

Analys av haptoglobin i bovint serum med surface plasmon resonance biosensorteknik

Analysis of haptoglobin in bovine sera using surface plasmon resonance biosensor technique

Niklas Borg

Handledare: Stefan Alenius
Institutionen för kliniska vetenskaper, avd. idisslarmedicin och epidemiologi

Biträdande handledare: Åse Sternesjö
Institutionen för livsmedelsvetenskap, avd. mjölkproduktlära

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Examensarbete 2006:4
ISSN 1652-8697
Uppsala 2005

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ABSTRACT	2
SAMMANFATTNING	2
BAKGRUND OCH SYFTE	2
INTRODUKTION	3
AKUTFASPROTEIN HOS NÖT	3
HAPTOGLOBIN	5
ANALYS MED OPTISKA BIOSENSORER	6
MATERIAL OCH METODER	8
INSTRUMENT	8
REAGENS	8
ANALYS AV HAPTOGLOBIN MED HJÄLP AV PHASE™ RANGE	9
ANALYS AV HAPTOGLOBIN MED HJÄLP AV BIOSENSORTEKNIK	9
RESULTAT OCH DISKUSSION	13
STANDARDKURVOR	13
SPÄDNINGAR	13
BESTÄMNING AV DETEKTIONSGRÄNS	13
RESULTAT AV HAPTOGLOBINANALYSER	14
METODJÄMFÖRELSE AV BIOSENSORMETODEN VS PHASERANGE	15
SLUTSATSER	17
TACK	18
REFERENSER	20

ABSTRACT

The concentration of acute phase proteins in serum is altered as a response to inflammation, infection or trauma. This makes these proteins potential biomarkers of unspecific pathological processes. In cattle, haptoglobin and serum amyloid A are the two acute phase proteins that show the largest increase in serum concentration as a result of inflammatory processes. The haptoglobin concentration has been shown to correlate to clinical signs as well as inflammatory processes found at post mortem examination. This feature could be useful prognosis of the individual as well as for monitoring the health status of a herd or identifying carcasses that should be examined closer at the slaughter-house. In this paper, a method for analysis of haptoglobin in milk has been modified for use with bovine sera. The method which uses optical biosensor technology is based on the haemoglobin binding properties of haptoglobin. It utilizes the interaction between analyte (haemoglobin) and biological ligand (haptoglobin) which results in an optically detectable alteration in mass on the sensor surface.

SAMMANFATTNING

Serumkoncentrationen av akutfasproteiner förändras som svar på inflammation, infektion eller trauma, vilket gör dem till potentiella biomarkörer för ospecifika sjukdomstillstånd. Hos nötkreatur är haptoglobin och serumamyloid A de akutfasproteiner som visar kraftigast ökning vid inflammatoriska tillstånd. Haptoglobinkoncentrationen har också visats korrelera med kliniska symptom och inflammatoriska förändringar funna vid obduktion. Detta skulle kunna användas för att ställa prognos på individnivå men även för övervakning av hälsoläge i besättningar samt på slakteri för selektion av slaktkroppar som bör undersökas noggrannare. I detta arbete beskrivs hur en metod för analys av haptoglobin i mjölk anpassats för analys av haptoglobin i bovint serum. Metoden utnyttjar haptoglobinet hemoglobinbindande egenskaper och är utvecklad med hjälp av optisk biosorteknik. Grunden för analysen är en interaktion mellan analyt (hemoglobin) och biologisk ligand (haptoglobin) vilken resulterar i en optiskt detekterbar förändrad massa på sensorytan.

BAKGRUND OCH SYFTE

Akutfasproteiner utgör en del av det första svaret på en vävnadsskada till följd av infektion, inflammation eller trauma, vid frisättning av proinflammatoriska mediatorer förändras deras koncentrationer dramatiskt vilket gör dem till potentiella biomarkörer på sjukdom. Haptoglobin och serumamyloid A är hos nötkreatur de två akutfasproteiner som visar kraftigast stegring i serumkoncentration vid inflammatoriska svar.

Syftet med detta arbete har varit att anpassa en tidigare utvecklad biosensormetod för analys av haptoglobin i mjölk, så att denna även ska kunna användas på bovint

sera. Metoden bygger på optisk biosensorteknik (surface plasmon resonance; SPR) och används idag i studier av sambandet mellan subklinisk mastit haptoglobin och mjölkens kvalitet. En fungerande metod för analys av haptoglobin i sera med denna teknik skulle möjliggöra analys av en större volym prover till en lägre kostnad än dagens kommersiella testkit. Haptoglobinanalysen skulle därmed kunna bli ett praktiskt verktyg för diagnos och prognos på individnivå samt för övervakning av hälsoläge i besättningar liksom livsmedelshygienen på slakterier.

INTRODUKTION

Akutfasprotein hos nöt

Akutfasprotein är protein vars serumkoncentration antingen ökar (positiva akutfasprotein) eller minskar (negativa akutfasprotein) som svar på inflammation, infektion eller trauma och sedan återgår till normala koncentrationer när stimulit försvinner. Akutfasproteiner produceras och frisätts huvudsakligen från levern. Frisättningen styrs främst av cytokiner vilka produceras i celler som makrofager, keratinocyter, epitel- och kupfferceller som svar på skada (fig. 1). Akutfasproteinernas uppgift kan huvudsakligen sägas vara att binda för kroppen skadliga substanser samt understödja elimination av patogener (Murata et al., 2004).

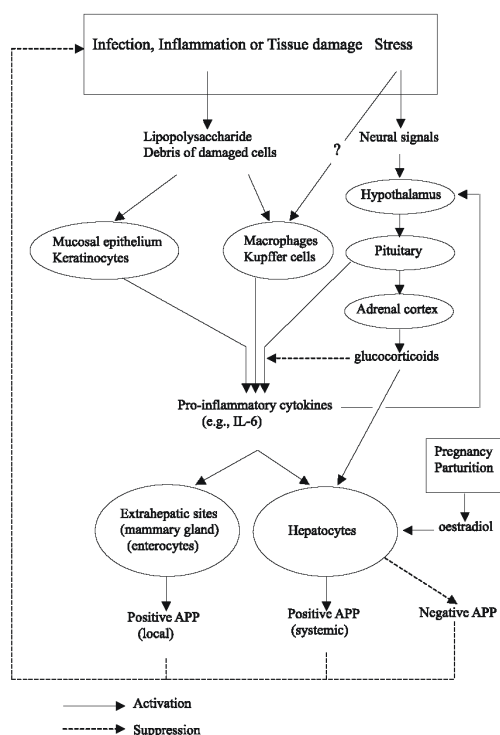


Fig. 1. Schematisk bild över frisättningen av akutfasprotein från levern som svar på stimuli (Murata et al., 2004).

