

Kandidatnummer:

10015

10026

10037

## Metodeutvikling av sialinsyrefarging av humane celler med FITC-lektin og deteksjon ved fluorescensmikroskopi

BI301305 - Bacheloroppgave

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Bente Alm og Yanran Cao

Medveileder: Hanne Lillerovde Ørstenvik

Mai 2022



Kandidatnummer:

10015

10026

10037

# **Metodeutvikling av sialinsyrefarging av humane celler med FITC-lektin og deteksjon ved fluorescensmikroskopi**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Bente Alm og Yanran Cao

Medveileder: Hanne Lillerovde Ørstenvik

Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden



## **SAMMENDRAG**

Oppgaven omhandler metodeutvikling for farging av sialinsyrer på humane celler. Vurdering av farger resultatet ble gjort ved fluorescensmikroskopi. Sialinsyrer finnes på celleoverflaten til alle celler hos virveldyr, og et endret sialinsyremønster kan komme av patologiske tilstander. Det er derfor viktig å ha gode deteksjonsmetoder for disse strukturene. Lektiner konjugert til fluorokromer kan brukes til å påvise sialinsyrene. I denne oppgaven ble det brukt fluoresceinisotiocyanat konjugert til lektin (FITC-lektin) for påvisning av sialinsyrer.

En fargeprosedyre ble utarbeidet og videre optimalisert med tanke på fiksering, inkubasjonstid og konsentrasjoner av FITC-lektin. Laboratorieforsøket viste at fiksering i 4% formaldehyd i 15 minutter gav best resultat. Videre ble det funnet ut at preparatene som ble inkubert i 90 minutter og i lektinløsning med konsentrasjon på 20 µg/mL viste den beste fluorescensintensiteten. I tillegg ble holdbarheten til FITC-lektin testet, og det ble funnet ut at det er best å bruke ferskt reagens ved farging med FITC-lektin.

## **ABSTRACT**

This thesis deals with method development for staining of sialic acids on human cells. Evaluation of the colour result was done by fluorescence microscopy. Sialic acids are found on the cell surface of all cells in vertebrates, and an altered sialic acid pattern can occur in pathological conditions. It is therefore important to have good detection methods for these structures. Lectins conjugated to fluorochromes can be used to detect the sialic acids. In this thesis, fluorescein isothiocyanate conjugated to lectin (FITC lectin) was used for detection of the sialic acids.

A staining procedure was developed and further optimised for fixation, incubation time, and FITC lectin concentrations. The laboratory experiment revealed that fixation in 4% formaldehyde for 15 minutes gave the best result. Furthermore, it was found that the samples incubated for 90 minutes in lectin solution with a concentration of 20 µg/mL presented the best fluorescence intensity. In addition to these parameters the shelf life of FITC lectin was tested, and it was found that it is best to use a fresh reagent when staining with FITC lectin.

## FORORD

Bacheloroppgaven er en avsluttende del av bioingeniørstudiet ved NTNU i Ålesund.

Oppgaven handler om utarbeiding og optimalisering av metode for farging av sialinsyrer på humane celler og deteksjon ved fluorescensmikroskopi. En midlertidig prosedyre ble utviklet før laboratoriearbeidet startet og denne ble tilpasset underveis. Laboratoriearbeidet bestod av å farge cellene med FITC-lektin og deretter studere og vurdere farger resultatet ved hjelp av fluorescensmikroskopi.

Det har vært en utfordrende, givende og lærerik periode. Vi vil begynne med å gi en stor takk til PhD-stipendiat Hanne Lillerovde Ørstenvik som har vært til uvurderlig hjelp, spesielt med tanke på celledyrkingen. Med et godt humør har hun alltid vært tilgjengelig og behjelpelig med både små og store problemer eller spørsmål knyttet til laboratoriearbeidet. Vi vil videre takke førsteamanuensis Yanran Cao som har gitt god informasjon og inspirasjon gjennom arbeidet. Vi vil også takke universitetslektor Bente Alm for gode og konstruktive tilbakemeldinger gjennom hele skriveprosessen. Hun har på en tydelig måte gitt oss en vesentlig innsikt i hvordan en slik oppgave skal skrives. Til slutt vil vi takke hverandre for et godt samarbeid, og for god støtte gjennom prosessen.

## INNHALDSFORTEGNELSE

Tabeller .....	3
Figurer .....	3
<b>1 INTRODUKSJON .....</b>	<b>4</b>
1.1 Problemstilling .....	4
Bakgrunn for valg av oppgave .....	4
Begrensninger i oppgaven .....	5
Presentasjon av problemstilling .....	5
1.2 Etikk og risikovurdering .....	5
1.3 Teori .....	6
Sialinsyrer .....	6
Lektiner .....	10
Fluorokromer .....	11
Fluorescensmikroskopi .....	13
<b>2 MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>15</b>
2.1 Materialer .....	15
Cellelinje .....	15
Reagenser .....	15
Utstyr .....	16
2.2 Metoder .....	17
Utarbeiding av prosedyre .....	17
Celledyrkning .....	18
Farging av celler .....	18
Bruk av fluorescensmikroskopet .....	19
Optimalisering .....	19
<b>3 RESULTATER .....</b>	<b>21</b>
3.1 Fikseringstid .....	22



3.2 Inkubasjonstid.....	23
3.3 Holdbarhet.....	24
3.4 Konsentrasjon av FITC-lektin.....	25
Første titrering.....	26
Andre titrering.....	27
<b>4 DISKUSJON.....</b>	<b>30</b>
4.1 Fikseringstid.....	30
4.2 Inkubasjonstid.....	31
4.3 Holdbarhet.....	32
4.4 Konsentrasjon av FITC-lektin.....	33
Første titrering.....	33
Andre titrering.....	34
4.5 Generelle feilkilder .....	35
Eksponering for lys .....	35
Lektinet .....	35
Kontroller .....	36
Fotografering.....	36
Cellemengde .....	36
Ulik behandling.....	37
4.6 Svakheter ved oppgaven .....	37
<b>5 KONKLUSJON.....</b>	<b>39</b>
<b>LITTERATURLISTE .....</b>	<b>40</b>
<b>VEDLEGG.....</b>	<b>43</b>

## **TABELLER**

**Tabell 1** Oversikt over viktige funksjoner til sialinsyrer

**Tabell 2** Reagensliste

**Tabell 3** Utstysrliste

**Tabell 4** Plan for metodeutvikling

## **FIGURER**

**Figur 1** Grunnstruktur til sialinsyre

**Figur 2** Multivalent binding mellom virus og sialinsyrer

**Figur 3** Stokes shift

**Figur 4** Instrumentering for et epifluorescensmikroskop

**Figur 5** Resultater fra optimalisering av fikseringstid

**Figur 6** Resultater fra optimalisering av inkubasjonstid

**Figur 7** Negativ kontroll (Holdbarhet og første titrering)

**Figur 8** Resultater for test av holdbarhet av FITC-lektin

**Figur 9** Resultater fra den første titreringen

**Figur 10** Negativ kontroll (Andre titrering)

**Figur 11** Resultater fra den andre titreringen

# 1 INTRODUKSJON

Hensikten med oppgaven var å utvikle en god prosedyre for farging av sialinsyrer på humane celler ved fluorescensmikroskopi. Denne skal være enkel å reprodusere og utføre for utenforstående. Etter utarbeiding av en midlertidig prosedyre ble den optimalisert med tanke på fikseringstid, inkubasjonstid og konsentrasjoner av fluoresceinisotiocyanat konjugert til lektin (FITC-lektin). Det ble også undersøkt om eldre FITC-lektin gav like godt fargeresultat som ferskere FITC-lektin. Oppgaven er bygd opp etter IMROD-modellen.

Under det praktiske arbeidet med bacheloroppgaven møtte vi på en stor utfordring. Oppgaven vår skulle egentlig benytte deteksjon ved flowcytometri. Men, etter to dager på laboratoriet fungerte ikke lenger flowcytometeret slik det skulle, og vi måtte derfor raskt finne en ny måte å løse oppgaven på. I samtale med veiledere ble vi enige om å fortsette optimaliseringen på nokså lik måte, men prosedyren måtte tilpasses slik preparatene kunne analyseres med fluorescensmikroskopi. Selv om dette var utfordrende, og det førte til at vi måtte omstille mye av oppgaven, var det også lærerikt å oppleve hvordan man må tilpasse seg til omgivelsene når et forsøk skal utføres i praksis.

## 1.1 Problemstilling

### *Bakgrunn for valg av oppgave*

Før vi ble presentert mulige bacheloroppgaver var gruppen klar på å skulle velge en spennende praktisk oppgave som ville utfordre oss og motivere oss til å jobbe hardt. I tillegg ville vi gjerne ha en oppgave som inkluderte et instrument, slik at vi kunne bli enda mer vant med den typen arbeid, da det er nyttig når vi skal ut i arbeidslivet. Vi likte at denne oppgaven knytter flere temaer fra bioingeniørutdanningen sammen, hvorav instrumentell analyse, patologi og biokjemi er mest relevant.

Arbeidet med å utarbeide en egen prosedyre, for å så optimalisere denne, virket som en gylden mulighet til å skulle opparbeide en selvstendighet når det kommer til laboratoriearbeid. Fluorescensmikroskopet var noe vi aldri hadde brukt i praksis, og det å kunne visualisere fluorescensen direkte var noe som appellerte oss. Ved å arbeide med humane celler føles også oppgaven mer aktuell ut. Alt i alt var oppgaven en god blanding av kjent, ukjent, lærerik og utfordrende.

### *Begrensninger i oppgaven*

Noe av det som begrenset oss i denne oppgaven var tid. Vi fikk bestilt laboratoriet for fire dager og det er da begrenset hvor mye man kan gjøre. I tillegg måtte vi passe på å ha nok tid igjen mellom laboratoriearbeidet og fristen for innlevering av oppgaven. Det var også begrenset med valgfrihet når det gjaldt reagenser og utstyr vi skulle bruke, da det allerede var bestemt av faglig veileder. Det konjugerte lektinet som skulle brukes var FITC-lektin, og cellene som skulle brukes var A549-celler. Disse skulle dyrkes frem av PhD-stipendiat i 6-brønn cellekultur Brett.

### *Presentasjon av problemstilling*

Ut ifra de tilgjengelige materialene ble problemstillingen utarbeidet. Problemstillingen vi endte opp med ble;

*“Metodeutvikling av sialinsyrefarging av humane celler med FITC-lektin og deteksjon ved fluorescensmikroskopi”.*

Problemstillingen gav oss en mulighet til å kunne se på flere ulike faktorer som kunne påvirke fargeresultatet. Vi måtte lære oss å anvende fluorescensmikroskopet og vurdere bildene som ble tatt.

## **1.2 Etikk og risikovurdering**

Siden dette prosjektet ikke er et forskningsprosjekt, er det ikke nødvendig med godkjenning fra Norsk senter for forskningsdata (NSD) eller Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Materialet brukes til undervisning og er anonymisert.

Første dagen vi var på laboratoriet gikk vi gjennom forsøket sammen med faglige veiledere. Dette var først og fremst for å bli kjent med materialer og utstyr, og for å kunne fokusere på HMS. Videre ble det gjort en risikovurdering av laboratoriearbeidet. Den ble gjort manuelt og det ble brukt en mal på risikomatrix for å vurdere risikoen til de ulike punktene. Denne er lagt ved som Vedlegg 1. Den ble godkjent av PhD-stipendiat og det var ingen spesielle tiltak som måtte settes i gang. Risikovurderingen ble gjort før oppgaven ble endret fra flowcytometri til fluorescensmikroskopi som deteksjonsmetode. Det ble derimot ikke vurdert som nødvendig av faglig veileder å skulle utføre en ny risikovurdering.

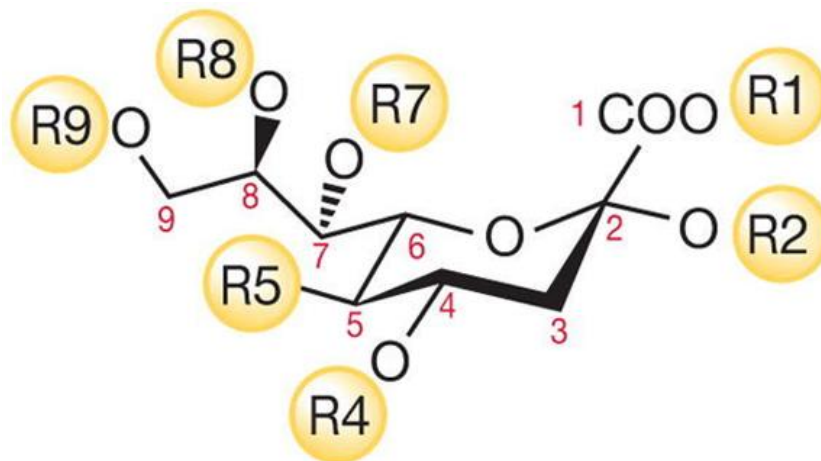
### 1.3 Teori

#### *Sialinsyrer*

##### Generell oppbygging

Sialinsyrer er en gruppe på mer enn 50 naturlige monosakkarider. De finnes på celleoverflatene til virveldyr, og er også bundet til de fleste proteiner skilt ut i sekret (1). Det at sialinsyrer finnes på alle celleoverflater betyr at de for eksempel finnes på epitelceller i lungevev. Sialinsyrer finnes i tillegg på den indre overflaten av membranen til lysosomer (2). Hjernen er det organet i kroppen som har høyest nivå av sialinsyrer (1).

Sialinsyrer er derivater av neuraminsyre, som består av monosakkaridet mannose med en aminogruppe og et pyruvatmolekyl. Grunnstrukturen til sialinsyrer er en kjede med ni karbonatomer (2) (*Figur 1*). Sialinsyrer har negativ ladning og er hydrofile. Den negative ladningen gir sialinsyrer fysiologisk pH og den sørger for frastøtning og hindring av uønskede interaksjoner med celler i blodomløpet (1). Den hydrofile egenskapen har også betydning for den strukturelle funksjonen ved folding av glykoproteiner.



