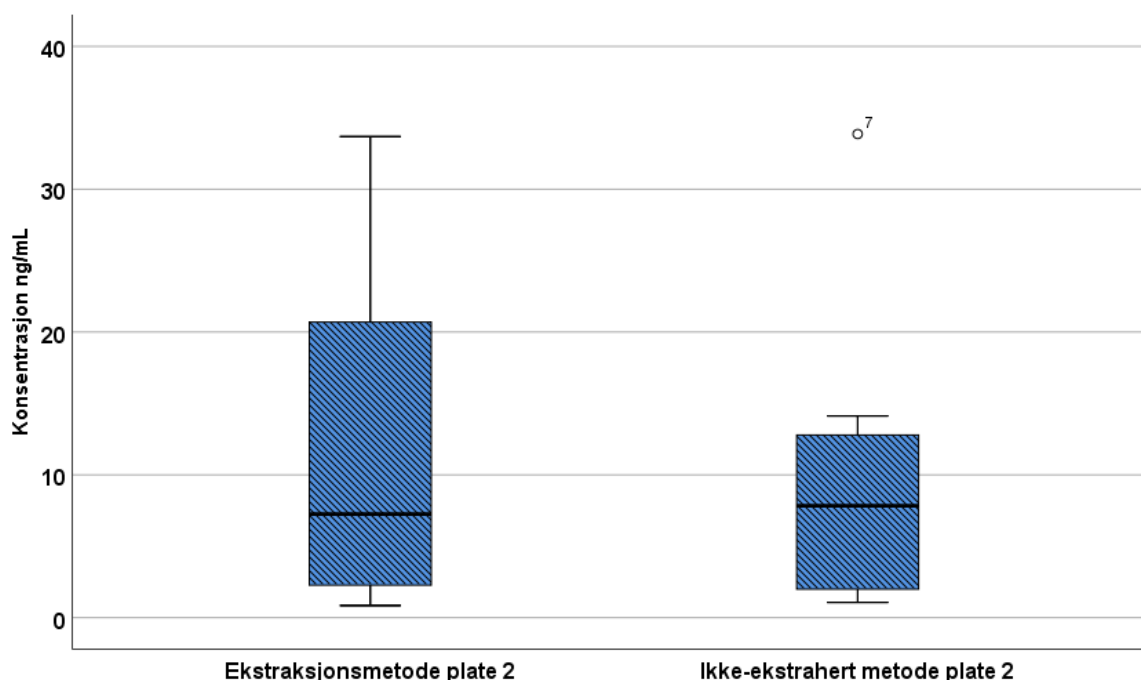


Figur 13 viser gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i de ulike prøvene for ekstraksjonsmetode plate 1 og ikke-ekstraksjonsmetode plate 1, fremstilt i et boksplott. Medianen er linjen i hver boks, der boksene inneholder 50% av fordelingene fra resultatene. Over og under boksen er det whiskers som viser minimum og maksimumsverdi av resultatet, de viser resultatene utenfor de midterste 50 prosentene.

4.4.2 Forskjeller mellom ekstraksjonsmetoden og ikke-ekstraksjonsmetoden på plate 2

Figur 14 viser for EP2 og SDR2, at ekstraksjonsmetodens kortisolkonsentrasjon er mye høyere enn den ikke-ekstraherte metoden. Dette kan også bli sett ved at interkvartilområdet strekker seg over et bredere område. I tillegg har ekstraksjonsmetoden whiskere som strekker seg ut som viser til en forskjell mellom minimum- og maksimumsverdi. Fordelingen av konsentrasjon av kortisol er altså høyere og strekker seg over et større område enn ikke-ekstraksjonsmetoden. Kortisolnivået for ikke-ekstraksjonsmetoden på denne platen er også lav, som ses ved at interkvartilområdet ligger lavere i forskjell til den ekstraherte metoden. Imidlertid ligger medianen høyere hos ikke-ekstraksjonsmetoden. Boksen for ikke-ekstraksjonsmetoden har en uteligger, som er prøve 7, som er markert i figuren. I tillegg strekker ikke whiskerene seg langt fra boksen, som betyr at prøvene er konsentrerte rundt interkvartilområdet. Det at boksen er lav tyder på at kortisolkonsentrasjonen i plasma for denne metoden er lav.

Etter gjennomført Pearson-korrelasjonstest som kan ses i Figur 18 (Vedlegg 8.1), ble korrelasjonskoeffisienten mellom SDR2 og EP2 0,904. Dette er en sterk korrelasjon mellom metodene på plate to. Etter gjennomført hypotesetest som vises i Figur 21 (Vedlegg 8.2), fikk man et signifikansnivå på 0,136. Dette er høyere enn 0,05 og null-hypotesen blir beholdt.



Figur 14 viser gjennomsnittet \pm standardavviket (SD) av konsentrasjonene i de ulike prøvene for ekstraksjonsmetode plate 2 og ikke-ekstraksjonsmetode plate 2, fremstilt i et boksplott. Medianen er linjen i hver boks, der boksene inneholder 50% av fordelingene fra resultatet. Over og under boksen er det whiskers som viser minimum og maksimumsverdi av resultatet, de viser resultatene utenfor de midterste 50 prosentene. Utligger vises som en sirkel over selve boksen for ikke-ekstraksjonsmetoden.

5 DISKUSJON

Kortisol er en interessant stressmarkør, som kan føre til en viktig utvikling i oppdrettspraksis for å hjelpe til å redusere stress i akvakulturvirksomheten (7). Kortisol er et kortikosteroid og er et av hormonene som finnes i alle organismer (16). Det er involvert i aktiveringen av en kaskade av metabolske og fysiologiske endringer, som gir energi som er nødvendig for umiddelbar overlevelse (3, 10, 15, 16). Konsentrasjonen av kortisol i plasma vil variere blant arter som respons til deres omgivelser. Responsen kan være akutt, men kan forbli forhøyet ved kronisk eksponering av stressorene og ha en skadelig effekt på flere aspekter av en organismes fysiologi (3, 7). Som en stressmarkør kan kortisol indikere hvordan omgivelsene påvirker individuell fisk og hva som påvirker dens adferd. Stressresponsene i fisk kan bli sett i resultatene fra stresstesten for F og U- gruppene. Det er antatt at kortisolnivået vil være høyere i U-gruppen enn F-gruppen, men resultatet fra hypotesetesten ga et annet resultat enn forventet. Bare prøvene fra SDR1 indikerer at man forkaster null-hypotesen «det er ingen forskjell mellom gruppene». Imens de andre gruppene antydte at man beholdt null-hypotesen. Ut fra et teoretisk standpunkt var det ønskelig å forkaste null-hypotesen, da dette beviser at fisk under stress får økt kortisolnivå i plasma. Flere av boksplokkene som beholder null-hypotesen har en ekstremverdi; enten minimums- eller maksimumsverdi, som for eksempel *Figur 9* i resultatdelen. En ekstremverdi endrer på statistikken til den relevante gruppen og vil som en konsekvens negativt påvirke resultatets nøyaktighet. Det er derfor mulig at resultatet fra hypotesetestene hadde blitt annerledes om ekstremverdiene ikke var tilstede, som igjen hadde bevist at oppdrettslaksen syntetiserte mer kortisol i en stresset situasjon. Fremtidige studier burde inkludere flere prøver for både F- og U-gruppene, som gir en tydeligere variasjon mellom gruppene. Da er det mulig at man kan unngå ekstremverdier og vil få et tydeligere svar på om det virkelig er en forskjell mellom laksens stressrespons før og under påvirkning av stress.