Hos nötkreatur finns ett flertal akutfasprotein identifierade, till de vanligare nämnda hör haptoglobin som bl.a. binder hemoglobin, serumamyloid A som främjar elimination av bakterietoxiner samt kemotaxi, fibrinogen som behövs vid koagulationen, ceruplasmin som binder koppar och på så sätt har en antioxidativ effekt, α -1-antitrypsin som är en proteinashämmare samt fetuin vars funktion är okänd (Murata et al., 2004). Av dessa ökar haptoglobin och serumamyloid A kraftigast (10-100 ggr) vid inflammatoriska svar, övriga ökar endast måttligt; ≤ 10 ggr (Nielsen et al., 2004, Humblet et al., 2004, Singh & Pachauri 2002) vilket gör haptoglobin och serumamyloid A till de mest användbara parametrarna för detektion och uppföljning av inflammatoriska processer.

Hos nötkreatur anses det inte finnas detekterbara haptoglobinnivåer i sera från kliniskt friska individer, medan koncentrationer på 1500-3000 $\mu\text{g/ml}$ rapporterats vid experimentella infektioner (Conner et al., 1986, Eckersall et al., 2001, Horagoda et al., 1999, Humblet et al., 2004, Nielsen et al., 2004) och vid intravenös injektion av lipopolysackarider (Jacobsen et al., 2004). Nivåerna serumamyloid A i serum från friska individer har i olika studier rapporterats vara upp till ca 5-15 $\mu\text{g/ml}$, medan koncentrationen visats kunna stiga till 100-400 $\mu\text{g/ml}$ vid experimentella infektioner (Eckersall et al., 2001, Gånheim et al., 2003, Heegaard et al., 2000, Horagada et al. 1999, Nielsen et al., 2004) och till nästan 1500 $\mu\text{g/ml}$ vid intravenös injektion av lipopolysackarider (Jacobsen et al., 2004).

Diagnostiskt värde av haptoglobin och serumamyloid A hos nötkreatur

I studier har man sett att haptoglobin och serumamyloid A inte korrelerar med varandra, varför slutsatsen dragits att syntes och frisättning regleras på olika sätt (Jacobsen et al. 2004). Serumamyloid A är det protein som reagerar snabbast vid en infektion (Heegaard et al., 2000) men som också återgår till normala nivåer tidigast (Heegard et al., 2000, Gånheim et al., 2003). Haptoglobin responsen kommer däremot något senare än serumamyloid A och dröjer sig kvar längre. Det har föreslagits att kvoten mellan haptoglobin och serumamyloid A skulle kunna användas för att särskilja akuta och mer kroniska inflammationer (Horagoda et al., 1999). Resultaten av studien visade dock att serumamyloid A hade hög sensitivitet (100%) men låg specificitet (46%), för akut inflammation emedan haptoglobin hade en låg sensitivitet (68%) men en något högre specificitet (76%), vilket gör det svårt att dra några säkra slutsatser från kvoten mellan haptoglobin och serumamyloid A. Haptoglobin har visat sig korrelera bättre med kliniska symptom under olika sjukdomsförlopp, såväl tidsmässigt som med inflammatoriska förändringar funna kliniskt och vid obduktion efter experimentella infektioner (Deignan et al., 2000, Heegaard et al., 2000).

Humblet et al. (2004) visade i en studie under fältmässiga förhållanden att tidig mätning av haptoglobin i kombination med fibrinogen, med 60% sensitivitet och 80% specificitet, kunde selektera ut kalvar vilka senare bedömdes vara i behov av antiinflammatorisk behandling för bronkopneumoni.

Analys av akutfasprotein på slakterier skulle snabbt kunna indikera vilka slaktkroppar som bör undersökas närmare. Gruys et al. (1993) undersökte ett antal blodparametrar hos nötkreatur vid slakt och fann att haptoglobin med stor säkerhet detekterade kraftigare, pågående inflammatoriska processer men missade däremot en del mindre förändringar. Serumamyloid A visade sig vara något sämre då detta även gav utslag för mycket små inflammatoriska förändringar samt djur hos vilka man inte kunde påvisa någon inflammatorisk eller annan patologisk process.

Haptoglobin

Struktur och egenskaper

Haptoglobin är ett glykoprotein med hemoglobinbindande egenskaper, bovint haptoglobin är uppbyggt av en α -subenhet med en molekylvikt på ca 16 kDa och en β -subenhet med en molekylvikt på ca 40 kDa (Eckersall & Conner, 1990). Bovint haptoglobin föreligger i $\alpha_2\beta_2$ tetramerer; dessa tetramerer är i sin tur polymeriserade i sera där 2-20 $\alpha_2\beta_2$ tetramerer kopplats samman. Utöver denna polymerisering har man även visat på kraftiga interaktioner mellan haptoglobin och serumalbumin. Detta sammantaget gör att bovint haptoglobin liknar den humana 2-2 formen av haptoglobin (Eckersall & Conner, 1990), något som utnyttjats i den i arbetet använda biosensormetoden. β -subenheten i haptoglobin är den del som har den kraftigaste affiniteten till hemoglobin. Generna för både hemoglobin och haptoglobin är starkt konserverade under evolutionen, vilket inneburit att haptoglobin inte uppvisar någon artspecificitet för hemoglobin (Morimatsu et al., 1991).

Reglering av frisättning

Frisättning av haptoglobin styrs av proinflammatoriska mediatorer vilka frisätts från bland annat makrofager, keratinocyter, epitel- och kupfferceller vid skada. Interleukin-6 har visat sig ge den kraftigaste frisättningen av haptoglobin men interleukin-1 β och TNF α har också visat sig inducera en viss frisättning (Yoshioka et al., 2002). Proinflammatoriska mediatorer inducerar en frisättning av haptoglobin från levern men nyligen har dock även lokal produktion i juvret påvisats (Hiss et al., 2004).

Effekter av haptoglobin

Komplexet mellan haptoglobin och hemoglobin utgör den starkast kända nonkovalenta interaktionen hos plasmatransportproteiner (van Vlierberghe et al., 2004). Varje enhet i haptoglobin kan binda en hemoglobinmolekyl, β -enheten har dock en mycket kraftigare affinitet till hemoglobin än α -enheten (Okazaki et al., 1997). När hemoglobin binds av haptoglobin minskas även den oxidativa stress som kroppen utsätts för via fritt hemoglobin som genererar fria radikaler såsom

superoxid och hydroxyler bl.a. via fentonreaktionen: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$. Dessa reaktiva syrearter kan sedan orsaka skada protein, lipider och DNA (Gutteridge & Smith, 1988, Langlois & Delanghe, 1996).

