

BIOSENSORIEN HYÖDYNTÄMINEN  
BIOLOGISISSA  
VUOROVAIKUTUSTUTKIMUKSISSA

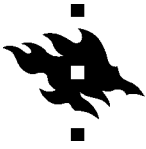
Jirka Burman

Pro Gradu –tutkielma

22.10.2013

Helsingin yliopisto

Analyttisen kemian laboratorio



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Kemian laitos	
Tekijä/Författare – Author  Jirka Burman			
Työn nimi / Arbetets titel – Title  Biosensorien hyödyntäminen biologisissa vuorovaikutustutkimuksissa			
Oppiaine /Läroämne – Subject  Analyttinen kemia			
Työn laji/Arbetets art – Level  Pro gradu –tutkielma		Aika/Datum – Month and year  10/2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages  101
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Uusien mittaustekniikoiden nopea kehittyminen tuo mukanaan yhä paremmat mahdollisuudet tutkia biologisten molekyylien välisiä vuorovaikutuksia. Erityisesti lääkkeiden kehityksessä on ensiarvoisen tärkeää saada tietoa lääkeaineen ja biologisten molekyylien välisistä vuorovaikutuksista, sillä esimerkiksi lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin vaikuttaa merkittävästi lääkeaineen imeytymiseen, leviämiseen, metaboliaan ja eliminaatioon kehossa. Tärkeää on myös saada tietoa proteiini-hiilihydraatti ja vasta-aine-antigeeni vuorovaikutuksista, sillä ne liittyvät biologisiin prosesseihin, kuten hormonien toimintaan ja tunnistamiseen sekä biologisten molekyylien varastointiin. Biologisten molekyylien analytiikka on haastavaa, koska niiden aktiivisuus ja ominaisuudet usein muuttuvat niitä käsiteltäessä. Näistä mainittakoon mm. entsyymien aktiivisuus, joka saattaa kadota ja proteiinien denaturoituminen.</p> <p>Biosensori on analyttinen laite, jossa biologista tai biologisesti johdettua materiaalia on joko sidottu tai kokonaan integroitu fysikaalis-kemialliseen anturiin. Biosensorien kehittämisen tavoitteena on valmistaa systeemejä, joiden avulla voidaan tutkia soluja, solukalvoja ja niiden ympäristöä reaaliajassa. Tarkoitus on saada biologisista prosesseista luotettavaa tietoa, jota hyödynnetään ihmisten hyvinvoinnin parantamiseksi. Biosensorien pitäisi olla edullisia, kestäviä, luotettavia ja lääketieteelliseen tutkimukseen soveltuvia.</p> <p>Tämän pro gradu -tutkielman kirjallisessa osassa tarkastellaan kvartsikidemikrovaan (QCM) hyödyntämistä biosensorina. QCM on laite, joka mittaa elektrodiin liitetyn kvartsikiteen värähtelytaajuutta. Kun sensorin massa muuttuu, myös sen värähtelytaajuus muuttuu. Värähtelytaajuuden muutoksesta voidaan tehdä johtopäätöksiä elektrodin pinnalla tapahtuvista muutoksista. Itsemuodostuvien pintakerrosten (SAM) avulla sensoripintaa voidaan muokata biologisten molekyylien havaitsemiseksi. SAM-pintojen käyttö perustuu kullin ja tioliyhdisteiden väliseen voimakkaaseen ja spontaaniin vuorovaikutukseen. Tioliyhdisteet muodostavat kullin pinnalle tasaisen ja stabiilin molekyylikerroksen. Tämän kerroksen ominaisuuksia muokkaamalla voidaan vaikuttaa pinnan kemiallisiin ja fysikaalisiin ominaisuuksiin. Kirjallisessa osassa käsitellään QCM:n soveltuvuutta biosensoriksi immunoglobuliini E:n ja kloramfenikolin kvantitointiin, R- ja S-enantiomeerien erotukseen, solutukirankaan sitoutuvien lääkeaineiden tutkimiseen sekä seerumin vasta-ainemääritykseen. Tulokset ovat varsin lupaavia, vaikka QCM-laitteiston herkkyyden ei vielä monissa sovelluksissa oikein riittävä kvantitatiiviseen määrittämiseen. Myös sensoripinnan uudelleenkäyttö aiheuttaa vielä ongelmia.</p> <p>Pro gradu -tutkielman kokeellisessa osassa sovellettiin kapillaarielektrokromatografiaa (CEC) matalatiheyksisen lipoproteiinin (LDL) ominaisuuksien tutkimuksiin. CEC:ssä käytettävien 50 µm halkaisijan avoputkisilikapillaarien sisäpinta päällystettiin LDL:llä, joka toimii stationaarifaasina. Kehitetyllä menetelmällä tutkittiin mm. LDL:ssä tapahtuvia muutoksia sokerikäsittelyn ja hapettumisen jälkeen. Tutkimuksissa hyödynnettiin elektro-osmoottista liikkuvuutta pinnassa tapahtuvien muutosten indikaattorina. CEC osoittautui hyväksi tekniikaksi biologisella materiaalilla helposti muokattavien kapillaaripintojen, lyhyiden analyysiaikojen ja vähäisten reagenssi- ja näyttemäärien ansiosta.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords  Kvartsikidemikrovaaka - biosensori - kapillaarielektrokromatografia - SAM			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information  Application of biosensors in biological interaction studies			