Optimalisering av ekstraksjonsmetoden gir et mer nøyaktig resultat for Neogen-kittet. Det ble testet ut ulike ekstraksjonsvarianter; 30 sekund blanding som standard, to minutt blanding, 30 sekund blanding og to ekstraksjoner, og til slutt tre ekstraksjoner med 30 sekunder blanding. Dette ble gjort for å finne den optimaliserte ekstraksjonsmetoden til å sammenligne med ikke-ekstraksjonsmetoden. Resultatet viser at både lengre blandingstid, samt økt mengde ekstraheringer forbedret kortisolkonsentrasjonen. Den utvalgte ekstraksjonsmetoden ble to minutt blanding av prøvene og en ekstrahering. Denne varianten ga en nøyaktig kortisolkonsentrasjon, var praktisk egnet, samt tidseffektiv. Fremtidige studier burde teste ut

flere ulike varianter av ekstraksjonsmetoden. De ekstraksjonsvariasjonene som ble testet ble valgt fordi eksperimentet var under et gitt budsjett, det var gunstig tidsmessig og det virket logisk ut fra resultatene. Andre mulige varianter som kan testes ut er for eksempel, ett- og tre minutt blanding av prøvene før ekstrahering. Resultatet av de ulike ekstraksjonskonsentrasjonene kan ses i *Figur 23 og 24 (Vedlegg 8.4)* som vil bekrefte at generelt så vil økt mengde ekstraheringer og blandingstid øke kortisolkonsentrasjonen. En svakhet med dette forsøket er at konsentrasjonen av flere prøver er over 10 ng/ml. Dette resulterer i unøyaktig avlesing av resultatene, da standardkurvetoppen er 10 ng/ml. Konsentrasjoner som måles over standardkurvetoppen vil bli avlest unøyaktig og en kan ikke være sikker på prøvens ekte konsentrasjon. For dette forsøket gjaldt denne svakheten spesielt for to og tre ekstraheringer, som kan forklare hvorfor konsentrasjonen til to ekstraheringer noen ganger var høyere enn tre ekstraheringer. En annen mulighet for at resultatene varierte litt mellom platene er fordi ulike fortyninger ble tatt i bruk. Ved plate 1 fortyndet man to ganger, som ikke var nok da konsentrasjonene oversteg 10 ng/ml. For plate 2 fortyndet man derfor fem ganger. Igjen viste det seg å ikke være tilstrekkelig for de ekstraksjonsvariantene hvor man ekstraherte flere ganger. Om en har større budsjettet og mer tid anbefales det å fortsette å prøve ut fortyninger, til man fikk konsentrasjoner som er under 10 ng/ml.

Flere immunoassay kan brukes til å analysere kortisol, men det er alltid noen som er billigere, mer nøyaktig og enklere å bruke i praksis. For dette forsøket prøvde man å optimalisere det kompetitive ELISA-kittet fra Neogen. Enzo-kittet som også kan brukes til å analysere kortisol er mye raskere da en bare tilsetter SDR, men til gjengjeld så er det mye dyrere. Planen var å erstatte ekstraheringsmetoden for Neogen-kittet, da dette er veldig tidskrevende, med SDR fra Enzo kittet. SDR vil direkte bryte bindingene mellom plasmaprotein og kortisol slik en får fritt kortisol som kan måles. Om denne ikke-ekstraherende metoden er like nøyaktig for Neogen-kittet som ekstraheringsmetoden hadde det blitt en god erstatning og kittet optimalisert. Problemstillingen ble derfor «Kan Neogen-kittet forenkles, og samtidig beholde nøyaktigheten i måling av kortisol?». For å teste ut om ikke-ekstraksjonsmetoden var like bra som den ekstraherte metoden ble det utført en Pearson-korrelasjonstest og for begge platene viste det seg å være en positiv korrelasjon mellom metodene, spesielt for plate to som kan ses i *Figur 18 (Vedlegg 8.1)*. Dette antyder at det er en sammenheng mellom metodene og man kan bruke begge for å få omtrent samme resultat fra kortisolanalysen. En hypotesetest ble gjennomført for å se forskjellene mellom metodene, som ble illustrert i boksplokk. Det var ulike resultat imellom

hypotesetestene. Resultatet fra plate 1 forkastet null-hypotesen, «det er ingen forskjell mellom metodene», imens plate 2 beholdt null-hypotesen. Dette indikerer at det er en forskjell i prøveresultatet mellom de ulike metodene som vises tydeligere av boksploTTene i *Figur 13 og 14* under resultat. Spesielt om man ser på *Figur 14* legger man merke til at prøve 7 fra ikke-ekstraksjonsmetoden er en uteligger, som påvirker resten av resultatet med å øke gjennomsnittet for kortisolkonsentrasjon. Dette kan forklare hvorfor null-hypotesen blir beholdt i denne situasjonen, når man forventet at den skulle bli forkastet. Derfor om en fokuserer på resultatet fra den første platen er det en sterk antydning på at det er en forskjell imellom metodene for måling av kortisolkonsentrasjon. Hypotesetesten forkastet null-hypotesen, som indikerer forskjell imellom prøvene, og ved å se på boksploTTene så vil man se en betraktelig forskjell i målt konsentrasjon imellom metodene. Dette betyr at selv om det er en korrelasjon imellom metodene og resultatet er relevant, så er det tydelig at ekstraksjonsmetoden er mer nøyaktig enn ikke-ekstraksjonsmetoden. Det anbefales derfor at fremtidige studier finner en SDR som er mer kompatibel med Neogen-kittet og er enda mer spesifisert for kortisol fra fiskeplasma.