Eliminationen av cirkulerande hemoglobin-haptoglobinkomplex sker genom bindning till ett receptorprotein, CD163, på makrofager och monocyter, varefter komplexet tas upp via endocytos och bryts ner i lysosomer där hemgruppen omvandlas till billirubin (Heilskov Graversen et al., 2002, Kristiansen et al., 2001). När haptoglobin binder fritt hemoglobin förhindrar detta även bakterier att utnyttja det järn som finns i hemoglobin, något som resulterar i en bakteriostatisk effekt. Bindningen minimerar samtidigt förlust av järn via njurarna (van Vlierberghe et al., 2004). CD163 har visats uppregleras av interleukin-6, den antiinflammatoriska faktorn interleukin-10 samt av glukokortikoider (Heilskov et al., 2002, Högger et al. 1998). Genom att korslänka flera CD163 med monoklonala anti-CD163 antikroppar har man kunnat se en frisättning av ett flertal antiinflammatoriska mediatorer (van den Heuvel et al., 1999). Det har föreslagits att haptoglobin skulle kunna utöva antiinflammatorisk effekt genom att polymeriserade hemoglobin-haptoglobinkomplex korslänkar flera CD163-receptorer.

Haptoglobin har funnits ha en immunomodulerande effekt både in vitro och i haptoglobin-knockout möss. Studier har visat att haptoglobin orsakade kraftig inhibering av cytokiner som stimulerar T-hjälparceller typ 2 (Th2), men endast en mycket liten hämning av cytokiner som stimulerar T-hjälparceller typ 1 (Th1) (Arredouani et al., 2003). Trots att haptoglobin har en generell, direkt hämmande effekt på T-celler kommer alltså denna modulering av Th1/Th2 balansen att favorisera ett cellmedierat immunsvaret framför ett humoralt.

Angiogenes spelar en viktig roll vid såväl fysiologiska som patologiska tillstånd däribland sårhäkning, embryoutveckling, tumörtillväxt och kroniska inflammatoriska sjukdomar. Haptoglobin har både in vitro och in vivo visat sig ha en direkt, dosberoende positiv effekt på angiogenes (Cid et al., 1993).

ANALYS MED OPTISKA BIOSENSORER

Biosensorteknik bygger på en interaktion mellan analyt och en biologisk ligand (t.ex. receptor eller antikropp) vilken kan detekteras fysiskt eller kemiskt exempelvis genom förändring av massa eller elektrisk potential, se fig. 2.

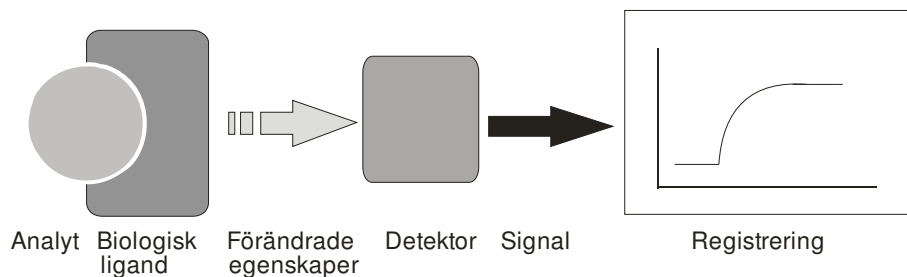


Fig. 2. Principen för biosensoranalys.

Biosensorteknik möjliggör snabba, känsliga, specifika analysmetoder utan större behov av provupparbetning samt möjlighet till automatisering av provhanteringen. Den använda tekniken erbjuder även realtidsdetektion där hela analysförloppet kan följas till skillnad från andra analysmetoder där ofta bara ett slutvärde erhålls.

Det första kommersiellt tillgängliga biosensorinstrumentet baserat på optisk detektion presenterades 1990 av det Uppsalabaserade företaget Biacore vilka nu är marknadsledande på området. Instrumentet bygger på en optisk detektion av biospecifika interaktioner mellan prov och ligand när provet får flöda över en sensoryta där liganden fästs. Interaktionen registreras av en dator och presenteras längs en tidsaxel i form av sensorgram. Efter varje analys injiceras en regenereringslösning varvid interaktionen bryts, ytan spolvas ren och är redo för nästa analys.

Detektion

För detektion av interaktioner utnyttjas surface plasmon resonance (SPR), ett optiskt fenomen som uppstår i ytskiktet mellan två media med olika refraktionsindex. En monokrom planpolariserad ljusstråle i mediet med högre refraktionsindex (i detta fall glas) kommer, om den infaller över en specifik vinkel mot ytan till mediet med lägre refraktionsindex (här flödescell med prov och buffert) normalt att totalreflekteras. Är ytan mellan de olika medierna täckt av en tunn metallfilm (ex guld) kommer ljus med en mycket specifik infallsvinkel att interagera med fria elektroner i metallen, energi absorberas och intensiteten hos det reflekterade ljuset minskar vid motsvarande vinkel, SPR-vinkeln. När en molekyl binder in till ytan kommer massan och därmed refraktionsindex att förändras varvid en förändring i SPR-vinkeln uppstår och kan detekteras. Denna förändring uttrycks av instrumentet som resonance units (RU) där 1 RU motsvarar en förändring av vinkeln med $0,0001^\circ$, en ökning av massan på ytan med 1 ng/mm^2 ger en förändring av vinkeln med $0,1^\circ$ d.v.s 1000 RU. Genom att plotta förändringen av vinkeln längs en tidsaxel fås ett sensorgram där interaktionen kan följas i realtid (fig. 3).

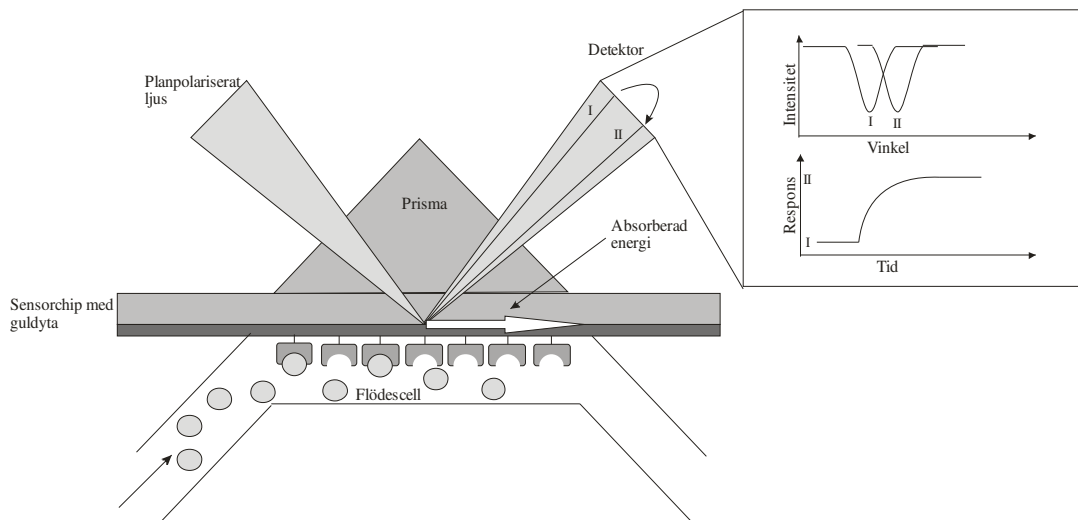


Fig. 3. Förskjutning av SPR-vinkeln som en följd av ökad massa på sensorytan vid inbindning av analyt; denna förskjutning detekteras och registreras över tiden.

