



ARBEIDSNOTAT

Fast-fase ekstraksjon (SPE) av humant plasma - prøveopparbeidelse forut for kvantifisering av oxytocin med ELISA

Håvard Jakobsen



Fast-fase ekstraksjon (SPE) av humant plasma - prøveopparbeidelse forut for kvantifisering av oxytocin med ELISA

Håvard Jakobsen

Høgskolen i Nord-Trøndelag
Arbeidsnotat nr 259
ISBN 978-82-7456-705-4
ISSN 1501-6285
Steinkjer 2014



Sammendrag

Målet med prosjektet var å etablere en metode for analyse av oxytocin (OT) i humant plasma. Oxytocin har vist seg å ha en sentral rolle i en rekke endokrinologiske prosesser, og påvirker blant annet følelsen av lykke og velvære. Av den grunn er det interessant å undersøke om subjektivt rapportert trivsel og livskvalitet i en spesifikk gruppe av befolkningen, gjerne basert på data fra helseundersøkelsen i Nord-Trøndelag (HUNT), også kan sees som økning i OT i plasma. Mengde OT i plasma blir vanligvis målt med ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA er en immunologisk metode der man benytter spesifikke antistoffer mot ulike typer molekyler, deriblant peptider som OT, for å bestemme konsentrasjonen av disse molekylene i en biologisk prøve. Før man kan måle mengde hormon i plasma er man derimot avhengig av riktig prøveopparbeidelse, eksempelvis filtrering, ekstraksjon, separasjon og homogenisering [1]. Nyere studier viser at fast-fase ekstraksjon (SPE) av plasma er nødvendig for å få pålitelige resultater når man skal kvantifisere peptidhormoner i plasma [2,3]. I dette prosjektet ble plasmaprøver fra ansatte på HiNT avd. helsefag i Namsos benyttet for å teste ut og evaluere tre ulike SPE-metoder. Etter prøveopparbeidelsen ble det gjennomført ELISA-målinger på SPE-behandlede plasmaprøver ved å benytte ferdig utviklede ELISA sett. Da disse settene er forholdsvis kostbare ble det til slutt undersøkt om det ville være hensiktsmessig å utvikle en egen ELISA-test for måling av OT i serumprøver for bruk i eventuelle fremtidige studier.

Av de tre ulike SPE metodene som ble testet ut, viste kun en av dem tilfredsstillende gjenvinnelse. Denne metoden ble derfor valgt for videre undersøkelser, der innledende funn ble bekreftet. Ferdigkjøpte ELISA sett fungerte utmerket godt under målingene. Det ble vurdert som arbeidskrevende og ulønnsom å utvikle egne metoder da det ofte er utfordrende å etablere målemetoder som både er sensitive og spesifikke nok.

Resultatene fra dette prosjektet viser at vi nå har tilgang på et verktøy som kan benyttes i studier der man vil se om helsefremmende og trivselsfremmende faktorer også kan måles som økt eller redusert mengde signalmolekyler i biologiske prøver. Dette vil være med på å styrke forskningsresultater og anbefalinger om tiltak som kan stimulere til bedre folkehelse.

Håvard Jakobsen

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	1
Innholdsfortegnelse	2
Teori.....	3
Oxytocin:.....	3
Prøveopparbeidelse:	4
Metode.....	6
Prøvetaking:.....	6
Prøveopparbeidelse:	6
Tilførsel av ekstra OT og beregning av gjenvinnelsesandel:	6
ELISA:	7
Statistisk analyse:	7
Resultater	8
Diskusjon og konklusjon	10
Referanser	12
Vedlegg 1 - SPE protokoll	13
SPE-metode 1:	13
SPE-metode 2:	14
SPE-metode 3:	15
Vedlegg 2 - OT-ELISA PROTOKOLL.....	16

Teori

Oxytocin:

Oxytocin (OT) er et peptidhormon på 9 aminosyrer (nonapeptid) som dannes av nevroendokrine celler i hypothalamus. Fra hypothalamus transporteres OT til hypofysens baklapp for lagring, og under denne transporten er OT bundet til proteinet neurofysin. Når OT frigjøres fra hypofysens baklapp til sirkulasjonen brytes bindingen til neurofysin, slik at peptidet opptrer i fri form i sirkulasjonen. I plasma brytes peptidet meget raskt ned og har en halveringstid på kun 3-5 minutter [4]. Alternativt transporteres OT fra hypofysens bakklapp tilbake til hypothalamus, eller til andre deler av hjernen, som for eksempel amygdala, hippocampus og nucleus accumbens, og virker inn på celler i disse områdene i hjernen [4-6].

OT er kanskje best kjent for sin virkning på glatte muskelceller i uterus og på glatte muskelceller som omgir melkekjertlenes alveoler og utførselsganger, og er av den grunn et neuropeptid som spiller en sentral rolle under fødsel og amming. Hormonet er også kjent for å ha en innvirkning på seksualdrift, og er derfor ofte omtalt som "kjærlighetshormonet". I de senere år har det blitt klart at OT også har en sentral rolle i regulering av en rekke mentale prosesser hos både dyr og mennesker. Det har blant annet vist seg at OT påvirker et individs følelse av velvære, et begrep som ofte defineres som fravær av mental og fysisk sykdom og som gir utslag i positive følelser og tilfredshet. Å ha tillitt til andre mennesker, å ha et sterkt sosialt nettverk og ha evnen til å knytte seg til og omgås andre mennesker, er alle faktorer som bygger opp under velvære. I motsetning er frykt, engstelse, depresjoner, mangel på sosialt nettverk, i tillegg til en rekke fysiologiske parametere (eksempelvis høyt blodtrykk og høyt nivå av stresshormoner) faktorer som anses som ugunstige for fysisk og psykisk velvære [7].