## Sisältö

Lyhenneluettelo .....	5
1 Johdanto .....	6
Kirjallinen osa I: Kvartsikidemikrovaaka ja sen sovelluksia biosensorina	
2 Biosensorin määritelmä ja ominaisuudet .....	8
2.1 Sähkökemialliset ja optiset sensorit .....	9
3 Kvartsikidemikrovaaka .....	10
3.1 Kvartsikidemikrovaakan toiminta .....	10
3.2 Pietsosähköinen ilmiö .....	12
3.3 Kvartsikidemateriaali .....	14
3.4 Kvartsikidemikrovaakan mittausominaisuudet .....	14
3.5 Kvartsikidemikrovaakan yhdistäminen pintaplasmaresonanssiin .....	15
3.6 Kvartsikidemikrovaakan hyödyt ja haitat verrattuna pintaplasmaresonanssiin .....	16
4 Kvartsikidesirun pinnoittaminen .....	17
4.1 Itsemuodostuvat pintakerrokset .....	18
4.2 Itsemuodostuvien pintakerrosten valmistamiseen liittyvät tekijät .....	19
4.3 Substraattimetallien vertailu .....	22
4.4 Itsemuodostuvien pintakerrosten virheet .....	23
4.5 Vuorovaikutukset alkaanitioli-pintakerrosten ja proteiinien välillä .....	24
4.5.1 Hydrofobiset vuorovaikutukset .....	24
4.5.2 Sähköstaattiset vuorovaikutukset .....	26
4.5.3 Kovalenttiset vuorovaikutukset .....	27
4.5.4 Kelaatioon perustuvat vuorovaikutukset .....	29
4.5.5 Supramolekulaariset vuorovaikutukset .....	30
4.5.6 Bioaffiniiviset vuorovaikutukset .....	31
4.6 Biomolekyylien kiinnitys sensorisirun pinnalle .....	34
4.7 Itsemuodostuvien pintakerrosten stabiilisuuteen vaikuttavat tekijät .....	37
4.8 Itsemuodostuvien pintakerrosten mahdollisuudet, edut ja rajoitukset .....	38
5 Käytännön sovelluksia, joissa QCM toimii biosensorina .....	39

5.1 Kvartsikidemikrovaan ja pintaplasmaresonanssin vertailu ihmisen immunoglobuliini E:n kvantitoinnissa .....	39
5.2 Kloramfenikolin määrittäminen kvartsikidemikrovaan avulla.....	43
5.3 Kiraalisten enantiomeerien nopea erottaminen kvartsikidemikrovaaka-biosensorilla.....	48
5.4 Kvartsikidemikrovaaka biosensorina solutukirankaan sitoutuvien lääkeaineiden tutkimuksessa .....	50
5.5 Vasta-aine määrittäminen ihmisen seerumista hyödyntämällä QCM- ja SPR-tekniikoita.....	53