Sensorchip

Sensorchipet består av en glasyta som ger stöd åt en mycket tunn guldyta. Till guldets är en matris av dextran kovalent bunden, och till dextranet kopplas sedan önskad ligand. Det finns ett flertal olika typer av dextran men till det vanligare använda hör ett chip täckt med karboxymetylerad dextran där karboxylsyragrupperna lätt kan aktiveras för koppling till amin-, sulfid-, keto-, hydroxyl- eller andra karboxylsyragrupper på liganden.

MATERIAL OCH METODER

Instrument

Metodutveckling utfördes på Biacore 1000 (Biacore AB, SE-754 50, Uppsala) med Biacore 1000 control software (version 2.5) samt BIAevaluation (version 3.2) för bearbetning av data. Analys av serumprover utfördes på Biacore Q (Biacore AB, SE-754 50, Uppsala) med Biacore Q Control Software (version 3.0.1) och BIA evaluation (version 3.2) bearbetning av data, detta p.g.a tekniska problem med Biacore 1000.

Mätning av absorbans vid haptoglobinanalys med PHASE™ RANGE Haptoglobin Assay utfördes med EL_x 800 (Bio-tek instruments Inc.) med KC4 Kineticalc for windows (version 2.5) programvara.

Reagens

Sensor Chip CM5 (research grade), HBS-P buffert pH 7.4 (10 mM 4-[2-hydroxyetyl] piperazine-1-etan-sulfonsyra (Hepes), 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) surfactant P-20), amine coupling kit (400 mM N-etyl-N´-(3-etylaminopropyl)

carbodiimidhydroklorid (EDC), 100 mM N-hydroxysuccinimid (NHS) och 1M etanolaminhydroklorid) och SDS (0.5%(w/v) natriumlaurylsulfat) från Biacore AB (SE-754 50, Uppsala).

Då bovint haptoglobin inte fanns kommersiellt tillgängligt vid arbetets början användes humant haptoglobin i 2-2-form (Biogenesis, Poole, BH17 0NF, England). Bovint hemoglobin var från Sigma (St Louis, MO 63178, USA). Före användning stabiliserades hemoglobinet i en buffert innehållande 200 mg $K_3Fe(CN)_6$, 50 mg KCN, och 140 mg KH_2PO_4 . Acetatbuffert (0.01M pH 3.8) användes vid immobilisering av haptoglobin på sensorytan och HBS-P buffert pH 7.4 användes för spädning av kalibreringsprover samt serumprover.

Serumprover från kalv erhöles av Charina Gånheim (Institutionen för kliniska vetenskaper, Avd. idisslarmedicin och epidemiologi, SLU) som tidigare bestämt haptoglobinkoncentrationerna med PHASE™ RANGE Haptoglobin Assay. Dessa analyser utfördes 2000 i samband med en studie där akutfasproteinkoncentrationer mättes vid experimentella infektioner hos kalv (Gånheim et al., 2003). Tio serumprover från friska kalvar (haptoglobinkoncentration $<50\mu\text{g/ml}$) och tio serumprover från kalvar med förhöjda haptoglobinvärden ($500\text{-}1450\mu\text{g/ml}$) tagna augusti-september 1999, förvarade vid -70°C , användes under metodutvecklingen. Serumprover togs också från tio kliniskt friska kor vilka genomgick övningsoperation vid Institutionen för kliniska vetenskaper, avd. idisslarmedicin och epidemiologi SLU, där korrigerig av löpmagsförskjutning via högersidigt flanksnitt tränades. Serumprover togs före samt två dagar efter operation, korna fick pre- och postoperativ smärtlindring med Metacam (meloxicam 20mg/ml , dos enligt Fass vet).

Analys av haptoglobin med hjälp av PHASE™ RANGE

Jämförande analyser av haptoglobinkoncentrationer utfördes med PHASE™ RANGE Haptoglobin Assay (Tridelta Development Ltd, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Metoden bygger på att fritt hemoglobin uppvisar en peroxidasaktivitet som avstannar vid lågt pH. När hemoglobin bildar komplex med haptoglobin bibehålls peroxidasaktiviteten även vid lägre pH och är därvid proportionerlig mot haptoglobinkoncentrationen. Detta utnyttjas i en reaktion som resulterar i en färgad produkt vilken kan detekteras. Analysen utfördes enligt tillverkarens instruktioner och absorbansen mättes. Metodens detektionsgräns är angiven till $50\mu\text{g/ml}$ av tillverkaren.

Analys av haptoglobin med hjälp av biosensorteknik

Princip

Analysmetoden för haptoglobin i serum grundar sig på en indirekt metod för analys av haptoglobin i mjölk (Åkerstedt et al., 2005). Haptoglobin kopplas till sensorytan och proverna blandas före injicering 1:10 med en hemoglobinlösning

(1,5 $\mu\text{g/ml}$). Den fria mängden hemoglobin som inte inhiberas av haptoglobin i provet binder in till haptoglobinytan och detekteras varefter haptoglobinkoncentrationen beräknas utifrån en standardkurva. En högre koncentration haptoglobin i provet ger en mindre koncentration fritt hemoglobin vilket resulterar i en mindre inbindning till ytan och en mindre respons. Figur 4 visar två sensorgram, det övre visar ett prov utan haptoglobin vilket ger en stor mängd fritt hemoglobin som kan interagera med ytan och en hög respons fås, provet i det undre sensorgrammet innehåller höga koncentrationer haptoglobin som binder upp nästan allt hemoglobin och en mycket låg respons fås.