Flere studier har vist at OT reduserer fryktfølelse i dyr [8], og disse resultatene sammenfaller med resultater fra studier som viser at OT kan modulere stressreaksjoner og frykt hos mennesker [6]. Dyrestudier har vist at administrering av OT reduserer frykt på lik linje med benzodiazepiner, legemidler som ofte er benyttet i behandling av angst [9]. Intranasalt administrert OT fører også til lavere konsentrasjon av det stress-induserte hormonet kortikosteron i blodet [10]. Oxytoxins rolle i modulering av stress og frykt har også blitt observert som reduksjon i blodtrykk [11], lavere kortisolnivå, samt en økning i endogene opioider [7]. Man antar at OT's fryktreduserende effekt skyldes binding til spesifikke reseptorer i amygdala [6]. Amygdala er en mandellignende kjertel i tinningslappene som har vist seg å være sentral i formidling og regulering av prosesser som formidler frykt og tillit. Hyperaktivisering av celler i amygdala svekker et individs mentale tilstand og er sett på som et nøkkelsymptom i en rekke nevropsykiatriske sykdommer [7]. Det har vist seg at OT forhindrer hyperaktivisering av OT-sensitive celler i amygdala og dette er antatt å være en virkemekanisme bak OT's rolle som bidragsyter for bedre velvære [12, 13].

Mye tyder som sagt på at OT er involvert i endokrinologiske responser til stress og frykt, og demper disse. Det er derimot viktig å merke seg at somatosensoriske stimuli, eksempelvis varme, berøring, god lukt og musikk, også kan stimulere til OT frigjøring [14]. Dette kan være noe av forklaringen på den positive effekten man ofte ser av alternative behandlingsmetoder (meditering, massasje, og aromaterapi) mot stress og frykt.

Frasch og kolleger oppdaget for en god del år siden at pasienter som lider av alvorlig depresjon har et signifikant lavere OT-nivå i plasma sammenlignet med friske mennesker [15]. I dyremodeller har OT vist seg å virke som et effektivt antidepressiva [16], og det har blitt foreslått at en av virkemekanismene til SSRI-medikamenter er frigjøring av OT [17]. Administrering av OT har også vist seg å stimulere til frigjøring av serotonin i raphe nucleus, området i hjernestammen der hvor SSRI antidepressiva utøver sin effekt [18]. Ammende mødre, særlig de som får tvillinger, gir uttrykk for en høyere grad av velvære og har en lavere frekvens av fødselsdepresjoner en ikke-ammende mødre, noe man blant annet har forklart med at amming stimulerer til produksjon av OT [19].

Mennesket er et sosialt vesen, og det å ha evne til å tilpasse seg miljøet man lever i, og omgås andre mennesker er et tegn på velvære. Studier fra ulike dyremodeller har vist at OT stimulerer til en mer inkluderende og sosial adferd [20, 21]. Basert på disse resultatene finnes det en rekke studier der man har undersøkt effekten av OT på sosialiseringsevne i mennesker: vurdert ut fra oppførsel som blant annet stimulerer økt sjenerøsitet, samarbeid og toleranse. I de fleste studiene har man sett en klar positiv effekt av OT på menneskers sosiale oppførsel, men ikke i alle, slik at resultatene fra disse studiene er noe inkonsistente [22].

Prøveopparbeidelse:

Før man kvantifiserer en analytt ved å benytte analyseteknikker som væskechromatografi (HPLC), gasschromatografi (GC), spektrofotometri og ELISA, må man bearbeide prøven på riktig måte. En slik prøveopparbeidelse innbefatter blant annet filtrering, ekstraksjon, separasjon og homogenisering av materialet. Nyere studier viser at fast-fase ekstraksjon (SPE) av plasma er nødvendig for å få pålitelige resultater når man skal kvantifisere peptidnivå i plasma. Målet med SPE kan sies å være tredelt, da avhengig av utgangsmaterialet som benyttes: Gjøre analytten som skal analyseres tilgjengelig i løsning, fjerne forstyrrende matriks substanser fra prøven og eventuelt oppkonsentrere analytten slik at prøven inneholder analyserbare mengder. Når man skal utvikle eller adaptere SPE metoder er det viktig å tilstrebe at fremgangsmåten er enkel å gjennomføre med få trinn, dette for å få en så rask og kostnadseffektiv metode som mulig. Et viktig kriterium er derimot at metoden gir reproducerbare resultater og at man under prøveopparbeidelsen ikke fjerner/mister deler av analytten [1].

Fast-fase ekstraksjon er en ekstraksjonsteknikk som baserer seg på å skille en eller flere komponenter i to ulike faser, der en fase består av et fast materiale, mens den andre vanligvis er en væske, gass eller emulsjon. Analytten av interesse kan man enten adsorbere til den faste fasen, eller man kan holde den oppløst i væskefasen. Hvis analytten blir adsorbent til den faste

fasen, kan denne så frigjøres selektivt ved å vaske den faste fasen med en der til egnet elusjonsbuffer. Forblir analytten derimot i væskefasen, kan denne hentes ut ved hjelp av fordamping, krystallisering, eller ved kromatografisk separasjon [1].