**Figur 1:** *Figuren viser grunnstrukturen til sialinsyrer. De ni karbonatomene er nummerert med røde tall. Der er syv lokasjoner hvor det er mulig med variasjoner i funksjonelle grupper og bindinger, og disse er markert med gule sirkler. (2)*

### Mangfold av oppbygging og funksjoner

Intracellulære enzymer i celler sørger for at ulike funksjonelle grupper kan bindes til grunnstrukturen og dette resulterer i at det finnes et stort mangfold av sialinsyrer. Dette kan skje på syv av karbonatomene eller hydroksylgruppene som er bundet til dem. For eksempel blir C5-karbonet ofte modifisert med en N-acetylgruppe slik det dannes N-acetylneuraminsyre (Neu5Ac) (3). Andre hyppige modifikasjoner er metylering, hydroksylering og sulfatering. Sialinsyrer er stort sett koblet til den terminale enden av glykankjeder på celleoverflatene. Mangfoldet av sialinsyrer kommer også av ulike bindinger mellom C2-karbonet i sialinsyren og disse glykankjedene (2). Mest vanlig er alfabinding til C3- eller C6-karbonene i galaktose.

Lokasjonen av sialinsyrer på celleoverflaten gjør at de har viktige oppgaver i regulering av celler og kommunikasjon mellom dem. Flere av funksjonene innebærer at sialinsyrer er ligander for reseptorer. *Tabell 1* viser noen viktige funksjoner med nærmere beskrivelser og eksempler.

**Tabell 1:** *Oversikt over noen viktige funksjoner til sialinsyrer og eksempler på disse.*

Funksjoner	Eksempel
Regulerer immunsystemet	Sialinsyrer på celler og plasmaproteiner kan binde reseptoren CD22 på B-celler, noe som inhiberer B-celle-mediert signalisering (4). Dette virker å være viktig for å indusere toleranse mot egne celler. CD22 er en type Siglec, som er overflateproteiner som kan binde sialinsyrer. Siglec finnes primært på immunceller.
	På overflaten av makrofager finnes sialoadhesin (Siglec 1) som fungerer som en fagocyterende reseptor for patogener som er dekket av sialinsyrer (1).
Maskerer	Kan maskere antigener på patogener og reseptorer for patogener, og dermed hemme makrofagfunksjon (2).
Inhiberer	Sialinsyrer binder seg til faktor H, som videre

komplementaktivering	inaktiverer komponent C3b (5).
Påvirker befruktningen	Sialinsyrer uttrykt på eggceller blir gjenkjent av sædceller (6).
Kommunikasjon mellom celler	Ved å fungere som reseptor eller ligand kan sialinsyrer på celler bidra til kommunikasjon mellom cellene (7).

### Sialinsyre og hjerte- og karsykdommer

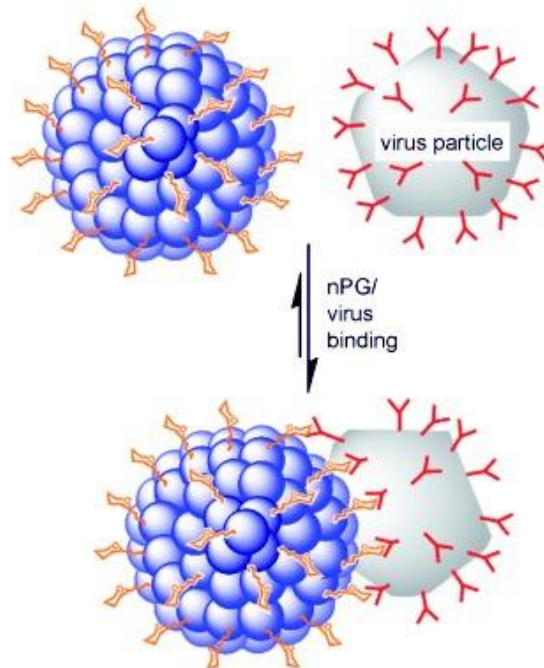
Måling av økt konsentrasjon av sialinsyrer i serum, sammenlignet med normale kontroller, kan tyde på hjerte- og karsykdommer (8). Det er uklart hva den økte konsentrasjonen kommer av. Noen av hypotesene er økt produksjon av sialinsyre-holdige akutfaseproteiner, redusert desialinisering av plasma glykoproteiner, eller økt sialinisering av serumproteiner. Måling av økt konsentrasjon av sialinsyrer i serum er ikke spesifikk for noen sykdom, men gir en indikasjon på hjerte- og karsykdom. I tillegg vil faktorer som alder, graviditet og røyking påvirke mengde sialinsyre. Det trengs derfor mer forskning på temaet før sialinsyre-konsentrasjon kan etableres som markør for hjerte- og karsykdommer.

### Binding av virus til sialinsyrer

Sialinsyrene befinner seg på de terminale endene av glykankjeder på celleoverflater i alle celler hos virveldyr, som da inkluderer mennesker (1). Det er flere virus som benytter seg av mangfoldet og plasseringen til sialinsyrene. Influensavirus, adenovirus og reovirus er alle virus som har stilklihnende proteiner (3). Disse proteinene kan binde seg til og dermed anvende sialinsyrene som reseptorer slik de kan trenge seg inn i cellen og formere seg.

Et fascinerende eksempel på binding mellom sialinsyre og virus er når hemagglutinin som finnes på overflaten av influensaviruset kobler seg til sialinsyrer, vanligvis Neu5Ac (3). HA1-domenet av hemagglutinin er det som sørger for bindingen mellom sialinsyren og viruset. Influensaviruset koder for enzymet neuraminidase, som spalter sialinsyrer fra glykankjeder. Når viruset replikerer seg i en vertscelle vil den danne en utposning og neuraminidase vil sørge for at denne utposningen spaltes av, slik viruset kan spres videre.

Bindingen mellom sialinsyre og virus har lav affinitet, men høy aviditet (3). Den høye aviditeten kommer av at virusene som kan binde seg til sialinsyrene er multivalente. *Figur 2* viser denne egenskapen.



**Figur 2:** Denne figuren illustrerer hvordan en nanopartikkel belagt med sialinsyrer (til venstre) og en influensaviruspartikkel (til høyre) binder seg til hverandre. Viruspartikkelen binder seg til flere sialinsyrer på nanopartikkelen samtidig, fordi viruset er multivalent. Flere bindinger mellom partiklene gir en høy aviditet. (9)

Til tross for at sialinsyrene kan mediere binding til virus kan de også fungere som simulantreseptor og blokkere virusinfeksjon (10). En simulantreseptor er en reseptor som har mulighet til å binde ulike ligander, men som ikke aktiverer reseptorkomplekset. Et godt eksempel på dette er når utskilte muciner i luftveiene, som har store mengder sialinsyrer, binder seg til virus og fører til at de hostes opp (1). På den måten blir viruspartiklene hindret i å infisere celler i luftveiene.

I tillegg til å bruke sialinsyrene som reseptorer finnes det virus som kan etterligne dem molekylært, hvor virusene er dekket med sialinsyrer for å unngå både at viruset blir oppdaget og at verten blir immun mot viruset (1). Eksempler på virus som har slike egenskaper er *Neisseria meningitidis* B, *Escherichia coli* K1 og *Hemophilus influenzae*.



Selv om binding mellom virus og sialinsyrer har visse likheter ved at de eksempelvis innebærer stilkliknende proteiner er de også ulike (3). Det varierer hvilke sialinsyrer virusene binder, og hvilke bindinger som dannes mellom viruset og sialinsyrene. For å identifisere og presisere hvilke sialinsyrer som er relevante kan det utføres cellebaserte infeksjonsanalyser hvor bindingen til virus enten blokkeres av sialinsyrebindende lektiner eller ved at sialinsyrene spaltes av enzymet neuraminidase. For å studere selve bindingen av viruset anvendes røntgenkrystallografi og kjernemagnetisk resonans.

### Sialinsyre på metastatiske celler

Nesten alle humane metastatiske celler har endret glykosylering (11). Det oppstår spesielt en økning av glykaner med sialinsyrer festet i de terminale endene. Celleoverflaten til kreftceller er dekket med disse sialoglykanene, og det oppstår også unike typer av slike sialoglykaner som ikke finnes på normale celler. Dette tette laget med sialinsyrer har flere fordelaktige funksjoner for tumoren. Laget hindrer at tumoren blir oppdaget og angrepet av immunsystemet, og det forstyrrer kommunikasjonen mellom celler, som er en viktig oppgave sialinsyrene har.

Informasjon om sialinsyrer på overflaten av kreftceller kan være interessant med tanke på behandling med immunterapi. Økt ekspresjon av sialinsyrer på overflaten til kreftceller er forbundet med økt tumorvekst og hemming av immunceller (11). Büll et al. har forsket på hemming av sialinsyre-uttrykk ved å injisere en syntetisk inhibitor ( $\text{Ac}_5\text{3F}_{\text{ax}}\text{Neu5Ac}$ ) i tumoren. Forskningen viste at hemmingen *in vitro* øker aktiviteten til  $\text{CD8}^+$  T-celler og reduserer sjansen for antitumor immunitet. Dette kan indikere en mulighet for behandling av kreft. Det har hittil ikke vært gjennomførbart *in vivo*.

Det at sialinsyrer har varierte funksjoner gjør de relevante å forske på i flere sammenhenger. Som nevnt er de for eksempel involvert i virusinfeksjoner og kreft. Det er derfor viktig å ha gode metoder for å detektere sialinsyrer for å øke kunnskapen om utvikling og behandling av flere sykdommer og tilstander.

### *Lektiner*

Lektiner er proteiner som kan binde seg til karbohydrater ved ikke-kovalente bindinger (12). De binder seg spesifikt og de kan deles inn i undergrupper basert på hvilke karbohydrater de

binder. En andel av lektinene kan binde seg spesifikt til sialinsyrer. Disse er spesielt funnet hos virvelløse dyr, men også hos planter og virveldyr (13). Slike lektiner kan bidra til påvisning, kvantifisering, lokalisering, rensing og karakterisering av celler som besitter sialinsyrer. Både kjemisk modifiserte lektiner og naturlig rensede lektiner kan brukes til å studere glykane strukturer på celler (14).

Det finnes over 200 ulike lektiner, hvorav de fleste er isolert fra planteceller, men de har også opphav fra dyreceller, bakterier og virus (15). Lektiner er sentrale for å mediere interaksjoner mellom celler, og mellom celler og patogener. Hos planter er de også sentrale i forsvarsmekanismer, hvor noen for eksempel påvirker utviklingen hos insekter eller er toksiske (16). Det at lektinene binder seg til karbohydrater innebærer at de blant annet kan binde seg til celler og agglutinere disse, for eksempel erytrocytter hos dyr. Det er derimot vist at ikke alle lektiner kan agglutinere erytrocytter hos alle arter av pattedyr. Lektin fra algen *Gracilaria ornata* kan for eksempel agglutinere erytrocytter hos kanin og kylling, men ikke hos mennesker. Lektinene hos dyr er blant annet involvert i endocytose, apoptose, forsvar mot mikroorganismer og regulering av celle-adhesjon. I mennesker er det funnet lektiner i for eksempel lunger og serum. Hos virveldyr blir lektiner delt i to grupper: integrale lektiner på membraner og løselige lektiner som finnes i intra- og intercellulære væsker.

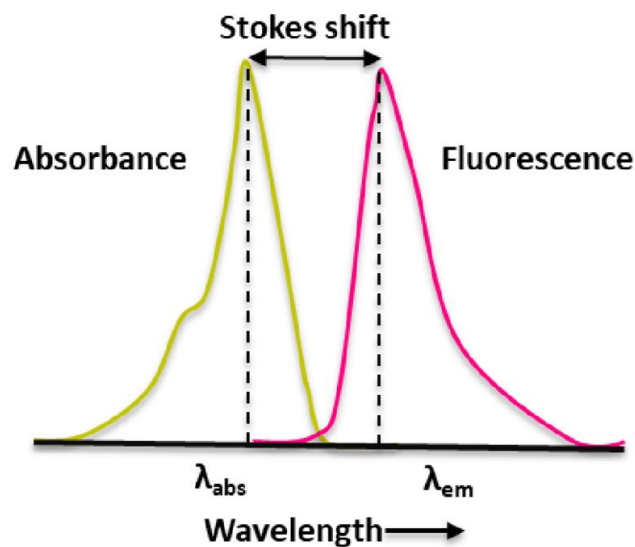
### *Fluorokromer*

Ved ulike metoder, inkludert fluorescensmikroskopi, kan det brukes antistoffer eller andre molekyler konjugert til en fluoriserende komponent for å detektere antigener, reseptorer eller andre strukturer (17). Dette kalles videre for et konjugat. Molekylet vil sørge for binding til cellestrukturer, og den fluoriserende komponenten vil sørge for at disse bindingene kan detekteres. Disse fluoriserende komponentene kalles også for fluorokromer, og gir ulike metoder et større bruksområde. De mest brukte fluorokromene er FITC, phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll-protein (PerCP) og allophycocyanin (APC). Når lys fra en laser treffer fluorokromet vil det absorbere lyset, og så emittere lys av en lengre bølgelengde (18). Dette emitterte lyset kan detekteres. Intensiteten til lyset som oppstår vil si noe om hvor mye det finnes av strukturen konjugatet binder seg til. I noen tilfeller vil to ulike fluorokromer absorbere lys av samme bølgelengde, for å så emittere lys av ulik bølgelengde. Dette baserer seg på at ulike fluorokromer har ulikt Stokes shift (se under). Slik kan man detektere flere fluorokromer ved bruk av én og samme laser.