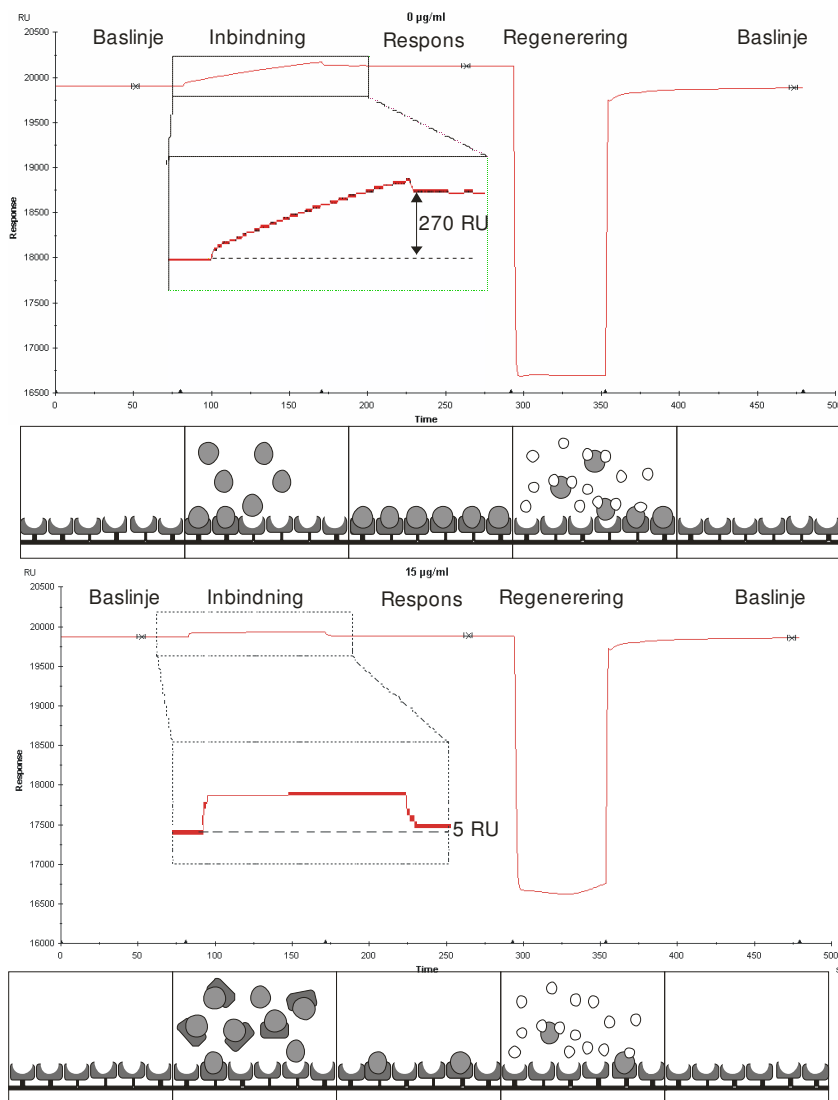


Fig. 4. Sensorgram och illustrationer av analysförloppet för två prover, ett utan haptoglobin (överst), vilket resulterar i en hög respons, och ett med hög haptoglobinkoncentration (nederst) vilket resulterar i en mycket låg respons (☾-haptoglobin, ●-hemoglobin, ○-SDS).

Försök med en direkt metod där hemoglobin binds in på sensorytan har gjorts men det har visat sig svårt att få haptoglobin att binda till denna yta (Åkerstedt et al., 2005), troligtvis p.g.a. steriska hinder som en följd av storleken hos den starkt polymeriserade haptoglobinmolekylen.

Immobilisering

Karboxylgrupperna i dextranytan aktiverades genom injicering av 50 μ l NHS/EDC i förhållandet 1:1 (flöde 5 μ l/min). Under aktiveringen bildas NHS-estrar som sedan reagerar med oladdade, primära aminogrupeer i protein och andra molekyler (fig. 5). Haptoglobin (50 μ l, 1mg/ml) blandades med acetatbuffert (50 μ l, 10mM) och pH ställdes till 3,8 med 50 mM HCl. Den isoelektriska punkten (pI) för haptoglobin är 4,1 varför haptoglobin kommer vara positivt laddat vid pH 3,8 och den resulterande elektrostatiske attraktionen till den negativt laddade dextranytan ökar inbindningsgraden. Haptoglobinlösningen (35 μ l) injicerades därefter under 7min (5 μ l/min). Efter haptoglobininjektionen inaktiverades kvarvarande NHS-estergrupper med etanolamin (1M, 5 μ l/min, 7 min) för att undvika ospecifik inbindning av proteiner och molekyler. Immobiliseringsförloppet presenteras i figur 6. Under arbetet användes ytor med immobiliseringsgrad motsvarande en respons på 8000-12000 RU på sensorytan.

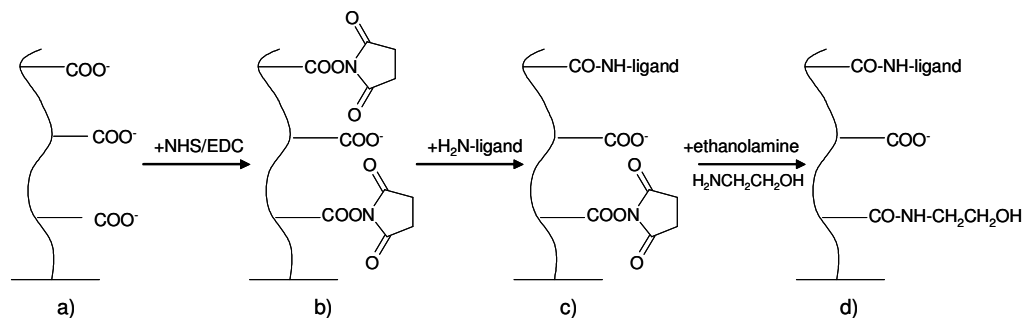


Fig. 5. Immobilisering av ligand på sensorchipet: a) fria karboxylgrupper på dextranet, b) aktivering av karboxylgrupperna genom bildandet av NHS-estrar, c) inbindning av primära aminogrupeer på ligand, d) deaktivering av kvarvarande NHS-estrar med etanolamin (Gustavsson, 2003).

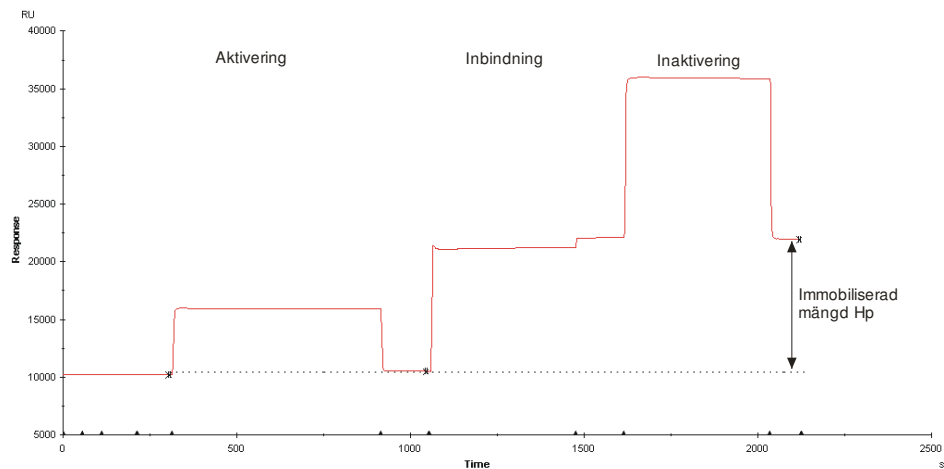


Fig. 6. Immobiliseringsförloppet vid skapande av sensoryta.