Det finnes en rekke ulike faste faser som benyttes under SPE, der hver fase innehar en unik selektivitet, noe som gjør det mulig å skreddersy prøveopparbeidelsen. Det finnes både hydrofile og hydrofobe faser, sterke og svake ionepardannere etc. Typiske u-polare faser er C18, C8 og C2 silika-baserte faser. I dette prosjektet benyttet vi en SPE teknikk der analytten (OT) ble adsorbent til en C18 silika fase. Dette er en fase som er mye brukt for å adsorbere analytter med svak hydrofobisitet fra vannholdige løsninger. Etter adsorbering ble OT frigjort fra C18 fasen med en organisk elusjonsbuffer tilsatt små mengder syre som tidligere beskrevet av Szeto et al. [2]. Konsentrasjon av OT ble siden målt på ELISA.

Metode

Prøvetaking:

Blodprøver fra friske voksne ble tatt i EDTA-Vacutainer blodprøveglass (Alere, Oslo, Norge), og prøvene ble plassert umiddelbart på is. Etter sentrifugering ved 1600 x g i 15 min. ved 4⁰C ble plasma isolert fra den sentrifugerte blodprøven med en pasteurpipette. Det ble tilsatt 0,5 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) pr. ml plasma. Plasma ble alikvotert i 2 ml Kryorør og oppbevart ved -70⁰C.

Prøveopparbeidelse:

Nyere studier viser at fastfase ekstraksjon av plasma er nødvendig for å få pålitelige resultater når man skal benytte ELISA for kvantifisering av peptider i plasma [2]. Gjennom ekstraksjon vil man fjerne potensielle forstyrrende molekyler, eksempelvis bulkproteiner og lipider, som kan interferere i ELISA-testen og gi falsk positiv svar. Litteraturen viser at det finnes flere metoder for plasmaekstraksjon som kan benyttes i forkant av en ELISA-test. Den vanligste ekstraksjonsmetoden benytter kommersielt tilgjengelige C18-SEP kolonner [2]. I dette prosjektet ble plasmaprøver blandet med like mengder bindebuffer (1 % trifluoreddiksyre, TFA). Blandingen ble siden plassert på en C18-SEP kolonne (Phenomenex, Torrance, CA) som siden ble skylt med en viss mengde bindebuffer. Siden ble kolonnen vasket med en spesiell elusjonsbuffer som består av 60 % acetonitril (ACN) med eller uten TFA, dette for å frigjøre aktuelle peptider fra kolonnen. Analytten (OT) var nå løst i elusjonsbufferen. Forut for ELISA-testen ble elusjonsbufferen fjernet fra peptidet ved å benytte en CentriVap sentrifugekonsentrator (Labconco, Kansas City, MI), der prøven ble sentrifugert under vakuum i 4 timer ved 45⁰C. Ekstraherte peptider ble lagret på tørrform ved -70⁰C (se vedlegg 1 for detaljert beskrivelse av de tre ulike ekstraksjonsmetodene).

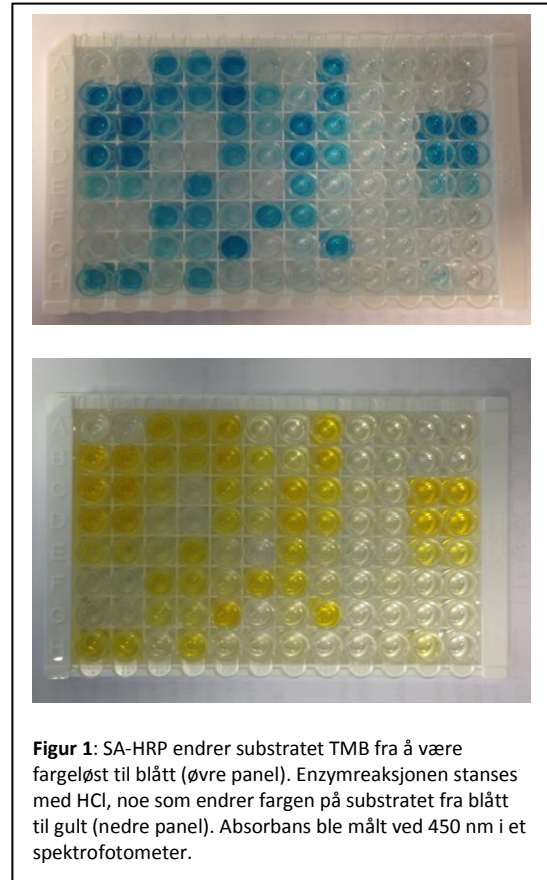
Tilførsel av ekstra OT og beregning av gjenvinnelsesandel:

Renset OT (Phoenix Pharmaceuticals) ble løst opp i sterilt vann og fortynnet ned til en konsentrasjon på 20 pg/ml. Plasmaprøver fra blodgivere (ansatte fra HiNT avd. helsefag, Namsos), samt hormonfritt MSG 4000 plasma (Golden West Biologicals, Temecula, CA), ble tilsatt ulike mengder renset OT for å kartlegge om man eventuelt mister analytten under ekstraksjonsprosessen. Dette ble gjort ved å beregne hvor stor andel av ekstra tilsatt OT man kunne finne igjen i prøven etter gjennomført ekstraksjon. Siden rapporterte OT nivåer i plasma vanligvis ligger mellom 1 til 300 pg/ml [2], ble plasmaprøvene tilsatt henholdsvis 10, 50, 500 og 1000 pg/ml OT. Plasmaprøver uten ekstra OT ble benyttet for sammenligning.