Avhengig av hvilket konjugat som brukes kan det feste seg til enten intracellulære strukturer eller overflatestrukturer på celler (19). Dette kalles å farge cellene. Når overflatestrukturene skal farges er det ikke nødvendig med like mye forbehandling av cellene sammenlignet med intracellulær farging. For å utvikle en optimal fargeprosedyre må det tas hensyn til en rekke parametere som kan påvirke farger resultatet, for eksempel konsentrasjonen av konjugatet, inkubasjonstiden og temperaturen.

### Fluorescens

Fluorescens er en form for luminescens som oppstår når et molekyl ved belysning fra en lyskilde absorberer lys med én bølgelengde og emitterer lys med en lengre bølgelengde (20). Det emitterte lyset vil ha en lavere energi enn det absorberte lyset. Stokes shift illustrerer denne forskjellen i bølgelengde mellom absorbert og emittert lys, og brukes for å beskrive tapet av energi (Figur 3). For å beregne Stokes shift tar man maksimum absorbans minus maksimum emisjon. Med tanke på fluorokromer er det ønskelig med et stort Stokes shift slik at det er minst mulig overlapp mellom bølgelengdene til det absorberte lyset og fluorescens.



**Figur 3:** Figuren viser bølgelengde langs x-aksen og lysintensitet på y-aksen. Stokes shift beregnes mellom toppen av båndene. (21)

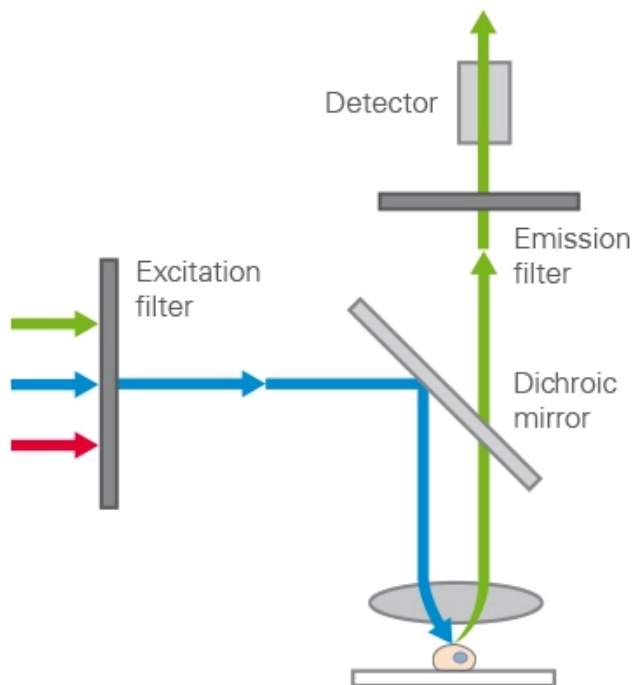
I metoder som fluorescensmikroskopi og flowcytometri kan lektiner brukes som et mellomledd for å påvise ulike sialinsyrer i vev eller celler. Da vil lektinet være konjugert til et fluorokrom. I denne oppgaven ble det brukt FITC-konjugert lektin.

## Fluorescensmikroskopi

Fluorescens kan benyttes til et stort mangfold av undersøkelser. Prinsippet brukes blant annet ved DNA-sekvensering, genetiske analyser, celleidentifikasjon og celledatering.

Fluorescensmikroskopi er fremdeles en av de mest brukte metodene for å studere cellestrukturer (22). En av grunnene er at fargeprosessen er relativt rask og enkel å gjennomføre.

### Instrumentering



**Figur 4:** Instrumenteringen for et epifluorescensmikroskop. (23)

En av fordelene med et fluorescensmikroskop er at preparatet kan illumineres med en bestemt bølgelengde, og videre kan man filtrere ut det emitterte lyset slik det bare viser det man vil studere (24). Slik kan det tydelig skilles mellom positivt og negativt resultat.

Det finnes ulike typer fluorescensmikroskop, men det som er felles for alle er at det brukes fluorescens for å danne et bilde av strukturene i preparatet. I et fluorescensmikroskop finnes det ulike filtre (24). Hvert filter slipper bare gjennom et smalt bølgelengdeområde. Disse filtrene må tilpasses hvilke fluorokromer som brukes med tanke på hvilken bølgelengde som skal absorberes og emitteres av fluorokromet. Instrumenteringen til én type

fluorescensmikroskop, som kalles for epifluorescensmikroskop, vises i *Figur 4*. Dette er et av de vanligste fluorescensmikroskopene (25).

### Bleking

Fluorescensmikroskopi er en spesifikk metode med stor variasjon i tilgjengelige fluorokromer. Når man arbeider med fluorokromer under fluorescensmikroskop er bleking noe man må ta hensyn til (24). Bleking er en prosess som fører til at fluorescenssignalet svekkes permanent og dette gjør at arbeidet er tidsbegrenset. Bleking oppstår som en konsekvens av at molekyler har et ønske om å være stabile. Når molekylet får et eksitert elektron vil det prøve å overføre den tilførte energien til omgivelsene, som ofte er oksygen. Når dette da skjer vil fluorokromet bli inaktivert og det kan ikke fluorescere igjen. For å redusere bleking bør ikke preparatet utsettes for mer lys enn nødvendig, men det er vanskelig å eliminere feilkilden. Det som da er viktig i arbeidet med fluorokromer er å jobbe relativt raskt.

## 2 MATERIALER OG METODER

### 2.1 Materialer

#### *Cellelinje*

De humane cellene som ble brukt i oppgaven var A549-celler og ble kjøpt fra ATCC (American Type Culture Collection). Denne cellelinjen er epitelceller fra lungevev og er isolert fra en mann som hadde lungekreft (26). Cellelinjen har en hurtig reproduksjonstid på omtrent 22 timer. A549-celler har et høyere nivå av  $\alpha(2,3)$ -bundet sialinsyrer enn det normale celler har (27).

#### *Reagenser*

I *Tabell 2* vises en full liste over produktnavn, leverandør, referansenummer og lotnummer for alle reagenser brukt i denne oppgaven.

**Tabell 2:** *Liste over produktnavn, leverandør, referansenummer og lotnummer til reagenser.*

Produktnavn	Leverandør	Referansenummer	Lotnummer
FITC Conjugated Maackia amurensis Lectin -MAA-, 2mg (FERSKT)	EY Laboratories	F-7801-2	360816-2
FITC Conjugated Maackia amurensis Lectin -MAA-, 2mg (GAMMELT)	EY Laboratories	F-7801-2	370919-2
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12	Gibco	11320033	
Fetal Bovine Serum	Gibco	A3160402	
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Gibco	15240062	
10x PBS	Bio-Rad Laboratories	161-0780	64073736

37% formaldehyd	Thermo Fisher Scientific	033314.K2	M28I049
	Sigma-Aldrich	252549-1L	MKCM5172
Mountex	HistoLab	00841	

### Dyrkingsmedium

Dyrkingsmediet brukt i forsøket var Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Gibco). Mediet inneholder glukose, aminosyrer og vitaminer. Siden mediet ikke inneholder noen proteiner, lipider eller vekstfaktorer ble det tilsatt Fetal Bovine Serum (Gibco). Det ble også tilsatt Antibiotic-Antimycotic (100X) (Gibco) som inneholder antibiotika og antimykotika som hindrer bakterie- og soppvekst.

### FITC-lektin

Det konjugerte lektinet som ble brukt i laboratoriearbeidet var bestilt hos EY Laboratories. Lektinet som ble brukt var lektin fra *Maackia amurensis*, amurtre (28). Dette binder seg spesifikt til sialinsyrer bundet via  $\alpha(2,3)$ -binding til galaktose. Lektinet er konjugert til et fluorokrom som absorberer lys av bølgelengde 492 nm og emitterer lys av bølgelengde 517 nm. Konsentrasjonen til reagenset er 2 mg FITC-lektin per 2 mL buffer. Reagenset er svært lyssensitivt og må skjermes for lys. Flaskene med FITC-lektin ble oppbevart i kjøleskap.

### Monteringsmedium (Mountex)

Mountex (HistoLab) ble brukt som monteringsmedium. Dette er en xylen-basert lim som tørker raskt og er fargeløs. Det er viktig å bruke avtrekksskap ved bruk av både monteringsmediet og xylen, siden xylen er toksisk ved inhalasjon.

### *Utstyr*

Tabell 3 viser en liste over utstyret som ble brukt i forsøket og hvilken funksjon utstyret hadde. Generelt forbruksutstyr som normalt er tilgjengelig på laboratorier er ikke inkludert.

**Tabell 3:** Liste over utstyr brukt i forsøket og deres funksjon.

Utstyr	Funksjon
CO <sub>2</sub> -inkubator (NuAire)	Inkubering av celler ved 37 °C
Kjøleskap (Zanussi)	Oppbevaring
AE31 (Motic)	Lysmikroskop
Avtrekksskap	Ved bruk av toksiske reagenser
6-brønn cellekultur Brett	Celledyrkning
Leica DM2000 LED - PC med programvare LAS V4.2 Leica DFC450 C	Fluorescensmikroskop med kamera

### Leica DM2000 LED

Kameraet som var koblet på fluorescensmikroskopet heter Leica DFC450 C. Programvaren som ble brukt for å visualisere, arkivere og vurdere preparatene heter LAS (Leica Application Suite). Denne er enkel og effektiv å bruke.

## 2.2 Metoder

### *Utarbeiding av prosedyre*

En foreløpig fargeprosedyre ble utviklet basert på en lignende prosedyre presentert i en forskningsartikkel fra Tan et al. (10). I denne prosedyren ble cellene fiksert i 4% paraformaldehyd i 10 minutter og 20 µg/mL lektin ble tilsatt de fikserte cellene i 1 time i romtemperatur. Det ble derfor bestemt å bruke 4% formaldehyd til fiksering, og å inkubere preparatene i lektin i romtemperatur. Ved tilpasning av fikseringsmetode var lektinkonsentrasjonen fastsatt til 20 µg/mL og inkubasjonstiden 60 minutter.

Den foreløpige fargeprosedyren som ble utarbeidet forklarte hvordan cellene skulle fikses og farges, og hvordan objektglassene skulle monteres. Gjennom utprøving av prosedyren i praksis ble den tilpasset utstyret som var tilgjengelig. Sammen med faglig veileder og PhD-stipendiat ble det tidlig bestemt å bruke 1x PBS som vaskeløsning for cellene, og til å



fortynne FITC-lektinet. Det ble også enighet om å utføre tre vasketrinn før og etter tilsetning av fikseringsmiddel og lektinløsning. I tillegg ble det bestemt å inkubere preparatene mørkt.

Fargemetoden ble utarbeidet og optimalisert ved å tilpasse parametere i den rekkefølgen oppgitt i *Tabell 4*.

**Tabell 4:** *Plan for metodeutvikling brukt i forsøket, med parametrene som ble tilpasset, verdiene som ble testet, og parametrene som var fastsatt når aktuell parameter skulle tilpasses. Metodeutviklingen ble utført i den rekkefølgen oppgitt her, fra øverst til nederst.*

Parameter som tilpasses	Verdier som testes	Parametere som er fastsatt
Fikseringstid	0, 15 og 30 minutter	60 minutter inkubasjonstid, 20 µg/mL lektin- konsentrasjon
Inkubasjonstid FITC-lektin	30, 45, 60 og 90 minutter	Tilpasset fikseringstid, 20 µg/mL lektin- konsentrasjon
Lektin-konsentrasjon (Første titrering)	5, 10, 20 og 40 µg/mL	Tilpasset fikseringstid Tilpasset inkubasjonstid
Lektin-konsentrasjon (Andre titrering)	Avhenger av resultater	Tilpasset fikseringstid Tilpasset inkubasjonstid

### *Celledyrkning*

Cellene som ble brukt i oppgaven ble dyrket i Dulbecco's Modified Eagle Medium tilsatt 10% FBS og 1% antibiotika. De ble inkubert ved 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Cellene ble dyrket i 6-brønn cellekultur Brett der det i hver brønn ble plassert et dekkglass. Det ble dyrket slik at det var ca. 1 000 000 celler i hver brønn når dekkglassene skulle brukes i forsøket. Varierende antall celler ble tilsatt avhengig av om cellekultur Brettene skulle benyttes etter 24 timer eller 48 timer. Det ble visuelt bekreftet i lysmikroskop at det var celler på dekkglassene før fargeprosedyren startet.

### *Farging av celler*

Fiksering og farging av celler ble utført i romtemperatur og normal belysning. De ulike FITC-lektinløsningene ble oppbevart mørkt frem til anvendelse.

Dyrkingsmediet (Gibco) ble dekantert og cellene ble vasket med 3 mL 1x PBS (PBS) (Bio-Rad Laboratories) 3 ganger. Videre ble cellene fiksert ved å bruke 2 mL 4% formaldehyd (Thermo Fisher Scientific og Sigma-Aldrich). Cellekultur Brettene ble inkubert i romtemperatur. Etter fikseringen ble cellene igjen vasket med 3 mL PBS 3 ganger. Deretter ble cellene farget ved inkubering med 500 µL FITC-lektin (EY Laboratories) fortynnet i PBS. Kontrollene ble tilsatt 500 µL PBS. Brettene ble inkubert mørkt i romtemperatur. Etter inkubasjonen ble cellene vasket med 3 mL PBS 3 ganger. Ved siste vaskesyklus ble ikke PBS dekantert. Dekkglassene ble pirket opp av brønnene ved hjelp av et skalpell-knivblad og plassert vertikalt i en tom brønn i cellekultur Brettene for å tørke. Brettene ble oppbevart mørkt under tørkingen. Etter at dekkglassene var tørre, ble det brukt Mountex (HistoLab) til å montere de på merkede objektglass. Monteringen ble utført i et avtrekksskap.