Standardkurvor

Standardprover bereddes genom att späda en 1mg/ml stamlösning humant 2-2 haptoglobin till 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, och 0.3125 $\mu\text{g/ml}$ i HBS-P-buffert. Proverna analyserades och resultaten användes för att konstruera en standardkurva.

Analys av serumprover

För att studera inverkan av ospecifik inbindning av komponenter i serat analyserades proverna med ett flertal olika spädningar: 10, 25, 100, 250, 500, 1000, och 2000 ggr spädning i Hbs-P-buffert. Proverna tinades i rumstemperatur, späddes med HBS-P-buffert varefter det spädda provet blandades 1:10 i hemoglobinlösning (1,5 $\mu\text{g/ml}$) innan injicering. Provets kontakttid med sensorytan sattes till 90 sekunder med ett konstant flöde på 30 $\mu\text{l/min}$ (injicerad provvolym 45 μl).

För regenerering d.v.s. rengöringen av ytan användes natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulphate; SDS) som detergent. Detta är ett viktigt steg då otillräcklig regenerering resulterar i en påbyggnad på ytan efter varje cykel, vilket minskar ytans kapacitet och livslängd eftersom antalet fria bindningssites för hemoglobin reduceras. Regenereringen får inte heller vara för hårdhänt då detta skulle kunna denaturera eller bryta ned det på ytan bundna haptoglobinet. Genom att variera koncentrationen SDS och kontakttiden med ytan konstaterades att 3mM SDS i 75 sekunder (flöde: 30 $\mu\text{l/min}$) vara en lämplig regenerering för Biacore 1000, medan det i Biacore Q räckte med 2,1 mM SDS i 75 sekunder (flöde: 30 $\mu\text{l/min}$) för att eliminera påbyggnad på sensorytan.

RESULTAT OCH DISKUSSION

Standardkurvor

Standardkurvan uppvisade ett tydligt linjärt samband i intervallet 0-12,5 μg haptoglobin/ml, se figur 7. Vid resultat från analyser som låg över 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ späddes proverna ytterligare och analyserades om.

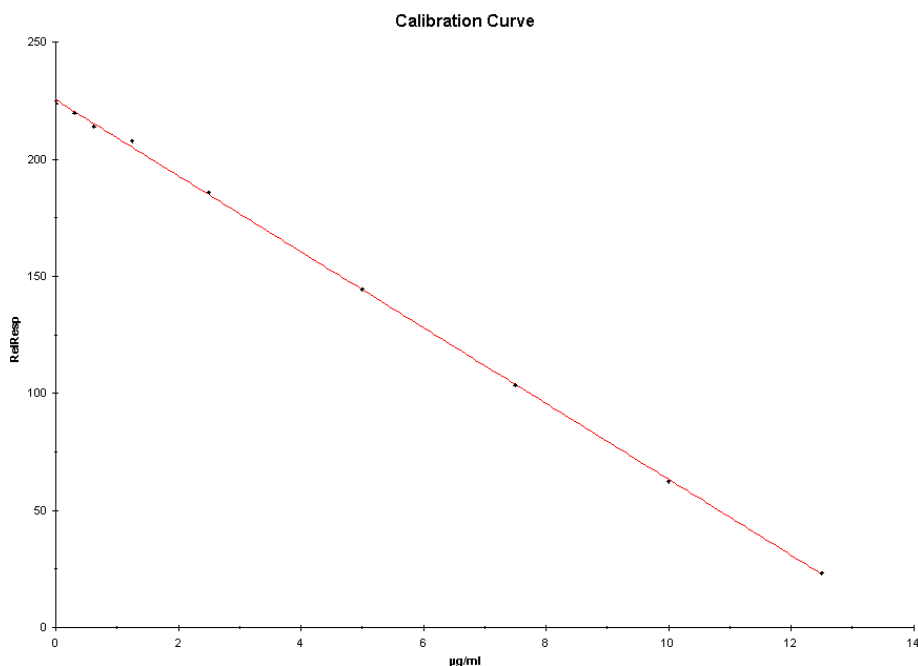


Fig. 7. Standardkurvan uppvisar ett linjärt samband mellan haptoglobinkoncentration och respons i intervallet 0-12,5 μg haptoglobin/ml.

Spädningar

Vid 100 ggr spädning var den ospecifika inbindningen eliminerad, 100 och 250 ggr spädning visade samstämmiga resultat, vid ytterligare spädning blev koncentrationen i de flesta proverna för låga för att detekteras. 100 ggr spädning ansågs därför som en lämplig förstahandsspädning. Gav denna spädning resultat utanför den linjära delen av standardkurva d.v.s. $>12,5\mu\text{g}/\text{ml}$ ($>1250\mu\text{g}/\text{ml}$ i det ospädda provet) späddes provet ytterligare.

Bestämning av detektionsgräns

Metodens detektionsgräns (limit of detection; LOD) beräknades som den lägsta koncentrationen som avviker signifikant (tre standardavvikelser) från medelvärdet för de haptoglobinnegativa serumproverna.

Serumproverna från de tio kalvarna hade tidigare analyserats med PHASE™ RANGE Haptoglobin Assay och funnits ligga under detektionsgränsen ($50\mu\text{g}/\text{ml}$).

Resultaten som erhöjls vid analys med Biacoremetoden gav LOD: 1,4 µg/ml i det spädda provet d.v.s 140µg/ml i sera.

Av de tio serumproverna från korna innan operation, uteslöts fyra då dessa visade sig innehålla förhöjda haptoglobinkoncentrationer redan från början (analyserade med PHASE™ RANGE Haptoglobin Assay). LOD beräknades därefter på kvarvarande sex prover till 0,3 µg/ml i det spädda provet d.v.s. 30 µg/ml i sera.

LOD beräknades för kor och kalvar var för sig då en tydlig skillnad i nollprovernas respons observerades. Denna är troligen beroende av olika effekter från matriserna kalv- respektive koserum.

För att bättre fastställa LOD behövs större serier av nollserum analyseras, vidare bör jämförelser mellan olika åldersgrupper göras, då man måste vara mycket försiktig med att dra slutsatser från endast tio respektive sex prover. Även om den observerade LOD var högre än för den kommersiella metoden p.g.a. behovet av spädning, är en detektionsgräns på exempelvis 140µg/ml tillräcklig för att metoden skall vara användbar, eftersom haptoglobinkoncentrationerna hos djur med inflammatoriska processer ligger avsevärt högre.

Resultat av haptoglobinanalyser

Kalvar

Samtliga nollprover från kalvar som hamnat under LOD för PHASE™ RANGE 1999 gav värden under LOD för Biacoremetoden.