ELISA:

Pellet fra ekstraherte plasmaprøver ble løst opp i 125 µl Assay Buffer (Phoenix Pharmaceuticals). Immunoplater bundet med sekundært antistoff, som binder seg til Fc-fragmentet til det OT-spesifikke primære antistoffet, ble benyttet (Phoenix Pharmaceuticals). Fab-fragmentet til det primære antistoffet vil i løpet av testen binde seg til biotinyleret OT eller til OT i prøvene eller standarden, og disse vil konkurrere om Fab-fragmentet til det primære antistoffet. Biotinyleret OT vil interagere med streptavidin-bundet horseradish peroksidase enzym (SA-HRP). SA-HRP endrer substratet TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) fra fargeløst til gult. Enzymreaksjonen ble stoppet ved å tilsette 2,0 M HCl, og dette endrer gult substrat til blått (se figur 1). Fargeintensiteten på substratet vil være direkte proporsjonalt med mengde biotinyleret OT men omvendt proporsjonalt med mengde OT i standard eller prøver (grunnet konkurransen mellom biotinyleret OT og OT i prøvene). Det ble laget en standardkurve basert på prøver som inneholder kjente konsentrasjoner av OT. Fargeintensiteten (absorbans) ble målt ved 450nm i et M2

Spectramax spektrofotometer (Molecular Devices, Wokingham, England), og OT-konsentrasjonen i de ukjente prøvene beregnet ut fra standardkurven med SoftMax software (Molecular Devices). Alle plasmaprøver, standardfortynninger og positive kontroller ble målt i duplikater. Se forøvrig vedlegg 2 for en detaljert beskrivelse av ELISA-metoden.



Figur 1: SA-HRP endrer substratet TMB fra å være fargeløst til blått (øvre panel). Enzymreaksjonen stanses med HCl, noe som endrer fargen på substratet fra blått til gult (nedre panel). Absorbans ble målt ved 450 nm i et spektrofotometer.

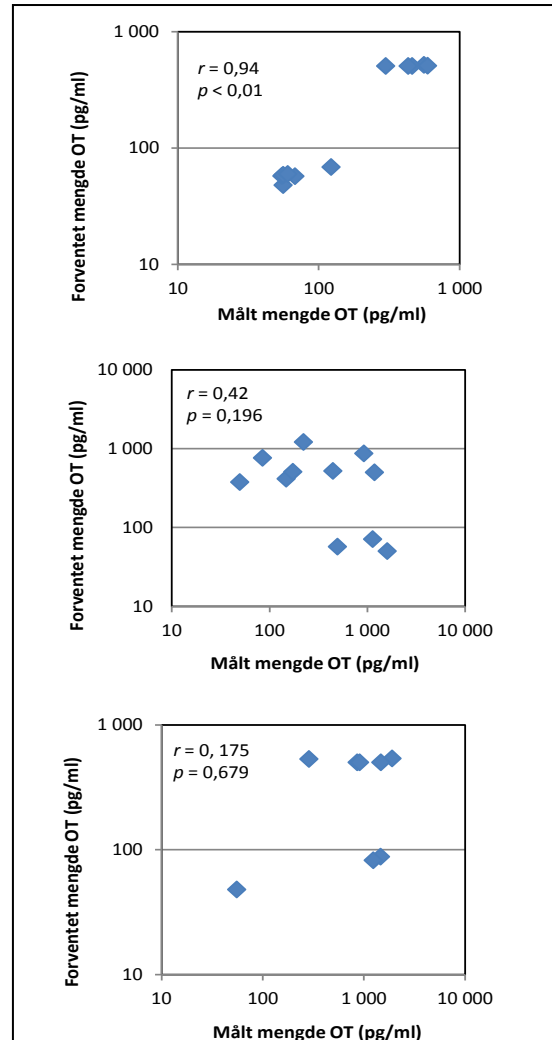
Statistisk analyse:

Data ble analysert med SPSS for Windows (IBM SPSS, Chicago, IL). Resultater fra gjenvinningsforsøk presenteres som gjennomsnitt (standard error av gjennomsnitt (SEM)). Forholdet mellom variabler ble beregnet med Pearsons korrelasjonskoeffisient. $p < 0,05$ ble benyttet som grense for statistisk signifikans.

Resultater

I innledende forsøk ble tre ulike ekstraksjonsmetoder testet (henholdsvis metode 1, 2 og 3 - se vedlegg 1). Det ble her benyttet blodprøver fra 4 blodgivere samt hormonfritt MSG 4000 plasma (Golden West Biologicals). Disse 5 plasmaprøvene ble tilsatt 50 eller 500 pg OT/ml plasma. Plasma uten ekstra tilsatt OT ble benyttet som kontroll. Etter gjennomført ekstraksjon og evaporering ble pelleten løst opp i 125 µl Assaybuffer (Phoenix Pharmaceuticals) og mengde OT målt med ELISA.