6 KONKLUSJON

Målet for denne oppgaven var å se om en kunne forenkle Neogen-kittet, ved å erstatte ekstraksjonstrinnet med SDR fra Enzo-kittet. Grunnlaget baserer seg på et tidligere studie hvor Neogen-kittet og Enzo-kittet sammenlignes, og ga korrelerende resultater. Siden Neogen-kittet er tidskrevende, imens Enzo kittet er dyrere kom man frem til at man kunne kombinere kittene. Dette vil da forenkle Neogen-kittet ved å erstatte ekstraksjonstrinnet med SDR fra Enzo, som igjen vil bli billigere enn å bruke Enzo-kittet. Dette førte til problemstillingen «Kan Neogen-kittet forenkles, og samtidig beholde nøyaktigheten i måling av kortisol?».

Det er fire trinn som ble dannet for å prøve å besvare denne problemstillingen; korrelasjon og forskjeller mellom platene, optimalisering av ekstraksjonsmetoden, stresstest og korrelasjon og forskjeller mellom metodene. Først for å kvalitetssikre at resultatene er repeterbare og stabile ble forsøket gjennomført på to plater. Det var korrelasjon for prøvene mellom platene, for både de ekstraherte og de ikke-ekstraherte prøvene. Imidlertid ble null-hypotesene forkastet for begge metodene, noe som antyder forskjell mellom platene. Det neste trinnet var optimaliseringen av ekstraksjonsmetoden, da det var ønskelig å sammenligne metodene som gir best resultat. Den utvalgte ekstraksjonsmetoden ble to minutters blanding av prøvene, og en ekstrahering. Denne varianten ga en nøyaktig kortisolkonsentrasjon og er den som var mest tidseffektiv. Deretter ble det gjennomført en stresstest der prøver fra før og under stresspåvirkning ble sammenlignet. Dette var for å sjekke at det var en forskjell i kortisolnivå i fiskeplasma før og under stresspåvirkning. På grunn av for få prøver og noen ekstremverdier ble ikke resultatet optimalt. Likevel var det en sterk antydning til en forskjell mellom kortisolnivå i fisk før og under påvirkning av stress, der kortisolnivå er høyere under stresspåvirkning, enn før stresspåvirkning. Det siste trinnet var å se etter korrelasjon og forskjell mellom ekstraksjon- og ikke-ekstraksjonsmetodene. Resultatet viser en tydelig korrelasjon imellom ekstraheringsmetoden og ikke-ekstraheringsmetoden. Hypotesetesten viste derimot en signifikant forskjell mellom resultatene og at kortisolnivået fra ikke-ekstraheringsmetoden var betraktelig lavere enn resultatene fra ekstraheringsmetoden. Dette tyder på at resultatet er relevant, men at ikke-ekstraksjonsmetoden generelt har lavere kortisolkonsentrasjon enn ekstraksjonsmetoden. Man burde derfor prøve å finne en SDR som er mer kompatibel med Neogen-kittet for å få et bedre resultat.

Når det gjelder fremtidig arbeid med det som ble oppnådd i dette forsøket anbefales det å finne en SDR som er mer kompatibel med Neogen-kittet og kortisol fra fiskeplasma. I tillegg burde fremtidige studier finne den optimale fortynningen for kortisol i fiskeplasma, slik at den holder seg under 10 ng/ml. Dette gjør at plateleseren kan lese resultatet nøyaktig. Det er også anbefalt å bruke enda flere prøver fra hver gruppe for å få tydeligere variasjon i resultatet, og unngå at ekstremverdier vil påvirke det negativt. På denne måten vil man få et resultat som er like nøyaktig og en prosedyre som er enklere å bruke enn ekstraksjonsmetoden for Neogen-kittet.

7 REFERANSELISTE

1. Branson EJ, Fish Veterinary S. Fish welfare. Oxford: Fish Veterinary Society Blackwell; 2008. 37-8 p.
2. Folkedal O, Torgersen T, Olsen RE, Fernö A, Nilsson J, Oppedal F, et al. Duration of effects of acute environmental changes on food anticipatory behaviour, feed intake, oxygen consumption, and cortisol release in Atlantic salmon parr. *Physiology & Behavior*. 2012;105(2):283-91.
3. Cao Y, Tveten A-K, Stene A. Establishment of a non-invasive method for stress evaluation in farmed salmon based on direct fecal corticoid metabolites measurement. *Fish & Shellfish Immunology*. 2017;66:317-24.
4. Noble C, Nilsson J, Stien LH, Iversen M, Kolarević J, Gismervik K. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks : hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. Tromsø: Nofima; 2018.
5. Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 1997;77(3):591-625.
6. Wendelaar Bonga SE. HORMONAL RESPONSES TO STRESS | Hormone Response to Stress. In: Farrell AP, editor. *Encyclopedia of Fish Physiology*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 1515-23.
7. Leatherland JF, Woo PTK. *Fish Diseases and Disorders, 2 : Non-Infectious Disorders*. Wallingford, UNITED KINGDOM: CABI; 2010.
8. McCormick SD, Shrimpton JM, Carey JB, O'Dea MF, Sloan KE, Moriyama S, et al. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*. 1998;168(1):221-35.
9. Barton BA. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids¹. *Integrative and Comparative Biology*. 2002;42(3):517-25.
10. Ellis T, Yildiz H, López-Olmeda J, Spedicato M, Tort L, Øverli Ø, et al. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2012;38(1):163-88.
11. Wu H, Ohnuki H, Hibi K, Ren H, Endo HJFP, Biochemistry. Development of a label-free immunosensor system for detecting plasma cortisol levels in fish. 2016;42(1):19-27.