## Kokeellinen osa II: Kapillaarielektrokromatografia matalatiheyksisen lipoproteiinin tutkimuksessa

6 Työn tavoite .....	58
7 Tutkitut yhdisteet .....	59
7.1 Lipoproteiinit .....	59
7.1.1 Matalatiheyksiset lipoproteiinit.....	60
7.2 Steroidit.....	61
7.3 Puskuriliuos.....	62
8 Teoria .....	62
8.1 Kapillaarielektroforeesi.....	62
8.1.1 Kapillaarielektrokromatografia .....	65
9 Työssä käytetyt laitteet.....	66
9.1 Kapillaarielektrokromatografia (CEC).....	66
9.2 Reagenssit ja niiden käsittely .....	67
9.2.1 Reagenssit .....	67
9.2.2 LDL:n eristäminen plasmasta .....	67
9.2.3 Sokerikäsitellyn LDL:n eristäminen plasmasta.....	68
9.2.4 Näytteiden valmistaminen.....	68
9.2.5 Puskuriliuoksen valmistaminen.....	69
9.2.6 Lipidien poistoliuoksen valmistaminen .....	69
9.3 Kapillaarin päällystäminen.....	70
9.4 LDL-päällysteen lipidien poisto.....	70
9.5 Lipideistä poistetun kapillaaripinnoitteen käsittely glukoosilla .....	70
9.6 Kapillaaripäällysteen hapettaminen .....	71
9.7 EOF ja retentiotekijän määrittäminen .....	71

10 Kokeellisen työn tulokset ja tulosten tarkastelua.....	72
10.1 Päällistyksen stabiilisuus.....	72
10.2 LDL-päällisteen lipidien poisto.....	73
10.3 LDL:n hapettuminen ja vuorovaikutukset steroidien kanssa .....	76
10.4 Kuparisulfaatin käyttö LDL:n hapettamisessa .....	78
10.5 Hapettuminen eri lämpötiloissa.....	79
10.6 EDTA:n vaikutus .....	80
10.7 LDL-partikkelien sokerikäsittely .....	80
10.8 Sokerikäsittelyn optimointi .....	81
10.9 Lipidien poiston jälkeinen sokerikäsittely.....	84
11 Yhteenveto .....	87
Viiteluettelo .....	89
Liitteet.....	93

## Lyhenneluettelo

CD	Syklodekstriini (cyclodextrine)
DTDPA	3,3-ditiolidipropaanihappo (3,3-dithiodipropionic acid)
EDC	N-etyyli-N-(3-dimetyyliaminopropyli) carbodiimidi (N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (ethylenediaminetetraacetic acid)
FPW	Taivutusaaltolevy-värähtelijä (Flexural-plate-wave resonator)
HBM	Kaksoismembraanihybridi (Hybrid bilayer membrane)
LB	Langmuir-Blodgettin kerrokset (Langmuir-Blodgett films)
MPA	3-merkaptopropaanihappo (3-mercaptopropionic acid)
MUA	11-merkaptoundekaanihappo
NHS	N-hydroksyylisukkinimidi (N-hydroxysuccinimide)
NTA	Nitrilotrietikkahappo (nitrilotriacetic acid)
OEG	Oligoetyleeniglykoli (oligo ethylene glycol)
QCM	Kvartsikidemikrovaaka
QCM-D	Dissipatiivinen QCM
PDMS	Polydimetyylisiloksaani
RQCM	Resistiivinen QCM
SAM	Itsemuodostuva pintakerros (Self assembled monolayer)
SAW	Pinta-akustinen aaltovärähtelijä (Surface-acoustic-wave resonator)
SH-APM	Akustinen aaltoväyleikkaus –värähtelijä (Shear-horizontal-acoustic-plate-mode resonator)
SPR	Pintaplasmaresonanssi (Surface plasmon resonance)
TSM	Tiheysleikkaustila-värähtelijä (Thickness-shear-mode resonator)

# 1 Johdanto

Uusien mittaustekniikoiden kehittyminen tuo mukanaan yhä paremmat mahdollisuudet tutkia biologisten molekyylien välisiä vuorovaikutuksia. Erityisesti lääkkeiden kehityksessä on tärkeää tuntea biologisten molekyylien vuorovaikutukset lääkeaineen kanssa. Tämän tiedon avulla voidaan ottaa huomioon ja pienentää lääkeaineisiin liittyviä riskejä. Esimerkiksi lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin vaikuttaa merkittävästi lääkeaineen imeytymiseen, leviämiseen, metaboliaan ja eliminaatioon.<sup>1</sup> Tärkeää on myös saada tietoa proteiini-hiilihydraatti ja vasta-aine-antigeeni vuorovaikutuksista, sillä nämä liittyvät moniin biologisiin prosesseihin, kuten esimerkiksi hormonien toimintaan ja tunnistamiseen sekä biologisesti aktiivisten molekyylien varastointiin.<sup>2</sup>