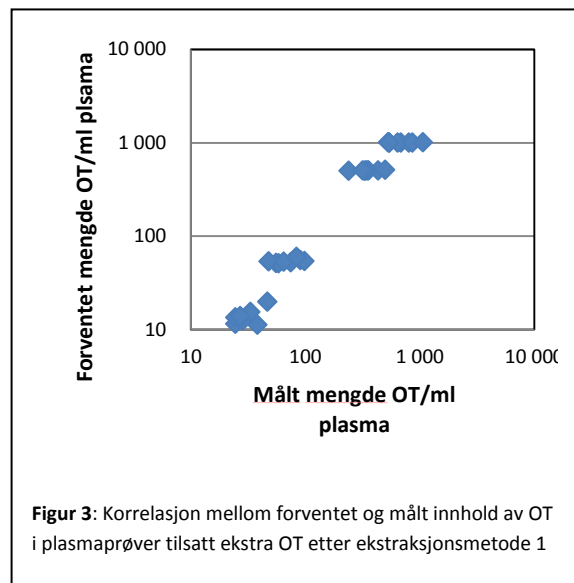
Ekstraksjonsmetode 1 ga en gjennomsnittlig gjenvinning på 105 % (SEM = 10 %), mens metode 2 og 3 ga henholdsvis 668 % (SEM = 369 %) og 661 % (SEM = 259 %) gjenvinning. En signifikant korrelasjon mellom forventet og målt innhold av OT i plasmaprøver tilsatt ekstra OT ble observert etter ekstraksjonsmetode 1 ($r = 0,94$; $p < 0,01$), mens dette ikke var tilfelle for verken metode 2 ($r = -0,42$; $p = 0,196$) eller 3 ($r = 0,175$; $p = 0,679$), se figur 2). Basert på disse innledende resultatene ble det besluttet å jobbe videre med metode 1 for å gjøre en mer detaljert analyse av gjenvinnelsesandel etter denne ekstraksjonsmetoden.



Figur 2: Korrelasjon mellom forventet og målt innhold av OT i plasmaprøver tilsatt ekstra OT etter ekstraksjonsmetode 1 (øverste panel), metode 2 (midterste panel) og metode 3 (nederste panel).

I neste omgang ble 8 nye plasmaprøver fra blodgivere benyttet, og hver blodprøve ble tilsatt 10, 50, 500 eller 1000 pg OT/ml plasma.

Plasmaprøver uten ekstra tilsatt OT ble brukt som kontroll. Etter gjennomført ekstraksjon med metode 1, ble prøven evaporert og pelleten løst opp i 125 µl Assay buffer (Phoenix Pharmaceuticals). Mengde OT ble siden målt med ELISA. Gjenvinnelsesandelen etter tilsetning av henholdsvis 10, 50, 500 og 1000 pg OT/ml plasma ble beregnet til 125 % (SEM = 13 %), med en noe lavere gjenvinning for prøver som ble tilsatt 500 og 1000 pg OT/ml plasma sammenlignet med prøver tilsatt 10 eller 50 pg OT/ml. Som observert i innledende forsøk ble det var det en signifikant korrelasjon i OT innhold etter tilsetning av rensed OT ($r = 0,94$; $p < 0,01$) når ekstraksjonsmetode 1 ble benyttet (figur 3).



Det ble gjennomført et litteratursøk for å vurdere tilgjengelighet og priser på reagenser som kunne blitt benyttet i en eventuelt egenutviklet ELISA metode. Mange av reagensene som benyttes i slike tester må benyttes i kombinasjon med andre reagenser, dette for å ivareta sensitiviteten og spesifisiteten til målemetoden. Det viste seg vanskelig å bedømme om ulike reagenser ville gå overens i en egenutviklet metode. I tillegg var det lite å hente rent prismessig på å utvikle en egen metode kontra det å benytte seg av ferdig utviklede målesett.

Diskusjon og konklusjon

Riktig prøveopparbeidelse er essensielt for flere analyseteknikker (HPLC, GC, spektrofotometri og ELISA) og handler om filtrering, ekstraksjon, separasjon og eventuell homogenisering av prøvematerialet. Nyere studier viser at fastfase ekstraksjon (SPE) av plasma er nødvendig for å få pålitelige resultater når man skal benytte ELISA og HPLC for kvantifisering av peptider i plasma. Litteraturen beskriver en rekke ulike ekstraksjonsmetoder, da metoden må skreddersys for den analytten som skal ekstraheres.

Et av hovedmålene med denne studien var å teste ut og etablere en SPE-metode som ville egne seg for bruk forut for kvantifisering av OT i humane plasmaprøver med ELISA. Basert på informasjon fra ulike leverandører av ekstraksjonskolonner samt metoder publisert i fagfelleverderte artikler, ble tre ulike ekstraksjonsmetoder prøvd ut og sammenlignet. Etter å ha tilsatt ulike mengder rensed OT til et varierende antall plasmaprøver ble det beregnet hvor stor andel av ekstra tilsatt analytt man kunne finne igjen i plasmaprøven etter ekstraksjon. Vi analyserte også korrelasjon mellom innholdet i rene plasmaprøver og innholdet prøver tilsatt ekstra OT, dette for å få en pekepinn på metodens nøyaktighet og reproduserbarhet.