#### *Bruk av fluorescensmikroskopet*

Preparatene ble mikroskopert i et mørkt rom ved bruk av fluorescensmikroskopet og det ble tatt bilder av preparatene fortløpende. Preparater ble oppbevart mørkt til de skulle mikroskoperes.

#### *Optimalisering*

Når man skal beslutte hvilken konjugatkonsentrasjon som er mest optimal er det viktig at faktorene rundt er fastsatt. Det kan derfor være avgjørende å finne ut av hvilke verdier av parametere som fungerer best for konjugatet generelt. Når man har fastslått dette kan man teste ut ulike konsentrasjoner av konjugatet. Plan for metodeutvikling vises i *Tabell 4*.

Noe av det første som ble optimalisert var hvilke volumer av 1x PBS og formaldehyd som skulle tilsettes brønnene i cellekultur Brettene. For at reagensene skulle reagere som ønsket måtte det tilsettes nok til at de ville dekke hele dekkglasset. Samtidig er det økonomisk gunstig å forbruke så lite reagenser som mulig. Optimaliseringen ble utført i samarbeid med faglig veileder.

Ved utprøving av ulike fikseringsmetoder var parametrene FITC-lektinkonsentrasjon og inkubasjonstid konstant på henholdsvis 20 µg/mL og 60 minutter. Det ble brukt en fersk flaske FITC-lektin. To preparater ble ikke fiksert, to preparater ble fiksert med 4% formaldehyd i 15 minutter og to preparater ble fiksert med 4% formaldehyd i 30 minutter.

Når fikseringsmetoden var fastsatt, ble det sett på ulike inkubasjonstider for FITC-lektinet. Det ble valgt ut fire ulike tider; 30 minutter, 45 minutter, 60 minutter og 90 minutter. FITC-lektinkonsentrasjonen var den samme som ved optimalisering av fikseringsmetode, og fikseringsmetoden som ble anvendt var den som ble fastsatt som den mest optimale. Det ble brukt en fersk flaske FITC-lektin.

Siste del av forsøket bestod av å se på ulike konsentrasjoner av FITC-lektinet. Den mest optimale fikseringsmetoden og inkubasjonstiden for lektinet som ble funnet tidligere ble brukt. Fire ulike konsentrasjoner av FITC-lektin ble valgt til å testes. Konsentrasjonene var 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  og 40  $\mu\text{g/mL}$ . I tillegg ble også holdbarheten til FITC-lektinet testet. Dette ble utført ved å lage den samme konsentrasjonsrekken av et gammelt FITC-lektin fra samme leverandør, og sammenligne fargeresultatene fra disse lektinløsningene med fargeresultatene fra det ferske FITC-lektinet. På denne måten kunne det ses om det er nødvendig å kjøpe ferskt lektin rett før det skal brukes, eller om det er akseptabelt å bruke en eldre flaske som allerede er tilgjengelig. Lektinet og konsentrasjonen som virket mest optimale ble valgt, og videre ble fem nye konsentrasjoner undersøkt, som alle var i området rundt den konsentrasjonen som virket best.

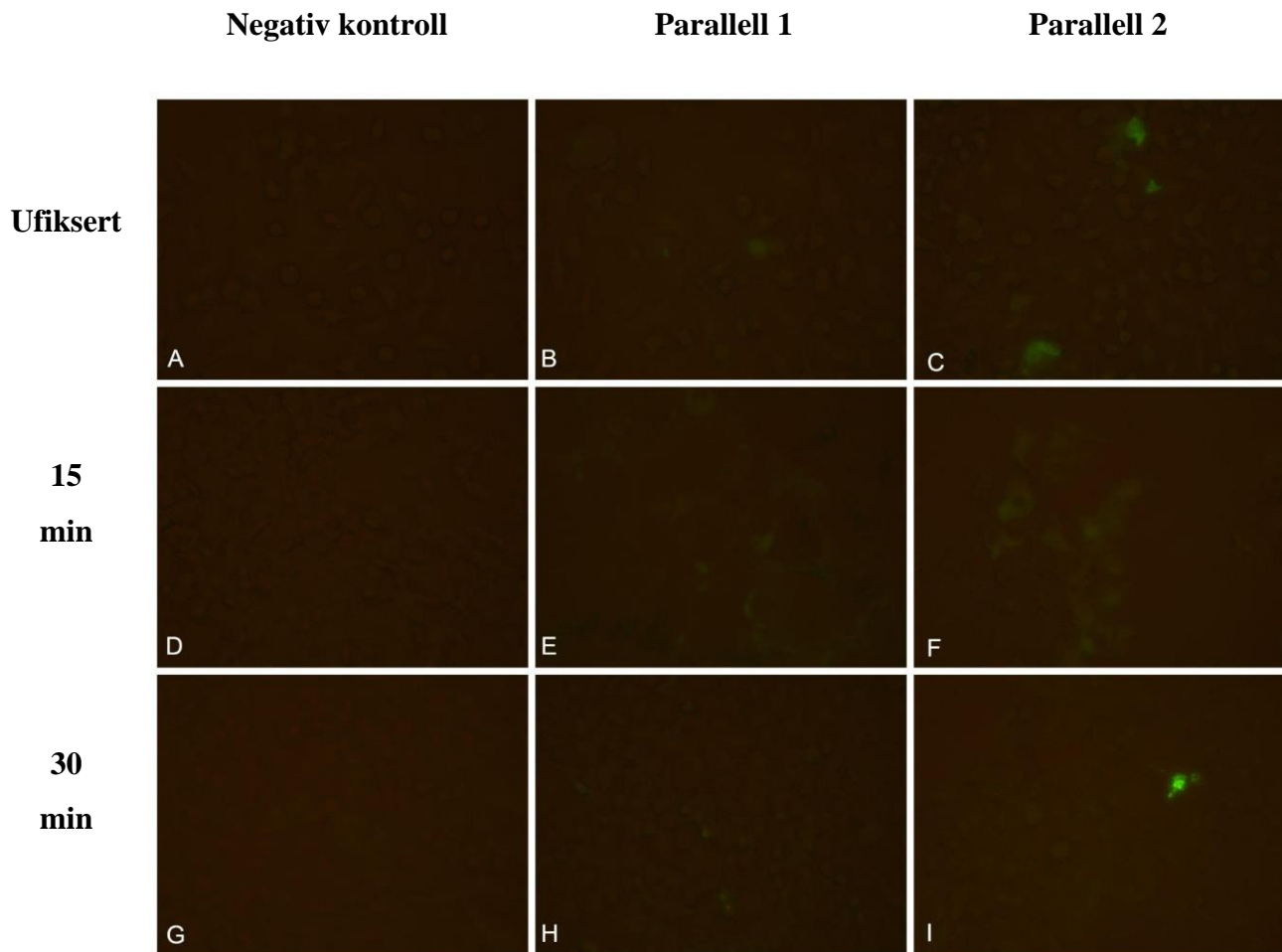
### **3 RESULTATER**

Resultatene vises i bilder tatt med kameraet Leica DFC450 C. Størrelsen på bildene var 4352 x 3264  $\mu\text{m}$ . De utvalgte bildene i resultatdelen er representative for hele preparatet. Siden bildene er vanskelige å bedømme i et rom med vanlig lys er lysstyrken på alle bildene justert opp 20%, kontrasten er justert opp 40% og skarpheten justert opp 50%. Det kan likevel være fordelaktig å se på bildene i et mørkt rom. Det ble tatt totalt 236 bilder av preparatene. Om det er ønskelig å studere alle bildene som ble tatt finnes de ujustert på en minnepenn. Denne finnes hos førsteamanuensis Yanran Cao ved IBA på NTNU i Ålesund.

Basert på resultatene av forsøket ble et forslag til fargeprosedyre utarbeidet, og denne er presentert i Vedlegg 2.

### 3.1 Fikseringstid

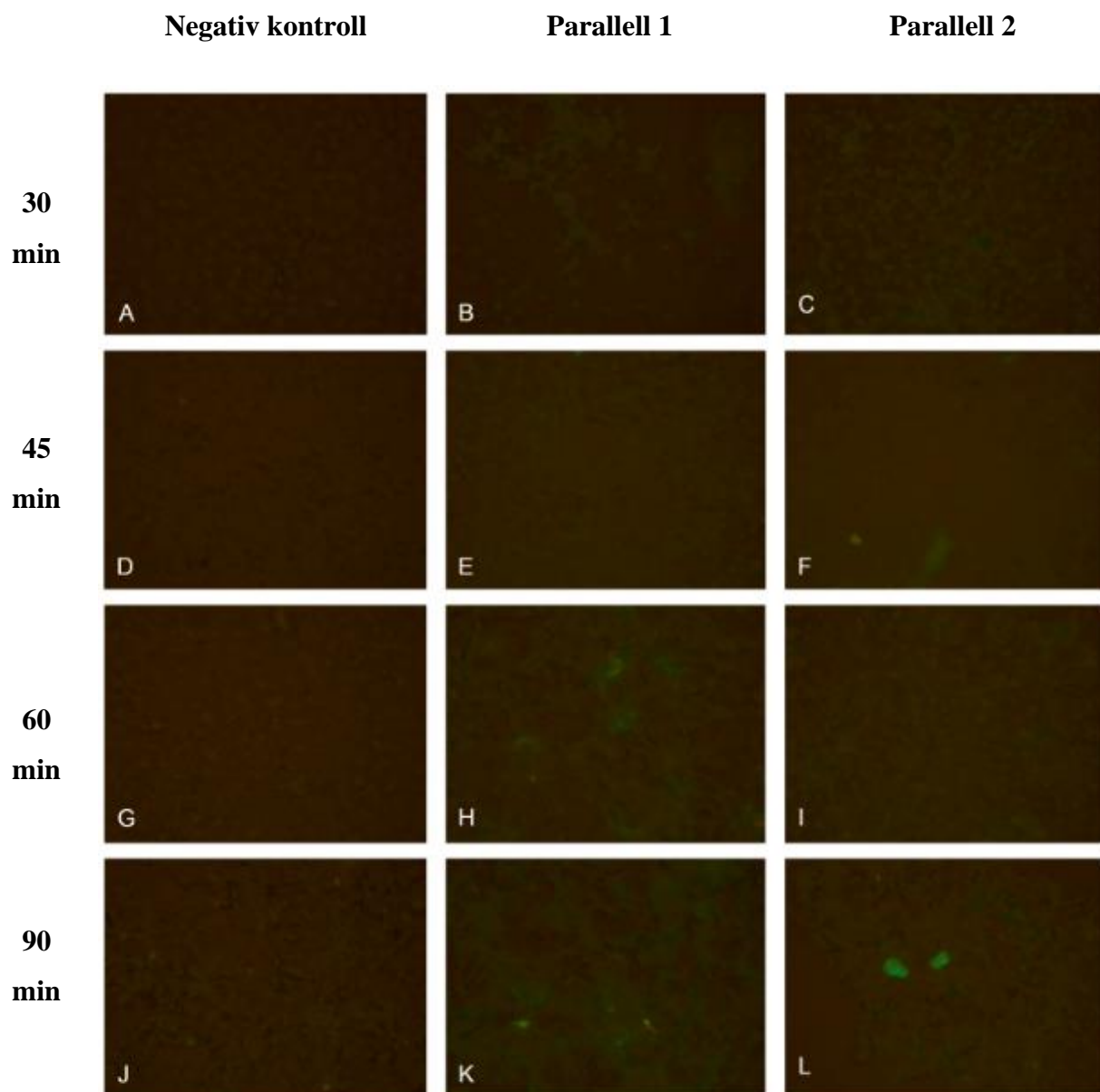
Figur 5 viser resultatene fra forsøket hvor det ble testet ut ulike fikseringsmetoder. Fikseringsmiddelet som ble brukt var 4% formaldehyd. Den negative kontrollen ble tilsatt PBS, mens preparatene ble inkubert med 20 µg/mL lektinløsning i 60 minutter.



**Figur 5:** Resultater fra optimalisering av fikseringstid. Bilder A, B og C viser ufiksert negativ kontroll og preparater. Bilder D, E og F viser negativ kontroll og preparater fiksert i 15 minutter. Bilder G, H og I viser negativ kontroll og preparater fiksert i 30 minutter.

### 3.2 Inkubasjonstid

Figur 6 viser resultatene fra testing av ulike inkubasjonstider. Den negative kontrollen ble tilsatt PBS mens preparatene ble tilsatt 20 µg/mL lektinløsning. Fikseringstid var fastsatt til 15 minutter.