Resultaten för haptoglobinkoncentrationer i prover med förhöjda nivåer, analyserade med Biacoremetoden samt med PHASE™ RANGE var samstämmiga och presenteras i tabell 1.

Tabell 1. Resultat av haptoglobinanalys i kalvsera med Biacoremetod, samt med PHASE™ RANGE Haptoglobin Assay utförd vid provtagning (2000) och vid tillfället för Biacoreanalys (2005).

Prov id	Koncentration haptoglobin (µg/ml)		
	Biacore	PHASE™ RANGE, 2000	PHASE™ RANGE, 2005
13	960	1040	910
14	1010	950	570
15	1190	830	1570
16	1110	1100	1370
17	1110	1050	730
18	1190	1450	1530
19	440	690	480
20	1120	1150	480
21	950	1200	950
24	280	500	520

Kor

Haptoglobinkoncentrationerna i serum från de opererade korna var genomgående lägre i Biacoremetoden jämfört med PHASE™ RANGE (tabell 2). Detta skulle kunna förklaras av fritt hemoglobin i sera som en följd av hemolys i koagel och hematom. Misstanken stärks ytterligare av det faktum att de kor som efter operationen låg under LOD för Biacoremetoden gav en högre respons än blankproverna, d.v.s responsen var högre än den som kunde erhållas av endast det tillsatta hemoglobinet.

Tabell 2. Resultat vid analys av haptoglobin i koser med Biacoremetod och PHASE™ RANGE före och efter operation.

Prov id	Koncentration haptoglobin (µg/ml)			
	Före operation		Efter operation	
	Biacore	PHASE™ RANGE	Biacore	PHASE™ RANGE
742	<LOD	<LOD	280	550
799	<LOD	100	780	1120
861	<LOD	110	330	590
891	<LOD	60	410	800
897	<LOD	<LOD	<LOD	250
1062	<LOD	<LOD	230	880
1066	470	510	340	510
1106	<LOD	<LOD	<LOD	590
1171	<LOD	<LOD	<LOD	180
1191	<LOD	<LOD	220	410

Metodjämförelse av biosensormetoden vs Phaserange

En jämförelse av resultaten som erhölls från Biacoremetoden och PHASE™ RANGE har gjorts med Bland-Altman-plot, varvid medelvärdet av koncentrationerna som observerades med de båda metoderna beräknas och plottas mot differensen mellan metoderna. Om analysmetoderna ger likvärdiga resultat erhålls en plot där punkterna ligger spridda utefter x-axeln.

I figur 8 jämförs Biacoremetoden med PHASE™ RANGE utförd 2005, avseende kalvserum med förhöjd haptoglobinkoncentration. Även om värdena skiljer sig något åt från prov till prov kan ingen tydlig trend ses där resultaten från de olika metoderna divergerar åt ett visst håll.

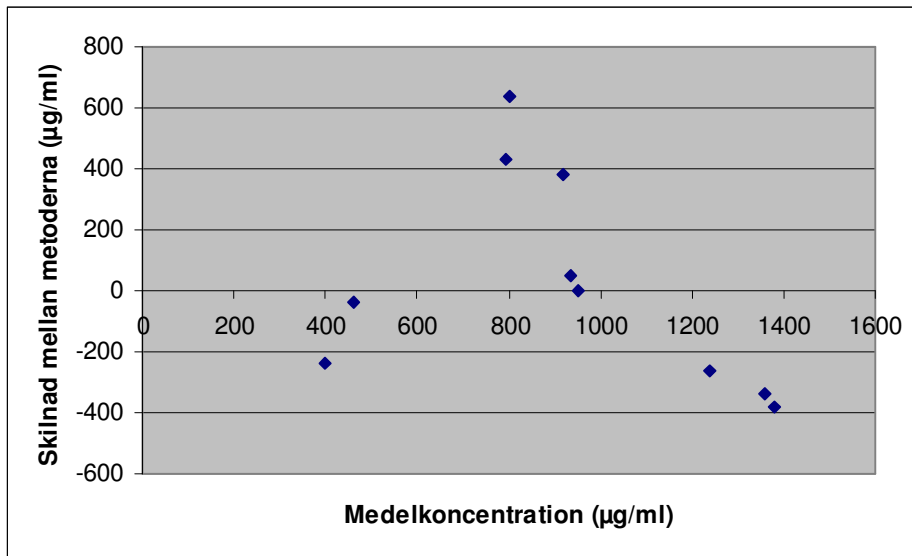


Fig. 8. Bland-Altman-plot för jämförelse av resultaten av haptoglobinkoncentrationsanalys i kalvserum med Biacoremetoden och PHASE™ RANGE.

Analyserna av prover från kor efter operation resulterar däremot i en plot där samtliga punkter är negativa (fig. 9), d.v.s Biacoremetoden ger en genomgående och tillsynes tilltagande underskattning av koncentrationen jämfört med PHASE™ RANGE. Som tidigare nämnts är hemolys till följd av blödning och hematom en trolig orsak till denna underskattning, liknande erfarenheter har gjorts av Åkerstedt et al. (2005) vid analys av mjölk från kor med kraftigt förhöjda celltal.

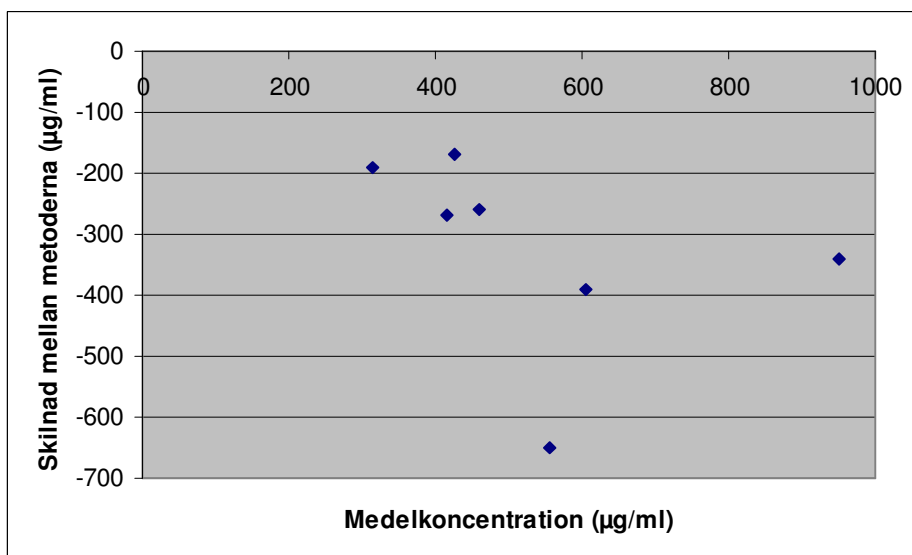


Fig. 9.. Bland-Altman-plot för jämförelse av resultaten av haptoglobinkoncentrationsanalys i koserum med Biacoremetoden och PHASE™ RANGE.