Resultatene viste at ekstraksjonsmetode 1 ga en gjenvinnelse på rundt 100% og det var en signifikant korrelasjon mellom OT-innholdet i rent plasma og prøver tilsatt ekstra OT. Ekstraksjonsmetodene 2 og 3 ga derimot en gjenvinnelse på over 600 %, men her var det ingen tegn til korrelasjon mellom OT-innholdet i rene plasmaprøver og prøver tilsatt ulike mengder ekstra OT. Metode 2 og 3 ble derfor forkastet, og metode 1 ble prøvd ut i ytterligere forsøk, med samme resultat som tidligere. Det ble derfor konkludert med at metode 1 var egnet for ekstraksjon av plasma forut for måling av OT med ELISA.

I dette prosjektet ble det benyttet ferdig utviklede ELISA-sett for å kvantifisere OT i ekstraherte plasmaprøver. En av utfordringene med disse ferdige settene er at de er forholdsvis kostbare. Eksempelvis koster et ELISA-sett, som er tilstrekkelig for måling av ca. 80 serumprøver, rundt 4000 NOK. Dette gir en kostnad pr. serumprøve på ca. 50 NOK. Det ble stilt spørsmål hvorvidt det ville være mulig å anskaffe nødvendige ingredienser for så å utviklet en egen ELISA metode for kvantifisering av OT i plasma, med det som hovedmål å redusere analysekostnadene. Derimot ble det vurdert som uhensiktsmessig og ulønnsomt på nåværende tidspunkt å bruke tid på å utvikle en slik metode. Utfordringen ligger først og fremst å utvikle en metode som er sensitiv nok til å måle lave så lave mengder virkestoff som ofte finnes i biologisk materiale. I tillegg viste det seg ikke særlig kostnadsbesparende da prisen på reagensene i seg selv er høy. Det vil derimot være mer hensiktsmessig å bruke tid på å utvikle metoder basert på væskechromatografi for dette formålet. Denne målemetoden er både mer sensitiv og rimeligere i bruk en ELISA. Et fremtidig mål vil være å utvikle metoder for å kvantifisere peptider i biologiske prøver med væskechromatografi.

Vi har nå etablert en metode for ekstraksjon av humane plasmaprøver som muliggjør måling av OT (og evt. andre peptider) i humant serum med ELISA. Ekstraksjonsmetoden vil også egne seg forut for analyse av andre typer peptider i plasma. Vi har dermed tilgang på et verktøy som kan benyttes i studier der man vil se om helsefremmende / trivselsfremmende faktorer gir utslag i fysiologiske parametere. Dette vil kunne bidra til å styrke forskningsresultater og anbefalinger om tiltak for å styrke/bedre folkehelsen.

Referanser

1. McDonald, P.D and Bouvier, E.S.P. 2001. A sample preparation primer and guide to solid phase extraction methods development. Waters, Massachusetts, USA.
2. Szeto, A., et al., *Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin*. Psychosom Med, 2011. **73**(5): p. 393-400.
3. Pequeux, C., et al., *Novel plasma extraction procedure and development of a specific enzyme-immunoassay of oxytocin: application to clinical and biological investigations of small cell carcinoma of the lung*. Scand J Clin Lab Invest, 2001. **61**(5): p. 407-15.
4. Gimpl, G. and F. Fahrenholz, *The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 629-83.
5. Sand, O., O.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 1 ed 2001, Oslo, Norway: Gyldendal Akademisk.
6. Macdonald, K. and T.M. Macdonald, *The peptide that binds: a systematic review of oxytocin and its prosocial effects in humans*. Harv Rev Psychiatry, 2010. **18**(1): p. 1-21.
7. Ishak, W.W., M. Kahloon, and H. Fakhry, *Oxytocin role in enhancing well-being: a literature review*. J Affect Disord, 2011. **130**(1-2): p. 1-9.
8. McCarthy, M.M., et al., *An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse*. Physiol Behav, 1996. **60**(5): p. 1209-15.
9. Viviani, D., et al., *Oxytocin enhances the inhibitory effects of diazepam in the rat central medial amygdala*. Neuropharmacology, 2010. **58**(1): p. 62-8.
10. Petersson, M., M. Eklund, and K. Uvnas-Moberg, *Oxytocin decreases corticosterone and nociception and increases motor activity in OVX rats*. Maturitas, 2005. **51**(4): p. 426-33.
11. Petersson, M., *Cardiovascular effects of oxytocin*. Prog Brain Res, 2002. **139**: p. 281-8.
12. Huber, D., P. Veinante, and R. Stoop, *Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala*. Science, 2005. **308**(5719): p. 245-8.
13. Veenema, A.H. and I.D. Neumann, *Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours*. Prog Brain Res, 2008. **170**: p. 261-76.
14. Uvnas-Moberg, K. and M. Petersson, *[Oxytocin, a mediator of anti-stress, well-being, social interaction, growth and healing]*. Z Psychosom Med Psychother, 2005. **51**(1): p. 57-80.
15. Frasch, A., et al., *Reduction of plasma oxytocin levels in patients suffering from major depression*. Adv Exp Med Biol, 1995. **395**: p. 257-8.
16. Arletti, R. and A. Bertolini, *Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression*. Life Sci, 1987. **41**(14): p. 1725-30.
17. Uvnas-Moberg, K., et al., *Oxytocin as a possible mediator of SSRI-induced antidepressant effects*. Psychopharmacology (Berl), 1999. **142**(1): p. 95-101.
18. Yoshida, M., et al., *Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice*. J Neurosci, 2009. **29**(7): p. 2259-71.
19. Sibolboro Mezzacappa, E. and J. Endicott, *Parity mediates the association between infant feeding method and maternal depressive symptoms in the postpartum*. Arch Womens Ment Health, 2007. **10**(6): p. 259-66.
20. Ferguson, J.N., et al., *Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse*. J Neurosci, 2001. **21**(20): p. 8278-85.
21. Ferguson, J.N., et al., *Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 284-8.
22. Bartz, J.A., et al., *Social effects of oxytocin in humans: context and person matter*. Trends Cogn Sci, 2011. **15**(7): p. 301-9.