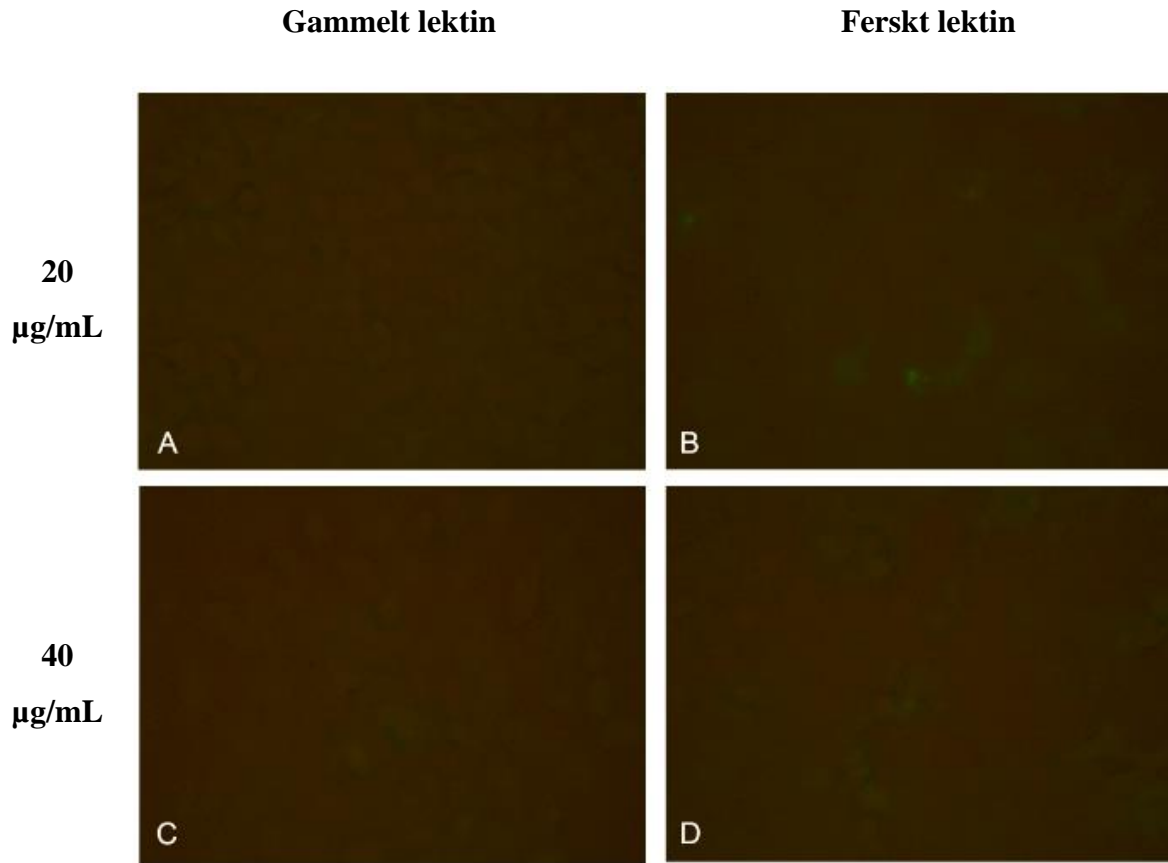
**Figur 6:** Resultater fra optimalisering av inkubasjonstid. Det ble utført én kontroll og to paralleller av hver parameterverdi. Bilder A, B og C viser kontroll og preparater inkubert i 30 minutter. Bilder D, E og F viser kontroll og preparater inkubert i 45 minutter. Bilder G, H og I viser kontroll og preparater inkubert i 60 minutter. Bilder J, K og L viser kontroll og preparater inkubert i 90 minutter.

### 3.3 Holdbarhet

*Figur 7* viser resultatet fra den negative kontrollen. *Figur 8* viser resultatene hvor gammelt og ferskt lektin ble sammenlignet ved ulike konsentrasjoner av FITC-lektinet. Det ble analysert flere preparater enn vist i figuren, men det ble ikke sett på som nødvendig å inkludere alle her. Den negative kontrollen ble tilsatt PBS. Fikseringstid var fastsatt til 15 minutter og inkubasjonstid til 90 minutter.



**Figur 7:** *Negativ kontroll. Fiksert i 15 minutter og inkubert i PBS i 90 minutter. Ikke tilsatt FITC-lektin.*



**Figur 8:** Resultater for test av holdbarhet av FITC-lektin. Bilder A og C er inkubert i henholdsvis 20 og 40 µg/mL gammelt lektin. Bilder B og D er inkubert i henholdsvis 20 og 40 µg/mL ferskt lektin.

### 3.4 Konsentrasjon av FITC-lektin

Siden titringene ble gjort i to omganger finnes det to negative kontroller. *Figur 7* viser resultatet for den negative kontrollen for den første titringen og *Figur 9* viser resultatene fra de respektive preparatene. *Figur 10* viser resultatet for den negative kontrollen for den andre titringen. *Figur 11* viser resultatene hvor ulike konsentrasjoner av FITC-lektin ble testet ved den andre titringen. De negative kontrollene ble tilsatt PBS. Fikseringstid var fastsatt til 15 minutter og inkubasjonstid til 90 minutter.

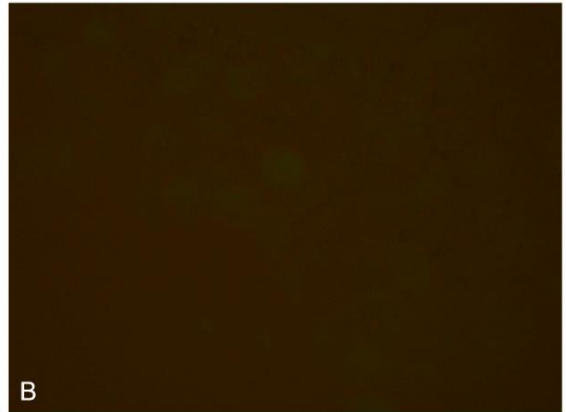
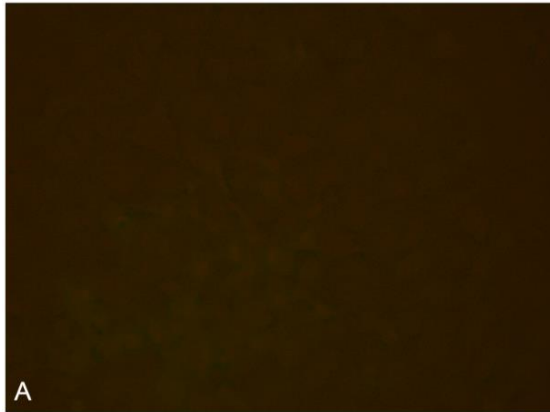


*Første titrering*

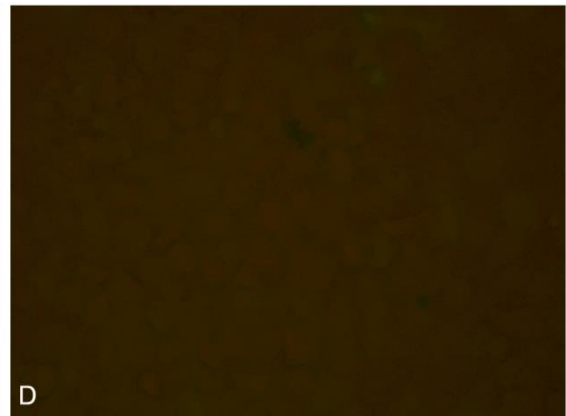
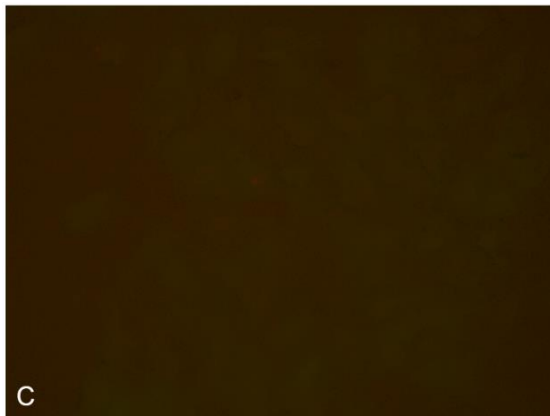
**Parallell 1**

**Parallell 2**

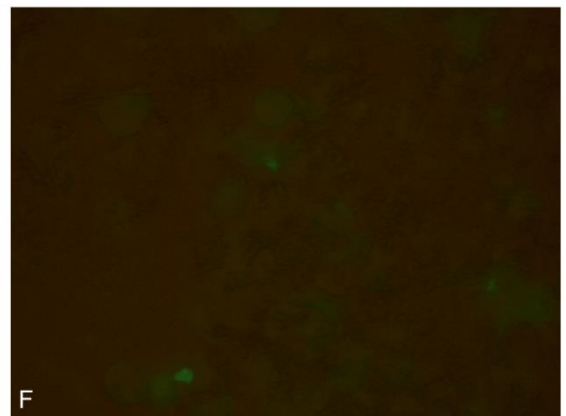
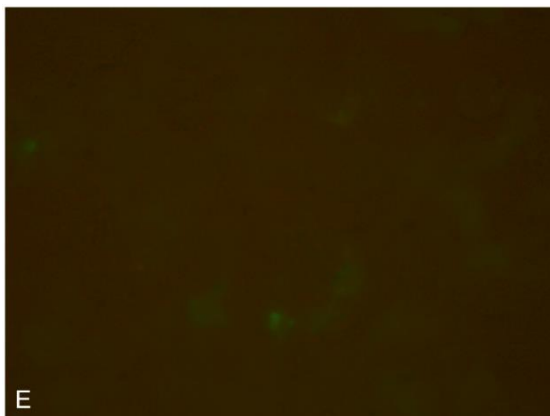
**5  
µg/mL**

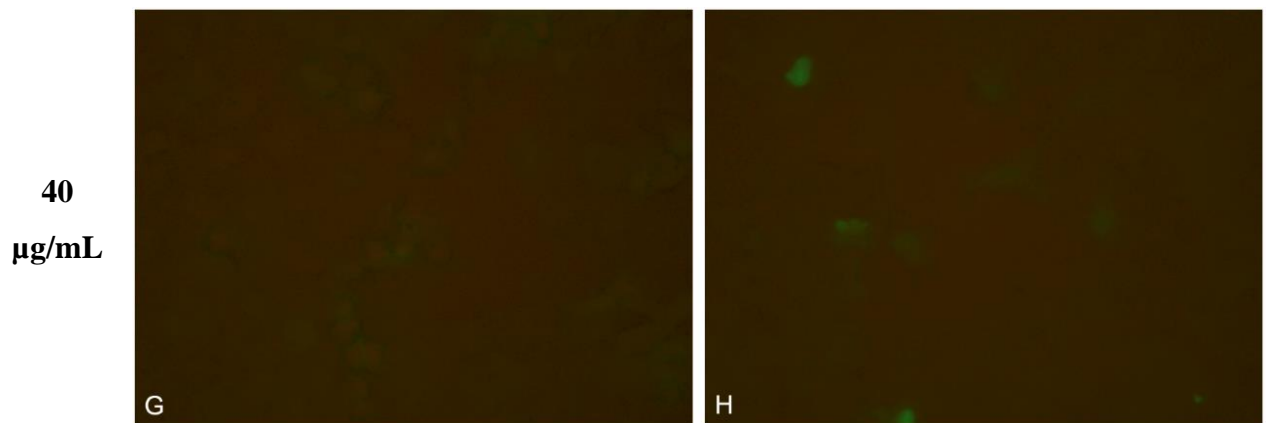


**10  
µg/mL**



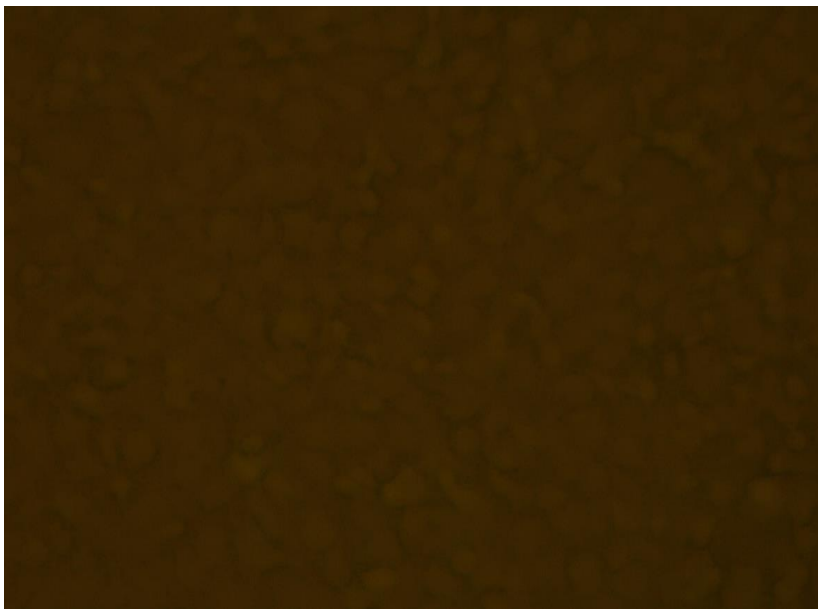
**20  
µg/mL**





**Figur 9:** Resultater fra den første titreringen. Det ble utført to paralleller for hver konsentrasjonsverdi. Venstre kolonne viser Parallell 1 mens høyre viser Parallell 2. Konsentrasjonene som ble testet var 5, 10, 20 og 40 µg/mL.