12. Mommsen T, Vijayan M, Moon T. Cortisol in teleost Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation1999. 211-68 p.
13. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2006;8(4):383-95.
14. Foobar. Cortisol [Webpage]. Wikimedia commons: Wikimedia commins; 2006 [updated 2014/30/12; cited 2019 18/03]. Chemical structure of cortisol]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cortisol.png>.
15. Katsu Y, Iguchi T. Subchapter 95D - Cortisol. In: Takei Y, Ando H, Tsutsui K, editors. *Handbook of Hormones*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 533-e95D-2.
16. Ramirez LF. Cortisol. In: Loue S, Sajatovic M, editors. *Encyclopedia of Immigrant Health*. New York, NY: Springer New York; 2012. p. 496-7.
17. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids2009. 1205-17 p.
18. Crowther JR. *The ELISA Guidebook: Second Edition*: Humana Press; 2008.
19. Scientific TF. What is ELISA (enzme-linked immunoabsorbent assay)? [Web Page]. Thermo Fisher Scientific [cited 2019 14/05]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>.
20. Sciences S. ELISA [Web Page]. SBH Sciences [cited 2019 13/04]. Available from: <https://www.sbhsciences.com/ELISA.asp>.
21. Berg JP. Radioimmunoassay Store medisinske leksikon [updated 2018/20/02; cited 2019 23/04]. Available from: <https://sml.snl.no/radioimmunoassay>.
22. Hashim H. chromatography and HPLC principles2018.
23. Wibetoe G. kromatografi Store norske leksikon [updated 2018/20/02; cited 2019 24/04]. Available from: <https://snl.no/kromatografi>.
24. Sundh H, Calabrese S, Jutfelt F, Niklasson L, Olsen R-E, Sundell K. Translocation of infectious pancreatic necrosis virus across the intestinal epithelium of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 2011;321(1):85-92.

25. Lovdata. Lov om dyrevelferd [web page]. Lovdata: Lovdata; 2009 [cited 2019 04/05]. Available from: <https://lovdata.no/dokument/LTI/lov/2009-06-19-97>.
26. Larsen LA. Identification and evaluation of innovation opportunities in the fish farming industry emerging from technology trends [Master's thesis]. Stavanger: University of Stavanger; 2018.
27. Akvagrøp. Net Cleaning Rigs [webpage]. Akvagrøp: Akvagrøp; [cited 2019 06/05]. Available from: <https://www.akvagrøp.com/pen-based-aquaculture/net-cleaning/net-cleaning-rigs>.
28. Frøslie KF. Korrelasjon Store norske leksikon snl; 2018 [updated 2018/21/03; cited 2019 14/04]. Available from: <https://snl.no/korrelasjon>.
29. Moore DS, Notz WI, Fligner MA. The Basic Practice of Statistics: Worth Publishers; 2015.

8 VEDLEGG

8.1 Korrelasjonstest

Correlations

		EP1	EP2
EP1	Pearson Correlation	1	,753**
	Sig. (2-tailed)		,005
	N	12	12
EP2	Pearson Correlation	,753**	1
	Sig. (2-tailed)	,005	
	N	12	12

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Figur 15 viser en gjennomført korrelasjonstest av typen Pearson-korrelasjon. Testen er 2-sidig og har et signifikansnivå på 0,01. Korrelasjonstesten gir et tall mellom -1 og 1 som angir i hvilken grad de to variablene EP1 og EP2 er lineært relaterte.

Correlations

		SDR1	SDR2
SDR1	Pearson Correlation	1	,833**
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	12	12
SDR2	Pearson Correlation	,833**	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	12	12

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Figur 16 viser en gjennomført korrelasjonstest av typen Pearson-korrelasjon. Testen er 2-sidig og har et signifikansnivå på 0,01. Korrelasjonstesten gir et tall mellom -1 og 1 som angir i hvilken grad de to variablene SDR1 og SDR2 er lineært relaterte.

Correlations

		SDR1	EP1
SDR1	Pearson Correlation	1	,783**
	Sig. (2-tailed)		,003
	N	12	12
EP1	Pearson Correlation	,783**	1
	Sig. (2-tailed)	,003	
	N	12	12

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Figur 17 viser en gjennomført korrelasjonstest av typen Pearson-korrelasjon. Testen er 2-sidig og har et signifikansnivå på 0,01. Korrelasjonstesten gir et tall mellom -1 og 1 som angir i hvilken grad de to variablene SDR1 og EP1 er lineært relaterte.

Correlations

		EP2	SDR2
EP2	Pearson Correlation	1	,904**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	12	12
SDR2	Pearson Correlation	,904**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	12	12

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Figur 18 viser en gjennomført korrelasjonstest av typen Pearson-korrelasjon. Testen er 2-sidig og har et signifikansnivå på 0,01. Korrelasjonstesten gir et tall mellom -1 og 1 som angir i hvilken grad de to variablene EP2 og SDR2 er lineært relaterte.

8.2 Hypotesetest

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between SDR1 and SDR2 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,006	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Figur 19 viser en «Wilcoxon Signed Rang test» for relaterte prøver. Testen gir et tall for signifikansen, og en avgjørelse om null-hypotesen skal forkastes eller ikke. Testen har et signifikansnivå på 0,05, viser signifikansen et tall over 0,05 beholder vi hypotesen og dersom signifikansen er under 0,05 blir null-hypotesen forkastet. Null-hypotesen i denne hypotesetesten er «Gjennomsnittet av forskjeller mellom SDR1 og SDR2 er lik 0».

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between SDR1 and EP1 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,005	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Figur 20 viser en «Wilcoxon Signed Rang test» for relaterte prøver. Testen gir et tall for signifikansen, og en avgjørelse om null-hypotesen skal forkastes eller ikke. Testen har et signifikansnivå på 0,05, viser signifikansen et tall over 0,05 beholder vi hypotesen og dersom signifikansen er under 0,05 blir null-hypotesen forkastet. Null-hypotesen i denne hypotesetesten er «Gjennomsnittet av forskjeller mellom SDR1 og EP1 er lik 0».

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between EP2 and SDR2 equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,136	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Figur 21 viser en «Wilcoxon Signed Rang test» for relaterte prøver. Testen gir et tall for signifikansen, og en avgjørelse om null-hypotesen skal forkastes eller ikke. Testen har et signifikansnivå på 0,05, og viser signifikansen et tall over 0,05 beholder vi hypotesen og dersom signifikansen er under 0,05 blir null-hypotesen forkastet. Null-hypotesen i denne hypotesetesten er «Gjennomsnittet av forskjeller mellom SDR1 og EP1 er lik 0» Null-hypotesen beholdes.

8.3 Uavhengig hypotesetest

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of SDR1 is the same across categories of VAR00006.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,041 ¹	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of SDR2 is the same across categories of VAR00006.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,093 ¹	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of EP1 is the same across categories of VAR00006.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,180 ¹	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of EP2 is the same across categories of VAR00006.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,240 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Figur 22 viser beregningene fra programmet SPSS for utført hypotesetest for uavhengig test. Whitney U test. Her vises utregnet signifikans, null-hypotese og avgjørelsen om null-hypotesen skal forkastes eller ikke. Null-hypotese: Det er en forskjell mellom F og U. Hypotese: Det er ingen forskjell mellom F og U.