Vedlegg 1 - SPE protokoll

SPE-metode 1:

1. Vask C18-SEP kolonnene med:
 - a. 1 x 3 mL 60 % acetonitrile (ACN) - svakt vakuum i starten, siden uten.
 - b. 2 x 3 mL 1,0 % trifluoreddik syre (TFA)

2. Bland 1,0 mL plasma med 1,0 mL 1,0 % TFA og bland godt på vortex.

3. Plasser prøven på den vaskede C18-SEP kolonnen, og filtrer uten vakuum. Kast filtratet.

4. Vask kolonnen med
 - a. 3 mL 1% TFA
 - b. 2 x 3 mL destillert vann. Kast filtratet.

5. Over før kolonnen til et nytt reagensrør (polystyrenrør)

6. Vask ut antigenet fra C18-SEP kolonnene med 3 mL 60 % ACN

7. Fjern ACN løsningen ved hjelp av en Sentrifuge konsentrator. Evaporer ved 45 grader.

8. Det ekstraherte antigenet kan lagres på "tørrform" ved -20°C, men bør brukes så snart som mulig.

SPE-metode 2:

1. Vask C18-SEP kolonnene med:
 - c. 1 x 3 mL 60 % acetonitrile (ACN) - svakt vakuum i starten, siden uten.
 - d. 2 x 3 mL 1,0 % trifluoreddik syre (TFA)

2. Bland 1,0 mL plasma med 1,0 mL 1,0 % TFA og bland godt på vortex.

3. Plasser prøven på den vaskede C18-SEP kolonnen, og filtrer uten vakuum, kast filtratet.

4. Vask kolonnen med
 - a. 3 mL 1% TFA
 - b. 2 x 3 mL destillert vann. Kast filtratet.

5. Over før kolonnen til et nytt reagensrør (polystyrenrør)

6. Vask ut antigenet fra C18-SEP kolonnene med 3 mL 60 % ACN, 1 % TFA og 39 % dest. vann.

7. Fjern ACN + TFA løsningen ved hjelp av en Sentrifuge konsentrator. Evaporer ved 45 grader.

8. Det ekstraherte antigenet kan lagres på "tørrform" ved -20°C, men bør brukes så snart som mulig.

SPE-metode 3:

Vask C18-SEP kolonnene med:

- a. 1 x 1 mL Buffer B (Phoenix) under svakt vakuum
 - b. 3 x 3 mL Buffer A (Phoenix)
-
2. Bland 1,0 mL plasma med 1,0 mL Buffer A og bland godt på vortex.
 3. Plasser prøven på den vaskede C18-SEP kolonnen, og filtrer uten vakuum. Kast filtratet.
 4. Vask kolonnen med 2 x 3 mL Buffer A. Kast filtratet.
 5. Over før kolonnen til et nytt reagensrør (polystyrenrør)
 6. Vask ut antigenet fra C18-SEP kolonnene med 1 x 3 mL Buffer B.
 7. Fjern Buffer B løsningen ved hjelp av en Sentrifuge konsentrator. Evaporer ved 45 grader
 8. Det ekstraherte antigenet kan lagres på "tørrform" ved -20°C, men bør brukes så snart som mulig.

Vedlegg 2 - OT-ELISA PROTOKOLL

A: Introduksjon:

Denne protokollen baserer seg på kit fra Phoenix Europe GmbH. Immunoplaten er pre-coated med et sekundært antistoff, og alle uspesifikke bindingssteder er blokkerte. Dette sekundære antistoffet binder seg til Fc-fragmentet til det OT-spesifikke primære antistoffet. Fab-fragmentet til det primære antistoffet vil i løpet av testen binde seg til biotinyliert OT eller til OT i prøvene /standarden, og disse vil konkurrere om Fab-fragmentet til det primære antistoffet. Biotinyliert OT vil interagere med streptavidin-bundet horseradish peroksidase enzym (SA-HRP). SA-HRP katalyserer substratet TMB. Fargeintensiteten på substratet vil da være direkte proporsjonalt med mengde biotinyliert OT men omvendt proporsjonalt med mengde OT i standard eller prøver (grunnet konkurransen mellom biotinyliert OT og OT i prøvene). Det blir laget en standardkurve basert på prøver som inneholder kjente konsentrasjoner av OT. OT-konsentrasjonen i de ukjente prøvene bestemmes ved ekstrapolering fra standardkurven.