#### Andre titrering

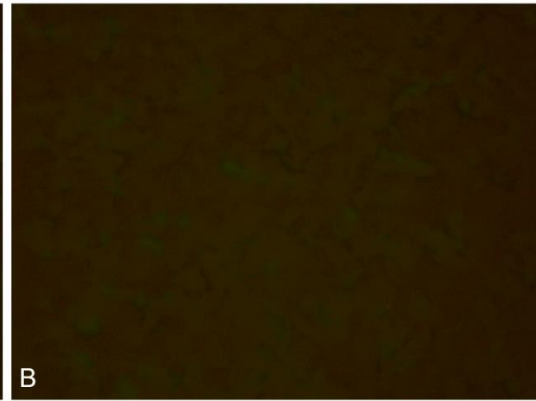
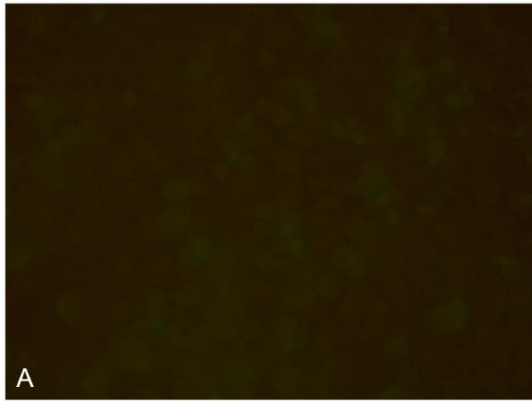


**Figur 10:** Negativ kontroll. Fiksert i 15 minutter og inkubert i PBS i 90 minutter. Ikke tilsatt FITC-lektin.

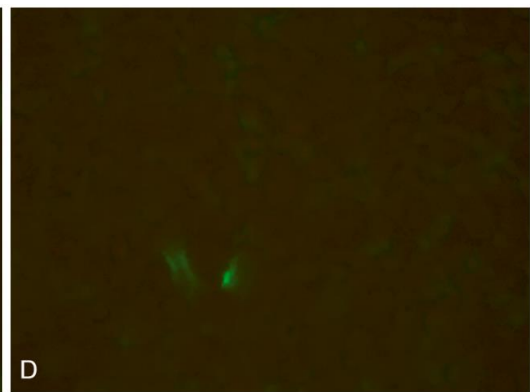
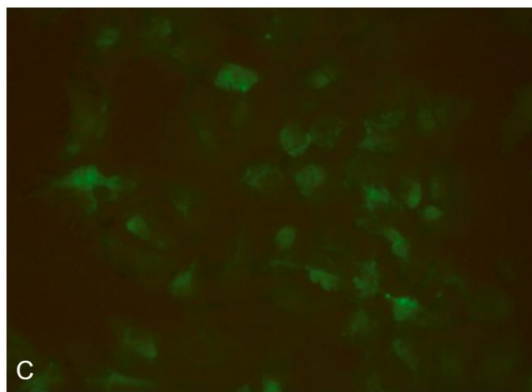
**Parallel 1**

**Parallel 2**

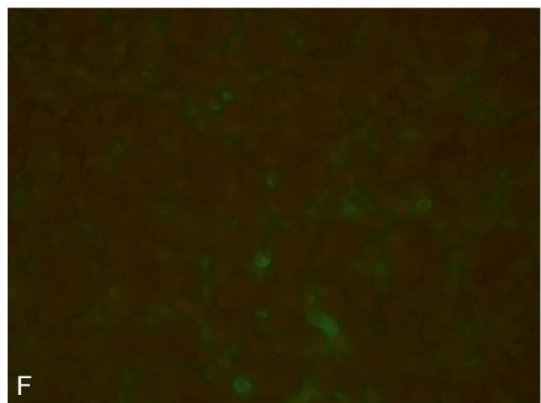
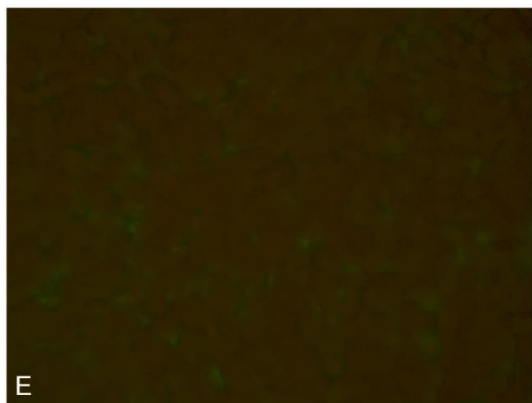
**15  
µg/mL**

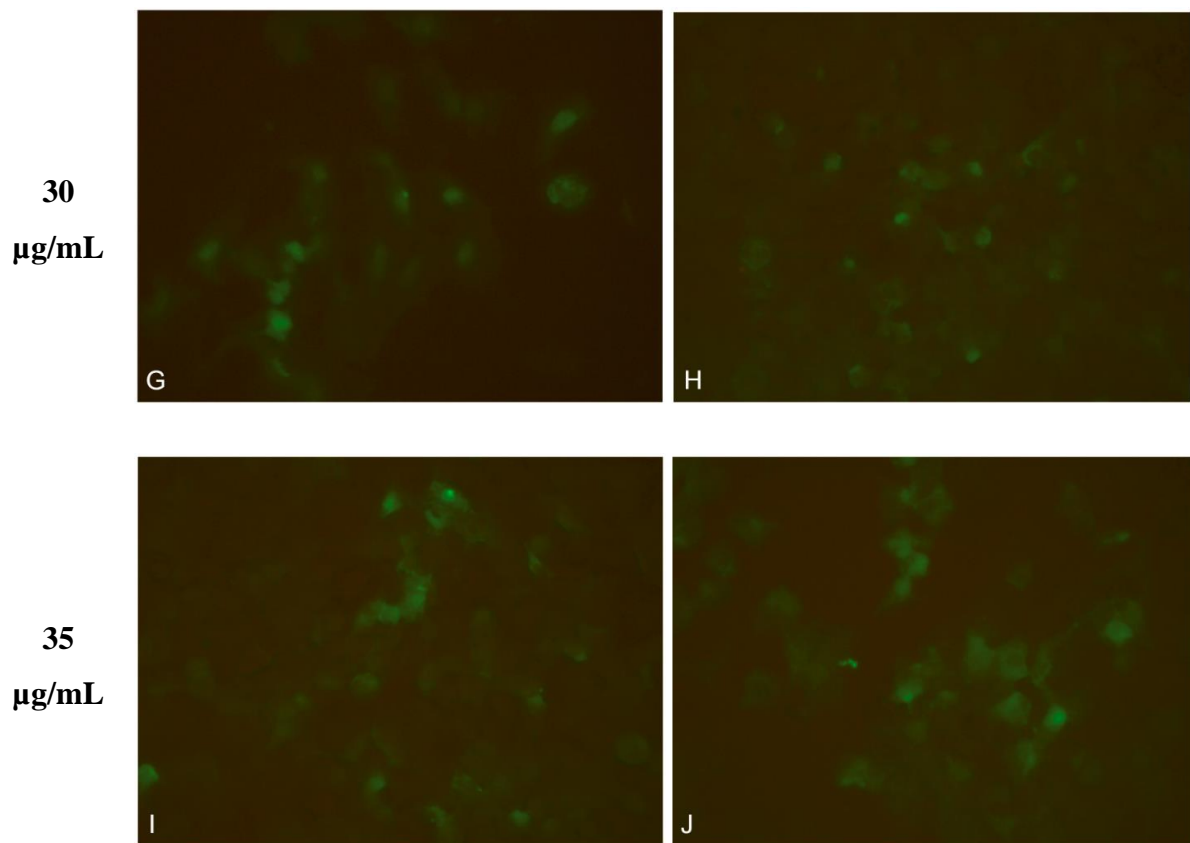


**20  
µg/mL**



**25  
µg/mL**





**Figur 11:** Resultater fra andre titrering. Det ble utført to paralleller for hver konsentrasjonsverdi. Venstre kolonne viser Parallell 1 mens høyre viser Parallell 2. Konsentrasjonene som ble testet var 15, 20, 25, 30 og 35 µg/mL.

## 4 DISKUSJON

Før vurderingen av resultatene ble det utført litteratursøk for å forsøke og finne en standardisert metode for vurdering av resultater fra fluorescensmikroskopi. Litteratursøket førte ikke frem til en standardisert metode. Det eksisterer ulike dataprogram som for eksempel kan gruppere celler etter grad av fluorescenssignal (29). I denne oppgaven ble ikke slikt dataprogram benyttet. Når resultatene fra fluorescensmikroskoperingen skulle vurderes var det derfor en subjektiv vurdering. Det kan hende resultatene hadde vært enklere å vurdere hvis et dataprogram hadde blitt benyttet. Forsøket er i tillegg utført av personer uten erfaring når det kommer til vurdering av bilder fra fluorescensmikroskopi, noe som var en utfordring. Forsøket viser at det er hensiktsmessig med nok kunnskap og erfaring når fluorescensmikroskop skal anvendes.

Under fotograferingen av de ulike preparatene var det bevisst at det skulle tas nok bilder slik at det fantes representative bilder. Dette var viktig for å kunne sammenligne preparatene i ettertid. Noen preparater viste en mer homogen fluorescensintensitet og krevde færre bilder, mens andre hadde mer heterogen fluorescensintensitet slik at det ble tatt flere bilder for å visualisere dette. Det ble dermed tatt varierende antall bilder av de ulike preparatene.

### 4.1 Fikseringstid

Det var én negativ kontroll for hver fikseringstid og alle kontrollene ble godkjent. De viser celler som ikke fluorescerer. Kontrollene er dermed med på å forsterke gyldigheten til resultatene. De negative kontrollene vises i *Figur 5* (A, D, G).

Ved farging av celler kan det være aktuelt å fikse cellene. Formaldehyd er et mye brukt fikseringsmiddel som kryssbindes til proteiner i celler (30). Det mest praktiske for prosedyren ville vært å ikke trenge å fikse cellene. Ved å unngå fiksering spares både tid, reagenser og vasketrinn. Fra resultatene er det derimot tydelig at fiksering med 4% formaldehyd virker positivt inn på fluorescensresultatet. Den største forskjellen ses fra ingen fiksering, vist i *Figur 5* (B, C), til 15 minutter fiksering, vist i *Figur 5* (E, F). Preparatene som ble fiksert i 15 minutter har en større fluorescensintensitet og fargerresultatet oppleves som mer homogent. Hos preparatene som ikke ble fiksert fantes det partier med nokså sterk fluorescens, men det var generelt dårlig fargerresultat og det var heller ikke et homogent resultat. Sammenligning

mellom 15 minutters fikseringstid, vist i *Figur 5* (E, F), og 30 minutters fikseringstid, vist i *Figur 5* (H, I), viser at fargerresultatet ble noe dårligere ved 30 minutter. Det var altså ikke stor forskjell mellom disse to verdiene. Derfor ble 15 minutters fikseringstid fastsatt videre, siden det er mest tidseffektivt.

Det at 15 minutters fikseringstid viser seg å være det mest optimale henger sammen med kjent teori. Fikseringen bevarer cellenes struktur og vil føre til at en større andel av de originale sialinsyrene finnes på celleoverflatene på fargetidspunktet (30). For mye fiksering kan derimot påvirke bindingssteder på celleoverflatene og endre strukturen (31). For eksempel kan fiksering føre til at karbohydrater på cellene binder seg til hverandre. Tan et al. brukte 10 minutters fikseringstid (10). Paul Held sier også at 10 minutters fikseringstid er et godt utgangspunkt (30). Dette gav også en pekepinn på at 15 minutters fikseringstid skulle være tilstrekkelig.

#### Videre tilpasning av fargeprosedyre

Ved optimaliseringen av fikseringstid ble det oppdaget at deler av overflaten av dekkglassene ikke var tilstrekkelig dekket av lektinløsning under inkubasjonen. Det ble derfor bestemt å videre vippe cellekulturbrettene godt etter tilsetning av lektinløsning før brettene skulle settes mørkt for inkubasjon. Ved bruk av fluorescensmikroskopet første dagen dukket det også opp en bekymring for at preparatene ble utsatt for mye lys, siden FITC-lektinet er veldig lyssensitivt (28) og bleking er en mulig feilkilde ved bruk av fluorescensmikroskop (24). Videre ble derfor kun 2-3 objektglass om gangen tatt med til fluorescensmikroskopet. Resten av objektglassene ble oppbevart i mørket til de skulle mikroskoperes, for å redusere bleking av preparatene.

#### **4.2 Inkubasjonstid**

Ved testing av inkubasjonstid ble det brukt én negativ kontroll per parameterverdi, og disse er vist i *Figur 6* (A, D, G, J). Det ble observert litt fluorescens i noen av disse kontrollene, spesielt den for 90 minutter. Dette tyder på at kontrollene var forurenset. Selv om kontrollene hadde noe fluorescens viser resultatene likevel en stor forskjell mellom kontroll og preparat, og kontrollene ble derfor godkjent. For å unngå eventuell forurensning av preparatene og kontrollene videre i forsøket ble det implementert noen endringer beskrevet i avsnitt 4.5.

Tan et al. utførte inkubasjonen i 60 minutter (10). Det ble derfor valgt inkubasjonstider rundt denne. Ved å sammenligne resultatene for preparatene vises det en gradvis økning i fluorescensintensitet parallelt med økning i inkubasjonstid. Preparatene som var inkubert i 30 minutter, vist i *Figur 6* (B, C), og preparatene som var inkubert i 45 minutter, vist i *Figur 6* (E, F), viste nokså lav fluorescensintensitet. Disse ble dermed tidlig anslått å ikke være de mest optimale inkubasjonstidene. Det var mer utfordrende å sammenligne preparatene som ble inkubert i 60 minutter, vist i *Figur 6* (H, I), og preparatene som ble inkubert i 90 minutter, vist i *Figur 6* (K, L), da disse hadde temmelig lik grad av fluorescens.

Videre ble 90 minutters inkubasjonstid fastsatt. Hovedgrunnen til dette var at parallellene for 60 minutters inkubasjonstid viste store forskjeller. Parallell 1 hadde relativt god fluorescensintensitet og et homogent fargerresultat, mens parallell 2 viste lavere fluorescensintensitet og et mer heterogent fargerresultat. Ved 90 minutters inkubasjonstid viste parallellene nokså like resultater. De viste lignende fluorescensintensitet som parallell 1 på 60 minutters inkubasjonstid, og homogent fargerresultat. Siden parallell 2 for 60 minutters inkubasjonstid var så dårlig som den var kunne ikke 60 minutter velges som den mest optimale inkubasjonstiden i dette forsøket.

Om forsøket hadde blitt repetert hadde kanskje resultatene vist noe annet. Det at kontrollen for 90 minutter hadde fluorescens gir tvil om dette egentlig var den beste inkubasjonstiden. Det kan hende at også preparatene hadde forurensning. Sammenligning av preparatene var vanskelig å utføre, spesielt for personer som ikke har mye erfaring med fluorescensmikroskopi. Det er mulig at noe av fluorescensen hos preparatene kommer av bakgrunnsstøy og at de egentlig var overfarget eller hadde uspesifikk farging, men at dette ikke ble oppfattet under vurderingen av bildene. I tillegg kan det hende preparatene inkubert i 60 minutter hadde hatt høyere fluorescensintensitet ved en repetisjon av forsøket.