8.4 Beregnet konsentrasjoner fra metode sammenligningen

Neogen:			Beregnet konsentrasjon
F5x1	0,5149	0,5243	0,0333
F5x2	0,1486	0,1288	2,5596
F5x3	0,3762	0,3865	0,0921
U3x1	0,0782	0,0855	14,4907
U3x2	0,0921	0,0988	8,7429
U3x3	0,0791	0,0747	17,7886
F6x1	0,4344	0,4733	0,052
F6x2	0,2309	0,2435	0,4387
F6x3	0,3209	0,3432	0,1452
U5x1	0,1085	0,0932	7,2962
U5x2	0,0856	0,0731	16,0461
U5x3	0,0616	0,0599	38,6069

Figur 23 viser resultatet av OD-verdien og den beregnede konsentrasjonen for forsøk 1. Det ble brukt prøver tatt før stresspåvirkning (F) og under stresspåvirkning (U). Prøvene viser konsentrasjonen av kortisol i plasma i ng/ml for en, to og tre ekstraksjoner som et forarbeid til forsøket for å finne ut hvilken ekstraksjonsmetode som var best.

Neogen:			Beregnet konsentrasjon
F5x1	0,5961	0,5780	2,4897
F5x2	0,5557	0,5528	2,9151
F5x3	0,5632	0,5618	2,7993
U3x1	0,5747	0,5848	2,5767
U3x2	0,4101	0,3934	7,0492
U3x3	0,5133	0,463	4,1305
F6x1	0,5195	0,5188	3,4884
F6x2	0,4211	0,3768	7,1858
F6x3	0,8564	0,827	0,9263
U5x1	0,4829	0,3795	5,8054
U5x2	0,3738	0,3437	9,6171
U5x3	0,5207	0,4866	3,7910

Figur 24 viser resultatet av OD-verdien og den beregnede konsentrasjonen for forsøk 2. Det ble brukt prøver tatt før stresspåvirkning (F) og under stresspåvirkning (U). Prøvene viser konsentrasjonen av kortisol i plasma i ng/ml for en, to og tre ekstraksjoner som et forarbeid til forsøket for å finne ut hvilken ekstraksjonsmetode som var best.

8.5 NEOGEN-prosedyre



Cortisol ELISA Kit Instructions

Please read all instructions carefully before beginning this assay

PRODUCT #402710

For Research Use Only

Store kit at 4°C at all times

Do not freeze kit components

DESCRIPTION

Cortisol, or hydrocortisone, is the primary corticosteroid secreted by the adrenal cortex. Cortisol is synthesized from cholesterol and may be found in the blood as free Cortisol or bound to corticosteroid-binding globulin. The release of Cortisol is controlled by ACTH, which is produced in the anterior pituitary. Plasma Cortisol levels are highest in the morning and decrease throughout the day. Cortisol concentration in the plasma also elevates in response to stress. Cortisol has an anti-inflammatory effect and aids in carbohydrate metabolism, renal function and the promotion of gluconeogenesis.

Measurement of plasma Cortisol levels is useful in diagnosing conditions related to functions of the adrenal cortex, including Cushing's syndrome (hypercortisolism), Addison's disease (hypocortisolism) and adrenal tumors. Abnormal Cortisol levels may also possibly be linked to prostate cancer, depression, and schizophrenia.

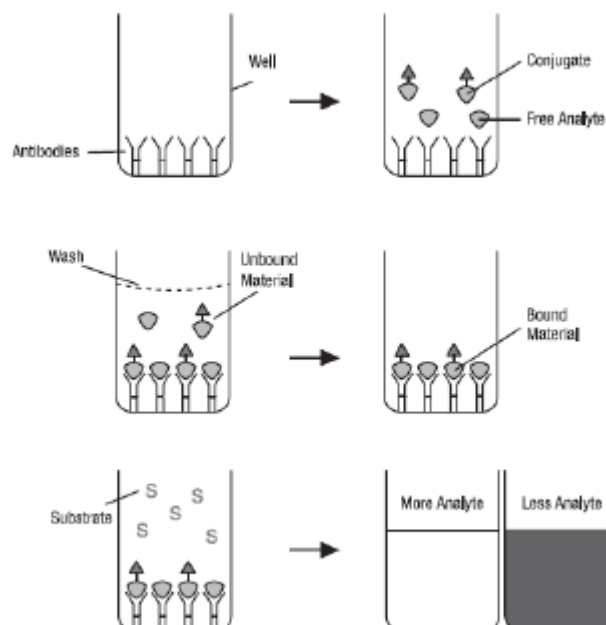
PRINCIPLE OF ASSAY

This is an ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) for the quantitative analysis of Cortisol levels in biological fluid. This test kit operates on the basis of competition between the enzyme conjugate and the Cortisol in the sample for a limited number of binding sites on the antibody coated plate.

The sample or standard solution is first added to the microplate. Next, the diluted enzyme conjugate is added and the mixture is shaken and incubated at room temperature for one hour. During the incubation, competition for binding sites is taking place. The plate is then washed removing all the unbound material. The bound enzyme conjugate is detected by the addition of substrate which generates an optimal color after 30 minutes. Quantitative test results may be obtained by measuring and comparing the absorbance reading of the wells of the samples against the standards with a microplate reader at 650 nm. The extent of color development is inversely proportional to the amount of Cortisol in the sample or standard. For example, the absence of Cortisol in the sample will result in a bright blue color, whereas the presence of Cortisol will result in decreased or no color development.

Figur 25 viser side 1 i prosedyren fra Neogen.

PRINCIPLE OF ASSAY (continued)



MATERIALS PROVIDED

1. EIA BUFFER: 30 mL. Provided to dilute enzyme conjugate and Cortisol standards.
2. WASH BUFFER (10X): 20 mL. Dilute 10-fold with deionized water. Diluted wash buffer is used to wash all unbound enzyme conjugate, samples and standards from the plate after the one hour incubation.
3. K-BLUE SUBSTRATE: 20 mL. Stabilized 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB) plus Hydrogen Peroxide (H_2O_2) in a single bottle. It is used to develop the color in the wells after they have been washed. Keep substrate refrigerated. LIGHT SENSITIVE.
4. EXTRACTION BUFFER (5X): 30 mL. Dilute 5-fold with deionized water. This buffer is used for diluting extracted and non-extracted samples.
5. CORTISOL ENZYME CONJUGATE: 150 μ L. Cortisol horseradish peroxidase concentrate. Blue capped vial.
6. CORTISOL STANDARD: 100 μ L. Cortisol standard provided at the concentration of 1 μ g/mL in methanol. Green capped vial.
7. CORTISOL ANTIBODY-COATED MICROPLATE: A 96 well Costar™ microplate with anti-Cortisol rabbit antibody pre-coated on each well. The plate is ready for use as is. DO NOT WASH!