B: Preparasjon av løsninger:

1. Alle delene i dette settet bør være romtempererte (RT) før bruk (ca. 1 time)
2. Fortynn 50 ml av 20x Assay buffer med 950 ml destillert vann. Hvis det er krystaldannelse i konsentratet, kan man plassere bufferen i et varmebad i ca. 30 min. før man fortynner. Husk risting før bruk.
3. Løs opp standard peptidet med 1.0 ml 1x Assay buffer. Rist godt. Konsentrasjonen av denne løsningen er 1000 ng/ml. La løsningen stå i 15 min for fullstendig oppløsning. Rist godt før bruk.

Lag standardløsninger som følger:

Standard nr.	Std. volum	1x Assay buffer	Konsentrasjon
Stock	1000 µl	-----	1.000 ng / ml
Stock #1	100 µl Stock	900 µl	100 ng / ml
Stock #2	100 µl Stock #1	900 µl	10 ng / ml
Stock #3	100 µl Stock #2	900 µl	1 ng / ml
Stock #4	100 µl Stock #3	900 µl	0,1 ng / ml
Stock #5	100 µl Stock #4	900 µl	0,01 ng / ml

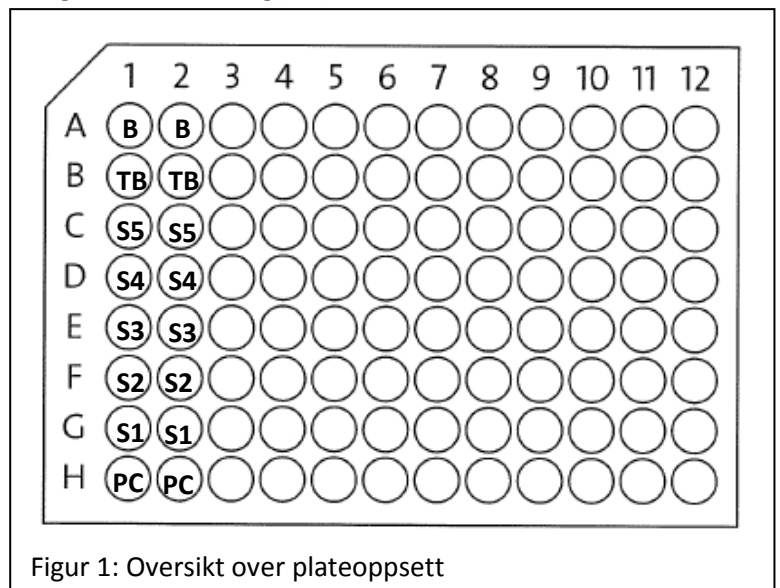
4. Løs opp primært antistoff i 5.0 ml 1x Assay buffer. La løsningen stå i min. 10 min. Rist godt før bruk.
5. Løs opp biotinyliert OT i 5.0 ml 1x Assay buffer. La løsningen stå i min. 10 min. Rist godt før bruk.
6. Sentrifuger og løs opp positiv kontroll med 200 µl 1x Assay buffer. La løsningen stå min. 10 min. Rist godt før bruk.

C: Plateoppsett og inkubasjon

1. Brønn A1 og A2 skal være tomme og fungerer som blank (**B**).
2. Tilsett 50 µl 1x Assay buffer i brønn B1 og B2, total binding (**TB**).
3. Tilsett 50 µl av

standardløsningene #5 til #1 fra C1 og C2 til G1 og G2 (omvendt rekkefølge i forhold til fortynningsfaktor). Standardkurven lages i duplikat.

4. Tilsett 50 µl positiv kontroll i brønn H1 og H2 (**PC**).
5. Tilsett 50 µl av ukjente prøver i de på forhånd definerte brønnene, gjerne i duplikat hvis mulig.
6. Tilsett 25 µl primært antistoff til alle brønnene bortsett fra blank (A1 og A2). Bruk multi-channel pipette.
7. Tilsett 25 µl biotinylerert peptid til hver brønn bortsett fra blank (A1 og A2). Bruk multi-channel pipette.
8. Dekk platen med klebrig film.
9. Inkuber platen i 2 timer ved RT, helst på ristepate.



Figur 1: Oversikt over plateoppsett

D: Konjugat og fremkalling

1. Sentrifuger SA-HRP i en Eppendorf sentrifuge i noen få sekunder. Pipetter 12 µl SA-HRP i 12 ml 1x Assay buffer. Rist godt før bruk.
2. Fjern filmen fra platen. Tøm innholdet og vask platen 4 ganger med 1x Assay buffer. Bank tørr platen mellom hver vask.
3. Tilsett 100 µl SA-HRP til alle brønnene.
4. Sett på ny klebrig film.
5. Inkuber platen i 1 timer ved RT, helst på ristepate.
6. Fjern filmen fra platen. Tøm innholdet i vasken og vask platen 4 ganger med 1 x Assay buffer.
7. Tilsett 100 µl TMB substrat til hver brønn.
8. Sett på ny klebrig film.
9. Inkuber platen i 1 time ved RT, helst på ristepate. Beskytt platen mot sollys.
10. Fjern filmen fra platen.
11. Tilsett 100 µl 2M HCl for å stoppe reaksjonen. Bank forsiktig på platen.
12. La platen hvile i 5 min (maks 20 min).
13. Les av OD ved 450 nm i en mikrotiter plateleser.