### **4.3 Holdbarhet**

Det ble brukt én kontroll for å validere resultatene ved testing av holdbarhet av FITC-lektinet. Resultatet av kontrollen vises i *Figur 7* og viser ufargede celler med ingen fluorescens. Dette antyder at tiltakene som ble utført for å unngå forurensning av kontrollene fungerte.

Alle preparater hvor det gamle FITC-lektinet er brukt viser en dårligere fluorescensintensitet sammenlignet med det ferske FITC-lektinet (*Figur 8*). Dette var som forventet og resultatene sier noe om holdbarheten til lektinet. Det har blitt pipettert ut fra flasken med det gamle lektinet flere ganger, og flasken har dermed blitt eksponert for lys mer enn flasken med det ferske lektinet har blitt. Dette er nok den største faktoren som påvirker holdbarheten. Det kan også hende at generelt lengre oppbevaringstid er med på å svekke stabiliteten til FITC-lektinet og dermed fargeevnen. I pakningsvedlegget står det at reagenset vil være stabilt i opptil ett år om det er oppbevart fryst (28). Flaskene brukt i dette forsøket ble oppbevart i kjøleskap og det står ingen tydelige anvisninger for hvordan det påvirker stabiliteten til reagenset. Basert på resultatene ble det konkludert at det ferske FITC-lektinet var bedre enn det gamle og at ved bruk av dette FITC-lektinet er det fordelaktig å ha så ferskt reagens som mulig.

#### **4.4 Konsentrasjon av FITC-lektin**

Ved utvikling av en fargeprosedyre er det viktig å finne den mest optimale konsentrasjonen, både for å spare reagens og for å forhindre uspesifikke bindinger. Slike uspesifikke bindinger vil føre til et falskt positivt resultat (32), og vil kunne påvirke fremtidig forskning som bruker den foreslåtte prosedyren fra denne oppgaven. Det er også viktig å tilpasse konjugatkonsentrasjonen fordi det ofte ikke er nødvendig å bruke en like høy konsentrasjon som den leverandøren anbefaler (33).

##### *Første titrering*

Under den første titreringen av FITC-lektinet ble det testet konsentrasjoner som baserte seg rundt 20 µg/mL. Grunnen til dette var fordi denne var den laveste konsentrasjonen anbefalt av leverandøren (28). Det var derfor naturlig å ha med ett trinn over denne konsentrasjonen, og et par konsentrasjoner lavere (32).

Til kontroll ble det brukt den samme som ved testing av holdbarheten av FITC-lektin (*Figur 7*). Kontrollen viste ikke fluorescens.

Konsentrasjoner på 5 µg/mL og 10 µg/mL, vist i henholdsvis *Figur 9 (A, B)* og *Figur 9 (C, D)*, viser dårlige resultater. Det var nesten ingen forskjell mellom disse preparatene og kontrollen med tanke på fluorescens. *Figur 9 (E, F)* og *Figur 9 (G, H)* viser resultatene for



henholdsvis 20  $\mu\text{g/mL}$  og 40  $\mu\text{g/mL}$ . Resultatene viser at preparatene farget med disse konsentrasjonene hadde like høy fluorescensintensitet og det var også lik homogenitet i fargingen av preparatene. Det så dermed ut til at den mest optimale konsentrasjonen kunne ligge et sted mellom disse konsentrasjonene. Siden det er ønskelig å forbruke så lite lektin som mulig, ble det ved videre testing bestemt å teste ut konsentrasjoner rundt 20  $\mu\text{g/mL}$ .

Grunnen til at de lave konsentrasjonene av lektin gir et dårlig fargerresultat er at for liten konjugatkonsentrasjon resulterer i flere ubundne sialinsyrer (32). Dette fører til at man får falsk for lav intensitet i fluorescenssignalet. For lav konsentrasjon gjør det dermed vanskeligere å skille mellom positive og negative celler.

#### *Andre titrering*

Ved den andre titreringen ble det brukt én kontroll for å validere resultatene, og denne vises i *Figur 10*. Kontrollen viser ufargede celler og ingen fluorescens.

Siden tidligere resultater, vist i *Figur 9*, antydte at 20  $\mu\text{g/mL}$  kunne være den mest optimale konsentrasjonen ble det testet ett trinn under og tre trinn over, for å se om dette gav like godt resultat. Preparatene farget med 15  $\mu\text{g/mL}$  FITC-lektin, vist i *Figur 11* (A, B), hadde lavere fluorescensintensitet enn preparatene farget med 20  $\mu\text{g/mL}$ , vist i *Figur 11* (C, D). Resten av preparatene, hvor det var brukt 25  $\mu\text{g/mL}$  (*Figur 11* (E, F)), 30  $\mu\text{g/mL}$  (*Figur 11* (G, H)) og 35  $\mu\text{g/mL}$  (*Figur 11* (I, J)), var like godt farget som preparatene farget med 20  $\mu\text{g/mL}$ . Det ble derimot observert tegn til uspesifikke bindinger, i form av en grønn tåke i fluorescensmikroskopet. Dette gjaldt spesielt preparatene farget med 30 og 35  $\mu\text{g/mL}$ . Ved valg av den mest optimale konsentrasjonen er det ønskelig med best mulig fargerresultatet, uten slik bakgrunnsstøy (32). Basert på resultatene ble det derfor bestemt at 20  $\mu\text{g/mL}$  var den mest optimale lektinkonsentrasjonen.

Det var forventet at det fantes en terskel på hvor høy lektinkonsentrasjon som kunne anvendes før det ikke observeres noen særlige forbedringer i resultatet. Årsaken til at høyere konsentrasjoner ikke gir høyere fluorescensintensitet er knyttet til begrensninger i mulige bindingssteder på celleoverflatene. Når alle bindingsstedene er bundet kan det ikke oppnås reell høyere fluorescensintensitet uavhengig av hvor høy lektinkonsentrasjonen er (33). En for høy lektinkonsentrasjon kan derimot føre til en større andel uspesifikke bindinger (32).

## 4.5 Generelle feilkilder

Fargeresultatet fra starten av forsøket ble dårligere enn forventet. De beste resultatene er de preparatene som ble farget sent i forsøksprosessen. I tillegg til en opparbeiding av erfaring, kommer nok dette av en gradvis optimalisering av fargeprosedyren. Det er mange mulige feilkilder som kan bidra til å forklare hvorfor fargeresultatet i starten ikke var bedre enn det var.

### *Eksponering for lys*

Etter at preparatene var ferdig inkubert i FITC-lektinet og ferdig vasket skulle dekkglassene pirkes opp fra brønnene i cellekulturbrettene med et skalpell-knivblad. Dette viste seg å være utfordrende i starten og tok en del tid. Disse dekkglassene ble dermed eksponert for en del lys, som kan ha redusert fluorescensintensiteten. Etter hvert ble det lettere å utføre pirkingen, og på slutten av forsøket var det fort gjort.

### *Lektinet*

Årsaken til dårlig fargeresultat kan også komme av selve lektinet. Det er usikkert hvor mye lys og hvilken temperatur FITC-lektinflaskene har vært utsatt for før starten av forsøket. Dette gjelder spesielt den gamle flasken. Det kan også hende at fargeevnen reduseres så raskt at til og med den ferske flasken har fått redusert fargeevne siden den ble kjøpt. Problemet med lys gjelder også lektinløsningene. For å ytterligere redusere mengde lys disse ble utsatt for, kunne de kanskje blitt oppbevart i lysbeskyttende eppendorfrør. Eventuelt kunne eppendorfrørene blitt dekket med aluminiumsfolie. Til tross for disse mulige feilkildene ble resultatene bedre etter hvert. Dette tyder på at FITC-lektin i seg selv ikke er dårlig, men at det heller er knyttet til håndteringen av lektinet.

Ved tillaging av lektinløsningene var det til tider utfordrende å pipettere så små volum. Det er derfor mulig at det har skjedd pipetteringsfeil, noe som er ekstra kritisk ved små volum siden det kan utgjøre en stor forskjell. Det kan også ha skjedd pipetteringsfeil ved tilsetning av lektin på dekkglassene. Dette ville i så fall ha ført til falskt for lav fluorescensintensitet. Under forsøket var det også generell usikkerhet rundt hvor stort volum lektinløsning som burde tilsettes. Det er mulig at 500  $\mu\text{L}$  egentlig var for lite for å dekke brønnen med dekkglassene. Preparatene hadde kanskje blitt jevnere farget hvis et større volum hadde blitt tilsatt.

### *Kontroller*

I starten av forsøket ble det observert at noen av kontrollene hadde litt fluorescens. Det var flere mulige forklaringer til hvorfor dette skjedde og det ble implementert endringer knyttet til disse. En mulighet var at kontrollene ble forurenset ved dekanteringen etter FITC-lektin var tilsatt. Det kan hende at pipettering i stedet for dekantering hadde gitt mindre sannsynlighet for at kontrollene ble forurenset. Det var bevisst gjennom forsøket å være forsiktig ved dekanteringen, og at den skulle skje på en fornuftig måte. En annen mulighet var at forurensningen kom ved pipettering av de ulike reagensene. Videre ble ekstra forsiktighet utvist for å passe på at pipettespissene ikke var borti brønnveggene ved vasking etter inkubasjon med FITC-lektin, og det ble bestemt å bytte pipettespiss mellom preparat og kontroll under vasking. En siste tenkt mulighet var at objektivet hos mikroskopet kom borti preparatene under mikroskopering og fikk FITC-lektin på linsen. Objektivet på fluorescensmikroskopet ble derfor videre tørket av med linsepapir mellom hvert preparat, og det ble også vasket med 70% etanol før hver kontroll skulle mikroskoperes. Etter at disse endringene ble implementerte ble det ikke lenger observert forurensete kontroller, og det virket dermed som om endringene hjalp.

### *Fotografering*

Flere av bildene tatt med fluorescensmikroskopet var utydelige og dermed vanskeligere å vurdere. Det var en utfordring å få godt nok fokus ved fotografering. Det var forskjell i hvor fokusert preparatene så ut i mikroskopet og på den tilknyttede PC-skjermen. Bildene tatt av preparater ved testing av holdbarhet og første test av konsentrasjon av FITC-lektin ble spesielt utydelige. Det ble mistenkt at fokusering i hovedsak burde gjøres av den som mikroskoperte preparatene, og ikke av den som så på PC-skjermen. For siste test av konsentrasjoner ble dette tatt hensyn til.

### *Cellemengde*

Før cellekultur Brettene skulle brukes ble mengde celler i brønnene vurdert. Det ble observert forskjeller i mengden fra dag til dag. Dette kommer mest sannsynlig av at det ble tilsatt ulike mengder celler i cellekultur Brettene, siden de skulle inkuberes i ulikt antall dager. Det var tenkt at det på denne måten kom til å være cirka likt antall celler på alle dekkglassene når de skulle brukes. Færrest celler ble observert i Brettene som skulle brukes ved testing av fikseringstid, og ved testing av holdbarhet og første test av konsentrasjon av FITC-lektin.

Resultatene viser en mulig sammenheng mellom ulike mengder celler og fluorescensintensitet. Fluorescensintensiteten var lavere da disse parametrene skulle optimaliseres. Den lave fluorescensintensiteten kan også komme av en naturlig variasjon i mengde sialinsyrer på celleoverflatene.

#### *Ulik behandling*

Ved flere anledninger i løpet av forsøket skulle cellekultur Brett inkuberes i reagenser i ulike lengde, men behandles videre samtidig. Noen Brett ble derfor tilsatt 1x PBS mens resten ble inkubert. Dette var for å lettere holde oversikt over hvor langt hvert Brett hadde kommet i fargeprosedyren, og for å hindre at preparatene ble ferdig farget til ulike tid. Et eksempel er testingen av fikseringstid. Mens Brettet med preparater fiksert i 30 minutter fullførte fikseringstiden sin, var det tilsatt PBS i Brettet med ufikserte preparater og Brettet med preparater fiksert i 15 minutter. Det er ikke sannsynlig at dette har påvirket resultatene, men det er en feilkilde at ikke alle preparatene har blitt behandlet likt.

#### **4.6 Svakheter ved oppgaven**

Tiden tilgjengelig til å utføre laboratoriearbeidet ble begrenset, og det skulle gjerne vært nok tid igjen til å repetere forsøket. Dette var spesielt ønskelig med tanke på optimaliseringen av fikseringstid hvor farger resultatet generelt var dårlig. Helst skulle alle delene av forsøket blitt utført to ganger, i tillegg til å utføre paralleller, før det kunne fastslås hvilke verdier av parametrene som skulle brukes videre. Det var tydelig at det ble opparbeidet en bedre fremgangsmåte både for utførelse av laboratoriearbeidet og fotografering ved mikroskoperingen. Hele metodeutviklingen skulle derfor helst ha blitt utført på nytt med denne erfaringen til hjelp.

Noen preparater som ble utført i ulike omganger hadde like parameterverdier, og dermed ble det likevel utført en slags repetisjon av disse. Dette gjaldt for eksempel preparatene som ble fiksert i 15 minutter og inkubert i 20 µg/mL FITC-lektin i 90 minutter. Disse vises i *Figur 6* (K, L), *Figur 8* (B), *Figur 9* (E, F) og *Figur 11* (C, D). Resultatene for disse preparatene var varierende, og dette viser en svakhet i laboratorieforsøket og/eller prosedyren. Det er viktig at lik behandling av preparater gir likt resultat, siden dette er en måte å kvalitetssikre resultatene på.

Det skulle gjerne vært tid for å teste flere fikseringstider og inkubasjonstider. Prosedyren fra Tan et al. viste 10 minutters fikseringstid (10), og det ville dermed vært hensiktsfullt å sammenligne 10 minutters og 15 minutters fikseringstid. Siden 90 minutters inkubasjonstid i dette forsøket ble valgt som det mest optimale, ville det vært hensiktsfullt å også teste for inkubasjonstider over denne for å se om det gav noen forbedringer eller bakgrunnsstøy.