MATERIALS NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. 300 mL deionized water to dilute wash buffer and extraction buffer.
 2. Precision pipettes that range from 10 μ L-1000 μ L and disposable tips.
- NOTE: If all or several strips are to be used at one time, it is suggested that a multichannel pipette be used.
3. Clean test tubes used to dilute the standards and conjugate.
 4. Graduated cylinders to dilute and mix wash buffer and extraction buffer.
 5. Microplate reader with 650 nm filter.
 6. Plate cover or plastic film to cover plate during incubation.

Figur 26 viser side 2 i prosedyren fra Neogen.

OPTIONAL MATERIALS:

7. 1 N HCl or Neogen's Red Stop Solution.
8. Microplate shaker.

If performing an extraction on samples, the following will be required:

9. Ethyl ether or ethyl acetate
10. Nitrogen gas
11. Vortex

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. DO NOT use components beyond expiration date.
2. DO NOT mix any reagents or components of this kit with any reagents or components of any other kit. This kit is designed to work properly as provided.
3. DO NOT pipette reagents by mouth.
4. Always pour substrate out of the bottle into a clean test tube - DO NOT pipette out of the bottle. If the pipette tip is unclean this could result in contamination of the substrate.
5. All specimens should be considered potentially infectious. Exercise proper handling precautions.
6. DO NOT smoke, eat or drink in areas where specimens or reagents are being handled.
7. Use aseptic technique when opening and removing reagents from vials and bottles.
8. Keep plate covered except when adding reagents, washing or reading.
9. Kit components should be refrigerated at all times when not in use.

PROCEDURAL NOTES

1. It is not necessary to allow reagents to warm to room temperature before use.
2. Desiccant bag must remain in foil pouch with unused strips. Keep zip-lock pouch sealed when not in use to maintain a dry environment.
3. Always use new pipette tips to pipette buffer, enzyme conjugate, standards and samples.
4. Before pipetting a reagent, rinse the pipette tip three times with that reagent (i.e. fill the tip with the desired amount of reagent and dispense back into the same vial - repeat 2 times). Now the tip is properly rinsed and ready to dispense the reagent into your well or test tube.
5. When pipetting into the wells, DO NOT allow the pipette tip to touch the inside of the well, or any of the reagents already in the well. This can result in cross contamination.
6. Standards and samples should be assayed in duplicate.
7. To quantitate, always run samples alongside a standard curve. If testing a sample that is not extracted, standards should be diluted in the same type of medium being tested. This medium should be known to be negative.
8. Gently mix specimens and reagents before use. Avoid vigorous agitation.
9. When using only partial amounts of a kit, it is recommended to transfer the appropriate volume of each reagent to a clean vessel for repeated dispensing. This will reduce reagent contamination caused by repeated sampling from the original container.
10. The enzyme conjugate is most stable in its concentrated form. Dilute only the volume necessary for the amount of strips currently being used.
11. Before taking an absorbance reading wipe the outside bottom of the wells with a lint-free wiper to remove dust and fingerprints.
12. Before opening the enzyme conjugate and standard vial, tap vial in an upright position to remove any liquid in the cap.

Figur 27 viser side 3 i prosedyren fra Neogen.

SAMPLE PREPARATION

This assay is non-species specific. Usually, urine and tissue culture supernatant can be assayed directly by diluting them with the diluted extraction buffer. Plasma and most other mediums will need to be extracted.

EXTRACTION OF CORTISOL

1. Pipette 100 μL of plasma into a glass tube (10x75 mm) and add 1 mL of ethyl ether.
2. Vortex the tube for 30 seconds and then allow the phases to separate.
3. Transfer the organic phase into a clean glass tube and evaporate the solvent with a stream of N_2 .
4. Dissolve the residue in 100 μL of diluted extraction buffer.
5. Dilute the extract 100 fold by adding 10 μL of the above extract into 990 μL of diluted extraction buffer.
6. Vortex and assay 50 μL in duplicates.
7. The values obtained are multiplied by 100 to give final ng/mL concentrations. If additional dilution is necessary, values must be multiplied by the additional dilution factor in order to calculate final ng/mL concentration.
8. If the concentration is higher than the high range of the standard curve, the samples in #6 need to be further diluted and reassayed.

NOTE: Extraction buffer must be diluted 5-fold with deionized water before use. Any precipitant present must be brought into solution before dilution.

TEST PROCEDURES

1. Prepare standards as follows:

Standard	Preparation
A	stock solution 1 $\mu\text{g/mL}$ (Provided in green capped vial)
B	take 20 μL of A, add to 980 μL of EIA buffer and mix=20 ng/mL
C	take 200 μL of B, add to 1.8 mL of EIA buffer and mix=2 ng/mL
D	take 200 μL of C, add to 1.8 mL of EIA buffer and mix=0.2 ng/mL

Continue standard preparation following Scheme I.

SCHEME I

Standards	ng/mL	EIA buffer (μL added)	B standard μL	C standard μL	D standard μL
S_0	0	as is	-	-	-
S_1	0.04	800	-	-	200
S_2	0.1	500	-	-	500
S_3	0.2	-	-	-	as is
S_4	0.4	800	-	200	-
S_5	1	500	-	500	-
S_6	2	-	-	as is	-
S_7	10	500	500	-	-

2. Determine the number of wells to be used.
3. Dilute the Cortisol enzyme conjugate. Add 1 μL of enzyme conjugate into 50 μL total volume of EIA buffer for each well assayed. For the whole plate, add 110 μL of the enzyme conjugate into 5.5 mL total volume of EIA buffer. Mix the solution thoroughly.

Figur 28 viser side 4 i prosedyren fra Neogen.