Slutsatser

Biacoremetoden har visat sig ge relativt samstämmiga resultat med PHASE™ RANGE; något som talar för metodens användbarhet. Dock behöver många fler prover analyseras både för att bättre utvärdera metoden samt för att få en korrekt bestämning av LOD. En stor fördel med metoden är möjligheten till övervakning i realtid av analysförloppet, något andra metoder inte kan erbjuda. Biacoremetoden öppnar upp för analys av stora provserier tack vare möjligheten till automatisering, något som gör metoden användbar som rutinanalys som hjälp vid ställande av prognos, övervakning av hälsoläge i besättningar och kanske även som ett hjälpmedel på slakterier.

Metodens stora nackdel är dess känslighet för fritt hemoglobin i proverna. I och med att bovint haptoglobin nyligen blivit tillgängligt är förhoppningen att kunna ta fram specifika antikroppar riktade mot proteinet. På så sätt skulle man eventuellt kunna utveckla en direkt metod där antikroppar mot det bovina haptoglobinet fästs på sensorytan, resulterande i en metod med förhoppningsvis ännu större specificitet och känslighet i analysen.

TACK

Ett stort tack till Åse Sternesjö, Lotta Wall och Maria Åkerstedt för stort engagemang. De har alltid haft en stund över för mig att dryfta stort och smått, arbete och (kanske framförallt) oväsentligheter. Ni har gjort detta till en tid att minnas.

Tack också till Stefan Alenius för hjälp med allt administrativt arbete kring examensarbete och fördjupningskurser.

REFERENSER

Arredouani, M., Matthijs, P., van Hoeyveld, E., Kasran, A., Baumann, H., Ceuppens, J.L. och Stevens, E., 2003. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 108, 144-151.

Cid, M.C., Grant, D.S., Hoffman, G.S., Auerbach, R., Fauci, A.S. och Kleinman, H.K., 1993. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *The Journal of Clinical Investigation* 91(3), 977-985.

Conner, J.G., Eckersall, P.D., Doherty, M. och Douglas, T.A., 1986. Acute phase response and mastitis in the cow. *Research in Veterinary Science* 41, 126-128.

Deignan, T., Alwan, A., Kelly, J., McNair, J., Warren, J. och O'Farrelly, C., 2000. Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced *Salmonella* infection in calves. *Research in Veterinary Science* 69, 153-158.

Eckersall, P.D. och Conner, J.G., 1990. Plasma haptoglobin in cattle (*Bos Taurus*) exists as polymers in association with albumin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96B(2), 309-314.

Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M. och Fitzpatrick, J.L., 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *The Veterinary Record* 148, 35-41.

Gruys, E., van Ederen, A.M., Alsemgeest, S.P.M., Kalsbeek, H.C. och Wensing, T., 1993. Acute phase protein values in blood of cattle as indicator of animals with pathological processes. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 44, 107-111.

Gustavsson, E., 2003. SPR biosensor analysis of β -lactam antibiotics in milk. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria* 394.

Gutteridge, J.M.C. och Smith, A., 1988. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochemical Journal* 256, 861-865.

Gånheim, C., Hultén, C., Carlsson, U., Kindahl, H., Niskanen, R. och Waller, K.P., 2003. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Veterinary Medicine* 50, 183-190.

Heegaard, P.M.H., Godson, D.L., Toussaint, M.J.M., Tørnehøj, K., Larsen, L.E., Viuff, B. och Rønsholt, L., 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 77, 151-159.

Heilskov Graversen, J., Madsen, M. och Moestrup, S.K., 2002. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 309-314.

- van den Heuvel, M.M., Tensen, C.P., van As, J.H., van den Berg, T.K., Fluitsma, D.M., Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Droste, A., van Gaalen, F.A., Sorg, C., Hogger, P. och Beelen, R.H., 1999. Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signalling and activation. *Journal of Leukocyte Biology* 66(5), 858-866.
- Hiss, S., Mielenz, M., Bruckmaier, R.M. och Sauerwein, H., 2004. Haptoglobin concentrations in blood and milk after Endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *Journal of Dairy Science* 87, 3778-3784.
- Horagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horagoda, A., Edwards, S.E.R. och Eckersall, P.D., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *The Veterinary Record* 144, 437-441.
- Humblet, M.F., Coghe, J., Lekeux, P. och Godeau, J.M., 2004. Acute phase proteins assessment for an early selection of treatment in growing calves suffering from bronchopneumonia under field conditions. *Research in Veterinary Science* 77, 41-47.
- Högger, P., Dreier, J., Droste, A., Buck, F. och Sorg, C., 1998. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *The Journal of Immunology* 161(4), 1883-1890.
- Jacobsen, S., Andersen, P.H., Toelboell, T. och Heegaard, P.M.H., 2004. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide induced bovine acute phase protein response. *Journal of Dairy Science* 87(10), 3330-3339.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H-J., Law, S.K.A. och Moestrup, S.K., 2001. Identification of the haemoglobin scavenging receptor. *Nature* 409, 198-201.
- Langlois, M.R. och Delanghe, J.R., 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical chemistry* 42(10), 1589-1600.
- Morimatsu, M., Syuto, B., Shimada, N., Fujinaga, T., Yamamoto, S., Saito, M. och Naiki, M., 1991. Isolation and characterisation of bovine haptoglobin from acute phase sera. *The Journal of Biological Chemistry* 266(18), 11833-11837.
- Murata, H., Shimada, N. och Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnostics: an overview. *The Veterinary Journal* Jul;168(1), 28-40
- Nielsen, B.H., Jacobsen, S., Andersen, P.H., Niewold, T.A. och Heegaard, P.M.H., 2004. Acute phase protein concentration in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extra mammary inflammatory conditions. *The Veterinary Record* 154, 361-365.
- Okazaki, T., Yanagisawa, Y. och Nagai, T. 1997. Analysis of the affinity of each haptoglobin polymer for haemoglobin by two-dimensional affinity electrophoresis. *Clinica Chimica Acta* 258, 137-144.

Petersen, H.H., Nielsen, J.P. och Heegard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.

Singh, S.V. och Pachauri S.P., 2002. Acute phase proteins in bovine mastitis. *Indian Journal of Animal Sciences* 72(1), 20-22.

Van Vlierberghe, H., Langlois, M. och Delanghe, J., 2004. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clinica Chimica Acta* 345, 35-42.

Yoshioka, M., Watanabe, A., Shimada, N., Murata, H., Yokomizo, Y. och Nakajima, Y., 2002. Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 425-433.

Åkerstedt, M., Björck, L., Persson-Waller, K. och Sternesjö, Å., 2005. Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. Accepted for publication in *Journal of Dairy Research*.