## 5 KONKLUSJON

Hensikten med oppgaven var å utarbeide og optimalisere en metode for å farge sialinsyrer på humane celler, hvorav farger resultatet skulle detekteres ved fluorescensmikroskopi.

Metodeutviklingen innebar å gjøre prosedyren økonomisk og tidseffektiv. Det ble utviklet en midlertidig fargeprosedyre som videre ble optimalisert med hensyn til fiksering, inkubasjonstid med FITC-lektin og konsentrasjon av FITC-lektin.

Ved optimalisering av fikseringsmetode ble det testet ut ulike fikseringstider. Resultatene viste at en fikseringstid på 15 minutter i 4% formaldehyd gav best resultat og denne parameteren ble fastsatt. Videre ble det testet ut ulike inkubasjonstider med FITC-lektin, og resultatet var at det var mest optimalt å inkubere cellene i 90 minutter. Til slutt ble konsentrasjonen av FITC-lektin optimalisert. Resultatene viste at en konsentrasjon på 20 µg/mL var den mest optimale. Det ble også testet en eldre flaske FITC-lektin, for å se på holdbarheten til reagenset, og basert på resultatene ble det konkludert at den ferske flasken gav best resultat. Det ble utarbeidet en endelig prosedyre basert på resultatene fra forsøket og tilpasninger utført i løpet av forsøksprosessen.

Noen av farger resultatene ble dårligere enn forventet. Dette kan komme av generelle feilkilder, men bruk av fluorescensmikroskopet gjorde det også tydelig at det er nødvendig med en viss mengde erfaring for å kunne ta gode bilder og vurdere dem korrekt. Det er mulig resultatene og konklusjonene fra forsøket hadde vært annerledes om det var utført av personer med relevante forkunnskaper. Det anbefales derfor å opparbeide seg erfaring i bruk av fluorescensmikroskop før fargeprosedyren blir utprøvd. Siden ikke alle farger resultatene ble som forventet burde den endelige fargeprosedyren optimaliseres ytterligere.

Der er flere mulige forsøk som kan utføres ved videre arbeid. For å se på ulikhetene i fargeprosedyrene kan det samme forsøket utføres med deteksjon ved flowcytometri. Metodeutvikling for dobbeltfarging med for eksempel både FITC-lektin og Texas Red-lektin kan utføres. Det kan også testes ut om tilsetning av frie sialinsyrer blokkerer binding mellom sialinsyre og lektin. Informasjonen fra blokkeringen kan være betydningsfull ved utarbeiding av legemidler mot ulike virus. En annen mulighet for videre arbeid er å behandle cellene med neuraminidase, som spalter sialinsyrer, før farging for å se om lektinet binder seg til andre strukturer hos cellene.

## LITTERATURLISTE

1. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):351-60.
2. Varki A, Schauer R. Chapter 14 Sialic Acids. I: Varki A, Cummings RD, Esko JD, redaktører. *Essentials of Glycobiology.* 2. utg. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
3. Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus–sialic acid interactions. *Nature Reviews Microbiology.* 2014;12(11):739-49.
4. Jellusova J, Nitschke L. Regulation of B Cell Functions by the Sialic Acid-Binding Receptors Siglec-G and CD22. *Front Immunol.* 2012;2.
5. Blaum BS, Hannan JP, Herbert AP, Kavanagh D, Uhrín D, Stehle T. Structural basis for sialic acid–mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol.* 2015;11(1):77-82.
6. Velásquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jiménez-Movilla M, Gallego RG, et al. Role of sialic acid in bovine sperm–zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development.* 2007;74(5):617-28.
7. Ghosh S. Chapter 1 - Sialic acid and biology of life: An introduction. I: Ghosh S, redaktør. *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease:* Academic Press; 2020. s. 1-61.
8. Nigam PK, Narain VS, Kumar A. Sialic acid in cardiovascular diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2006;21(1):54-61.
9. Papp I, Sieben C, Sisson AL, Kostka J, Böttcher C, Ludwig K, et al. Inhibition of Influenza Virus Activity by Multivalent Glycoarchitectures with Matched Sizes. *ChemBioChem.* 2011;12(6):887-95.
10. Tan CW, Huan Hor CH, Kwek SS, Tee HK, Sam IC, Goh ELK, et al. Cell surface  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid facilitates Zika virus internalization. *Emerging Microbes & Infections.* 2019;8(1):426-37.
11. Büll C, Boltje TJ, Balneger N, Weischer SM, Wassink M, van Gemst JJ, et al. Sialic Acid Blockade Suppresses Tumor Growth by Enhancing T-cell–Mediated Tumor Immunity. *Cancer Res.* 2018;78(13):3574-88.
12. Rhodes LL, Haywood AJ, Fountain DW. FITC-conjugated lectins as a tool for differentiating between toxic and non-toxic marine dinoflagellates. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* 1995;29(3):359-65.

13. Mandal C, Mandal C. Sialic acid binding lectins. *Experientia*. 1990;46(5):433-41.
14. Moriwaki K, Miyoshi E. Basic Procedures for Lectin Flow Cytometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1200:147-52.
15. Vijayan M, Chandra N. Lectins. *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(6):707-14.
16. Santos AFS, da Silva MDC, Napoleão TH, Paiva PMG, Correia MTS, Coelho LCBB. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide and Protein Research*. 2014;15:41-62.
17. Virgo PF, Gibbs GJ. Flow cytometry in clinical pathology. *Ann Clin Biochem*. 2012;49(1):17-28.
18. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow Cytometry. *J Invest Dermatol*. 2012;132.
19. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-76.
20. Stockert JA, Blazquez-Castro A. *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. Sharjah, U.A.E.: Bentham Science Publishers; 2017 [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: [https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=4stFDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=fluorescence&ots=W5SnScgkVR&sig=WoQzfhZKxXabqz4CDowU27F5vaI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=4stFDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=fluorescence&ots=W5SnScgkVR&sig=WoQzfhZKxXabqz4CDowU27F5vaI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).
21. Mazi W. NEAR-INFRARED FLUORESCENT PROBES FOR SENSITIVE DETERMINATION OF LYSOSOMAL & MITOCHONDRIAL pH IN LIVE CELLS. *ResearchGate*. 2019.
22. Greenwood M. Advantages and Limitations of Fluorescence Microscopy: *AZO Life Sciences*; 02.12.2020 [hentet 12.04.2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.azolifesciences.com/article/Advantages-and-Limitations-of-Fluorescence-Microscopy.aspx>.
23. Widefield Fluorescence Microscopy: *ibidi*; [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: <https://ibidi.com/content/215-widefield-fluorescence>.
24. Lichtman JW, Conchello J-A. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):910-9.
25. Ockenga W. *Fluorescence in Microscopy*. Tyskland: Leica Microsystems; 27.04.2011 [hentet 12.04.2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescence-in-microscopy/>.
26. Everything You Need To Know About A549 Cells: *Synthego*; [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.synthego.com/a549-cells>.



27. Wielgat P, Trofimiuk E, Czarnomysy R, Holownia A, Braszko JJ. Sialylation pattern in lung epithelial cell line and Siglecs expression in monocytic THP-1 cells as cellular indicators of cigarette smoke – induced pathology in vitro. *Exp Lung Res.* 2018;44(3):167-77.
28. EY Laboratories. PRODUCT INFORMATION FITC Labeled Lectin [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: [http://eylabs.com/wp-content/uploads/media/BCDatashets\\_C\\_10.26/FXXXX/F-7801-2.pdf?distributor=true](http://eylabs.com/wp-content/uploads/media/BCDatashets_C_10.26/FXXXX/F-7801-2.pdf?distributor=true).
29. Waters JC, Swedlow JR. Interpreting fluorescence microscopy images and measurements. *Evaluating Techniques in Biochemical Research* D Zuk, editor Cell Press, Cambridge, MA. 2007:37-42.
30. Held P. Sample Preparation for Fluorescence Microscopy: An Introduction: Agilent; 2015 [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.agilent.com/cs/library/whitepaper/public/cell-fixation-5994-2778EN-agilent.pdf>.
31. Leathem A, Atkins N. Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections. *J Clin Pathol.* 1983;36:747-50.
32. Titrating Antibodies for Flow Cytometry: UWCCC Flow Cytometry Laboratory; 05.05.2016 [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: [https://cancer.wisc.edu/research/wp-content/uploads/2017/03/Flow\\_TechNotes\\_Antibody-Titrations\\_20170918.pdf](https://cancer.wisc.edu/research/wp-content/uploads/2017/03/Flow_TechNotes_Antibody-Titrations_20170918.pdf).
33. Antibody Titration in Flow Cytometry: Bio-Rad; [hentet 28.04.2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-antibody-titration.html>.

## VEDLEGG

### Vedlegg 1: Risikovurdering av laboratoriearbeid

Risiko	Sannsynlighet	Konsekvens	Risikoverdi	Mottiltak
Kontaminering av preparater	5 - Svært stor	1 - Svært liten	5	<ul style="list-style-type: none"><li>- Desinfisere utstyr og arbeidsbenk med 70% etanol</li><li>- Bruk av hansker</li><li>- Ikke la topper være av lenger enn nødvendig</li></ul>
Søl av reagenser	3 - Middels	3 - Moderat	9	<ul style="list-style-type: none"><li>- Bruke hansker, vernebriller og labfrakk</li><li>- Lese H- og P-setninger for reagensene før forsøk</li><li>- Bruk av avtrekksskap</li></ul>
Kutt på knust glass	2 - Liten	1 - Svært liten	2	<ul style="list-style-type: none"><li>- Utvise forsiktighet ved håndtering av glassutstyr</li></ul>
Skader på utstyr: Leica DM200 LED Mikroskoper	2 - Liten	3 - Moderat	6	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sette seg inn i korrekt bruk av utstyret/instrumentet</li><li>- Spør om man er usikker</li></ul>
Feil håndtering av avfall (reagenser)	4 - Stor	3 - Moderat	12	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lese H- og P-setninger for reagensene før forsøk</li><li>- Ikke tøm ut før man er sikker på hvor det skal tømmes</li></ul>

## **Vedlegg 2: Forslag til fargeprosedyre**

### **Fiksering**

1. Når celledyrkningen er klar, se på 6-brønn cellekultur Brettene i et lysmikroskop for å bekrefte at der er celler tilstede på dekkglassene.
2. Fjern dyrkingsmediet fra brønnene.
3. Vask dekkglassene ved å pipettere 3 mL 1x PBS (PBS) i hver brønn. Plasser pipettespissen mot veggen av brønnen og tilsett forsiktig, uten å komme borti dekkglassene.
4. Fjern PBS.
5. Repeter trinn 3 og 4 to ganger til.
6. Fikser cellene ved å pipettere 2 mL 4% formaldehyd i hver brønn. Plasser pipettespissen mot veggen av brønnen og tilsett forsiktig, uten å komme borti dekkglassene.
7. Inkuber brettene på benken i 15 minutter.
8. Lag til nødvendig volum lektinløsning med konsentrasjon på 20 µg/mL. Bruk PBS til fortynningen. Oppbevar løsningen i mørket i romtemperatur til den skal brukes.
9. Etter fikseringen er ferdig, fjern formaldehyd.
10. Vask dekkglassene ved å pipettere 3 mL PBS i hver brønn. Plasser pipettespissen på veggen av brønnen og tilsett forsiktig, uten å komme borti dekkglassene.
11. Fjern PBS.
12. Repeter trinn 10 og 11 to ganger til.

### **Farging og tørking**

13. Ta frem lektinløsningen igjen. Pass på å blande den litt ved å pipettere opp og ned noen ganger før den skal tilsettes på dekkglassene.
14. Pipetter 500 µL lektinløsning oppå hvert dekkglass, sakte og forsiktig.
15. Vipp på brettene slik at lektinløsningen blir godt spredd utover hele overflaten til dekkglassene.
16. Inkuber brettene i romtemperatur i mørket i 90 minutter.
17. Etter inkubasjonen er ferdig, fjern lektinløsningen.
18. Vask dekkglassene ved å pipettere 3 mL PBS i hver brønn. Plasser pipettespissen mot veggen av brønnen og tilsett forsiktig, uten å komme borti dekkglassene.
19. Fjern PBS.
20. Repeter trinn 18 og 19 én gang til.

21. Vask dekkglassene ved å pipettere 3 mL PBS i hver brønn. Plasser pipettespissen mot veggen av brønnen og tilsett forsiktig, uten å komme borti dekkglassene. Ikke fjern PBS.
22. Pirk opp dekkglassene ved å bruke en pinsett eller et skalpell-knivblad, uten å komme borti overflaten av dekkglassene. Sett dekkglassene stående inntil veggene til tomme brønner på et Brett. Tørk gjerne av knivbladet mellom hvert dekkglass.
23. Sett brettene i mørket og la dekkglassene tørke der i romtemperatur.

### **Montering og mikroskopering**

24. Marker objektglassene som skal brukes og plasser de i et avtrekksskap.
25. Når dekkglassene er tørre, flytt brettet til avtrekksskapet.
26. Tilsett cirka 1 dråpe monteringsmedium midt på objektglasset og legg tilhørende dekkglass oppå, med overflaten med de fargede cellene opp.
27. Legg objektglasset i mørket så fort det er klart, for å minimere tiden dekkglasset er utsatt for lys.
28. Analyser preparatene ved bruk av et fluorescensmikroskop i et mørkt rom. Ikke ta med for mange preparater av gangen, for å unngå at de blir utsatt for lys lenger enn nødvendig.
29. Tørk 40x-objektivet med linsepapir mellom hvert preparat.