4. Add 50 μL of standards (S) or unknown (U) (some samples may require diluting) to the appropriate wells in duplicate. See Scheme II for suggested template design.
 5. Add 50 μL of the diluted enzyme conjugate to each well. Use 8-channel pipette or 12-channel pipette for rapid addition.
 6. Mix by shaking plate gently. A microplate shaker may be used.
 7. Cover plate with plastic film or plate cover and incubate at room temperature for one hour. NOTE: Keep plate away from drafts and temperature fluctuations.
 8. Dilute concentrated wash buffer with deionized water (i.e. 20 mL of wash buffer plus 180 mL of deionized water). Mix thoroughly.
 9. After incubation, dump out the contents of the plate. Tap out contents thoroughly on a clean lint-free towel.
 10. Wash each well with 300 μL of the diluted wash buffer. Repeat for a total of three washings. An automated plate washer can be used, however, increase wash cycles from three to five.
 11. Add 150 μL of substrate to each well. Use multichannel pipette for best results. Mix by shaking plate gently.
 12. Incubate at room temperature for 30 minutes.
 13. Gently shake plate before taking a reading to ensure uniform color throughout each well.
 14. Plate is read in a microplate reader at 650 nm. If a dual wavelength is used, set W_1 at 650 nm and W_2 at 490 nm.
 15. If accounting for substrate background, use 2 to 8 wells as blanks with only substrate in the wells (150 $\mu\text{L}/\text{well}$). Subtract the average of these absorbance values from the absorbance values of the wells being assayed.
- NOTE: Some microplate readers can be programmed to do these subtractions automatically when reading the plate. Consult your instrument manual.

OPTIONAL TEST PROCEDURES

16. Add 50-100 μL of 1 N HCl or Neogen's Red Stop Solution to each well to stop enzyme reaction.
 17. Read plate at 450 nm, if 1N HCl solution was used. Read plate at 650 nm, if Neogen's Red Stop Solution was used.
 18. Plot the standard curve and estimate the concentrations of the samples from the curve. See "CALCULATIONS."
- NOTE: Absorbance readings will approximately double when stopped with acid. If absorbance readings are too high for measuring with your microplate reader, decrease the substrate incubation by approximately 10 minutes but no more than 15 minutes.

SCHEME II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_0	S_0	U_1	U_1	U_9	U_9	U_{17}	U_{17}	U_{25}	U_{25}	U_{33}	U_{33}
B	S_1	S_1	U_2	U_2	U_{10}	U_{10}	U_{18}	U_{18}	U_{26}	U_{26}	U_{34}	U_{34}
C	S_2	S_2	U_3	U_3	U_{11}	U_{11}	U_{19}	U_{19}	U_{27}	U_{27}	U_{35}	U_{35}
D	S_3	S_3	U_4	U_4	U_{12}	U_{12}	U_{20}	U_{20}	U_{28}	U_{28}	U_{36}	U_{36}
E	S_4	S_4	U_5	U_5	U_{13}	U_{13}	U_{21}	U_{21}	U_{29}	U_{29}	U_{37}	U_{37}
F	S_5	S_5	U_6	U_6	U_{14}	U_{14}	U_{22}	U_{22}	U_{30}	U_{30}	U_{38}	U_{38}
G	S_6	S_6	U_7	U_7	U_{15}	U_{15}	U_{23}	U_{23}	U_{31}	U_{31}	U_{39}	U_{39}
H	S_7	S_7	U_8	U_8	U_{16}	U_{16}	U_{24}	U_{24}	U_{32}	U_{32}	U_{40}	U_{40}

CALCULATIONS

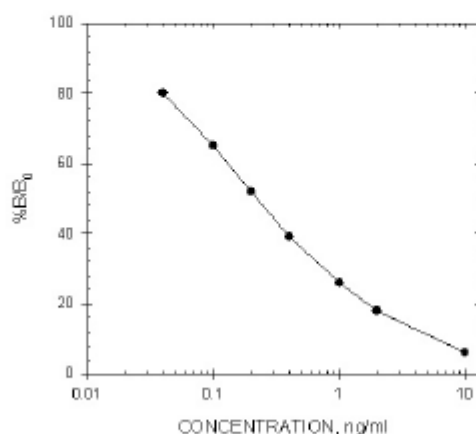
1. After the substrate background has been subtracted from all absorbance values, average all of your duplicate well absorbance values.
2. The average of your two S_0 values is now your B_0 value. (S_1 now becomes B_1 , etc.)
3. Next, find the percent of maximal binding ($\%B/B_0$ value). To do this, divide the averages of each standard absorbance value (now known as B_1 through B_7) by the B_0 absorbance value and multiply by 100 to achieve percentages.
4. Graph your standard curve by plotting the $\%B/B_0$ for each standard concentration on the ordinate (y) axis against concentration on the abscissa (x) axis. Draw a curve by using a curve-fitting routine (i.e. 4-parameter or linear regression).

Figur 29 viser side 5 i prosedyren fra Neogen.

5. Divide the averages of each sample absorbance value by the B_0 value and multiply by 100 to achieve percentages.
6. Using the standard curve, the concentration of each sample can be determined by comparing the $\%B/B_0$ of each sample to the corresponding concentration of Cortisol standard.
7. If the samples were diluted, the concentration determined from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL STANDARD CURVE

Cortisol in EIA Buffer



TYPICAL DATA

NOTE: "Typical data" is a representation. Variances in data will occur. Optical density readings may fluctuate during the shelf-life of the kit, but the $\%B/B_0$ should remain comparable. Measuring wavelength: 650 nm

Standard	Standard Concentration (ng/mL)	Optical Density (Absorbance Value)	$\%B/B_0$
$S_0 (B_0)$	0	1.235	100
$S_1 (B_1)$	0.04	0.984	80
$S_2 (B_2)$	0.1	0.808	65
$S_3 (B_3)$	0.2	0.642	52
$S_4 (B_4)$	0.4	0.486	39
$S_5 (B_5)$	1	0.318	26
$S_6 (B_6)$	2	0.217	18
$S_7 (B_7)$	10	0.080	6

CROSS REACTIVITY

CORTISOL	100.0%
PREDNISOLONE	47.4%
CORTISONE	15.7%
11-DEOXYCORTISOL	15.0%
PREDNISON	7.83%
CORTICOSTERONE	4.81%
6 β -HYDROXYCORTISOL	1.37%
17-HYDROXYPROGESTERONE	1.36%

Figur 30 viser side 6 i prosedyren fra Neogen.

DEOXYCORTICOSTERONE.....	0.94%
PROGESTERONE.....	0.06%
BETAMETHASONE.....	0.05%
DEHYDROEPIANDROSTERONE.....	0.03%
DEXAMETHASONE.....	0.03%
BECLOMETHASONE.....	0.01%
d-ALDOSTERONE.....	0.01%
TESTOSTERONE.....	0.01%
17 -HYDROXYPREGNENOLONE.....	<0.01%
ANDROSTENEDIONE.....	<0.01%
CHOLESTEROL.....	<0.01%
ESTRADIOL.....	<0.01%
ESTRIOL.....	<0.01%
ESTRONE.....	<0.01%
PREGNENOLONE.....	<0.01%

COPYRIGHT

All rights reserved worldwide. No part of this publication may be reproduced, transmitted, transcribed, or stored in any information-retrieval system, or translated into any human or computer language in any form or by any means (manual, electronic, mechanical, magnetic, optical, chemical, or otherwise) without expressed written permission.

WARRANTY

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the material from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen Corporation will provide a replacement product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product and any of the predictive models. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. Neogen Corporation shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

TECHNICAL ASSISTANCE

Technical assistance is available Monday-Friday, between 8:00 a.m. and 6:00 p.m. EST.



944 Nandino Blvd • Lexington KY 40511-1205 USA
 859/254-1221 or 800/477-8201 USA/CANADA
 Fax: 859/255-5532 • email: inform@neogen.com

©Neogen Corporation, 2014. Neogen®, K-Blue® and K-Gold® are registered trademarks of Neogen Corp., Lansing, MI. All other trademarks are properties of their respective companies. D402710-8/22/14

Figur 31 viser side 7 i prosedyren fra Neogen.



Product Manual

MATERIALS SUPPLIED

1. **Goat anti-Mouse IgG Microtiter Plate, One Plate of 96 Wells, Catalog No. 80-0050**
A plate using break-apart strips coated with goat antibody specific to mouse IgG.
2. **Cortisol ELISA Conjugate, 5 mL, Catalog No. 80-0680**
A blue solution of alkaline phosphatase conjugated with Cortisol.
3. **Cortisol ELISA Antibody, 5 mL, Catalog No. 80-0678**
A yellow solution of a mouse monoclonal antibody to Cortisol.
4. **Assay Buffer, 27 mL, Catalog No. 80-0010**
Tris buffered saline, containing proteins and sodium azide as a preservative.
5. **Wash Buffer Concentrate, 27 mL, Catalog No. 80-1286**
Tris buffered saline containing detergents.
6. **Cortisol Standard, 0.5 mL, Catalog No. 80-0677**
A solution of 100,000 pg/mL Cortisol.
7. **Steroid Displacement Reagent, 1 mL
Catalog No. 80-0120**
A special formulated displacer to inhibit steroid binding to proteins.
8. **pNpp Substrate, 20 mL, Catalog No. 80-0075**
A solution of p-nitrophenyl phosphate in buffer.
Ready to use.
9. **Stop Solution, 5 mL, Catalog No. 80-0247**
A solution of trisodium phosphate in water. Keep tightly capped. **Caution: Caustic.**
10. **Cortisol Assay Layout Sheet, 1 each
Catalog No. 30-0145**
11. **Plate Sealer, 1 each, Catalog No. 30-0012**



Product Manual

STORAGE

All components of this kit are stable at 4°C until the kit's expiration date.

OTHER MATERIALS NEEDED

1. Deionized or distilled water.
2. Precision pipets for volumes between 5 μL and 1,000 μL .
3. Repeater pipets for dispensing 50 μL and 200 μL .
4. Disposable beaker for diluting buffer concentrates.
5. Graduated cylinders.
6. A microplate shaker.
7. Adsorbent paper for blotting.
8. Microplate reader capable of reading at 405 nm, preferably with correction between 570 and 590 nm.

SAMPLE HANDLING

The Cortisol ELISA kit is compatible with Cortisol samples in a wide range of matrices. Samples diluted sufficiently into Assay Buffer can be read directly from the standard curve. Please refer to recovery data on page 16 for suitable dilutions for samples. However, the end user must verify that the recommended dilutions are appropriate for their samples. Included with the kit is the Steroid Displacement Reagent which should be added to neat serum, plasma and other samples containing steroid binding proteins. Samples should be diluted with 1 part of the Steroid Displacement Reagent for every 99 parts of sample. Samples containing mouse IgG may interfere with the assay.

Samples in the majority of Tissue Culture Media can also be read in the assay, provided the standards have been diluted into the Tissue Culture Media instead of Assay Buffer. There will be a small change in the binding associated with running the standards and samples in media. Users should only use standard curves generated in media or buffer to calculate concentrations of Cortisol in the appropriate matrix.

Some samples may have very low levels of Cortisol present and extraction may be necessary for accurate measurement. A suitable extraction procedure is outlined below:

Materials Needed

1. Cortisol Standard to allow extraction efficiency to be accurately determined.
2. ACS Grade Diethyl Ether.
3. Glass test tubes.

Procedure

1. Add sufficient Cortisol to a typical sample for determination of extraction efficiency.
2. In a fume hood, add 1 mL of Diethyl Ether for every ml of sample. Stopper and shake sample.
3. Allow layers to separate. Carefully pipet off the top ether layer and place in a clean test tube.
4. Repeat steps 2 and 3 twice more, combining the ether layers.
5. Evaporate the ether to dryness under nitrogen.



Product Manual

6. Dissolve the extracted Cortisol with at least 250 μL of Assay Buffer and vortex well. Allow to sit for five minutes at room temperature. Repeat vortexing and allowing sample to sit for five minutes at room temperature twice more to ensure reconstitution.
7. Run the reconstituted samples in the assay immediately or keep the dried samples frozen below -20°C in desiccation.

PROCEDURAL NOTES

1. Do not mix components from different kit lots or use reagents beyond the kit expiration date.
2. Allow all reagents to warm to room temperature for at least 30 minutes before opening.
3. Standards can be made up in either glass or plastic tubes.
4. Pre-rinse the pipet tip with reagent, use fresh pipet tips for each sample, standard and reagent.
5. Pipet standards and samples to the bottom of the wells.
6. Add the reagents to the side of the well to avoid contamination.
7. This kit uses break-apart microtiter strips, which allow the user to measure as many samples as desired. Unused wells must be kept desiccated at 4°C in the sealed bag provided. The wells should be used in the frame provided.
8. Care must be taken to minimize contamination by **endogenous alkaline phosphatase**. Contaminating alkaline phosphatase activity, especially in the substrate solution, may lead to high blanks. Care should be taken not to touch pipet tips and other items that are used in the assay with bare hands.
9. **Prior to addition of substrate, ensure that there is no residual wash buffer in wells. Any remaining wash buffer may cause variation in assay results.**