Biosensori on analyttinen laite, jossa biologista tai biologisesti johdettua materiaalia on joko sidottu tai kokonaan integroitu fysikaalis-kemialliseen anturiin.<sup>3</sup> Biosensorien kehityksen tavoitteena on valmistaa keinotekoisesti rakenteita, joiden avulla voidaan tutkia soluja, solukalvoja ja niiden ympäristöä reaaliajassa. Tarkoitus on saada luotettavaa tietoa biologisista prosesseista ja hyödyntää tätä tietoa ihmisten hyvinvoinnin parantamiseksi. Biosensorien kehittämisen tavoitteena on valmistaa edullinen, kestävä ja luotettava biosensori esimerkiksi lääketieteelliseen käyttöön.

Tämän pro gradu -tutkielman kirjallisessa osassa tarkastellaan kvartsikidemikrovaakaa (QCM) ja sen sovelluksia biosensorina. QCM-laitteisto tarjoaa hyvät mahdollisuudet biosensorien kehittämiseen helpon muokattavuutensa ansiosta. Erityisesti itsemuodostuvien pintakerrosten (SAM) avulla voidaan valmistaa räätälöityjä rakenteita spesifisiin tarpeisiin. SAM-pintojen ansiosta biologisia molekyyliä voidaan kiinnittää biosensorin pintaan hajottamatta niiden rakennetta tai biologista aktiivisuutta heikentämättä. QCM-laitteiston ja SAM-pintojen avulla saadaan paljon tietoa biologisten molekyylien välisistä vuorovaikutuksista ja niihin liittyvien reaktioiden kinetiikasta.

Tämän tutkielman kokeellisessa osassa käsitellään kapillaarielektrokromatografian (CEC) käyttöä matalatiheyksisen lipoproteiinin (LDL) ominaisuuksien tutkimisessa. Kokeellisessa osuudessa pohditaan myös LDL:n osuutta ateroskleroosin kehittymisessä. CEC-tekniikan avulla voidaan valmistaa kestäviä, biologisesti aktiivisia pintoja ohuiden

(50  $\mu\text{m}$ ) avoputkisolikakapillaarien sisälle. Kokeellisessa osuudessa saatuja tuloksia verrataan myös aikaisempien lipoproteiini-tutkimusten tuloksiin. Sekä QCM- että CEC-tekniikat auttavat kehittämään sovelluksia, joiden avulla ymmärretään enemmän biologisista prosesseista ja voidaan kehittää entistä parempia biosensoreita.



# **Kirjallinen osa I: Kvartsikidemikrovaaka ja sen sovelluksia biosensorina**

## **2 Biosensorin määritelmä ja ominaisuudet**

Biosensori on analyttinen laite, jonka tuottama sähköinen vaste on verrannollinen tutkittavan analyytin konsentraatioon.<sup>3</sup> Spesifisyys halutulle molekyylille saadaan aikaan liittämällä biomolekyylin vastaava entsyymi valmistettavalle pinnalle. Entsyymien toimintaan voi kuitenkin vaikuttaa käytettävä kiinnitysmenetelmä, kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet (pH, lämpötila ja epäpuhtaudet) sekä käytetyn pinnan stabiilisuus. Biosensorin pitäisi pystyä toimimaan luotettavasti biologisen materiaalin, esimerkiksi seerumin, ympäröimänä ilman että sensorin pintaan adsorboituu siihen kuulumatonta materiaalia.<sup>4</sup>

SAM-pintoja hyödyntävät biosensorit voidaan jakaa neljään luokkaan: sähkökemialliset sensorit, optiset sensorit, lämpöön perustuvat sensorit ja massasensorit.<sup>5</sup> Sähkökemialliset sensorit voidaan jakaa vielä toimintansa perusteella alatyyppeihin, joita ovat: potentiometrinen, amperometrinen ja konduktometrinen sensori. Näiden kolmen alatyypin erona on mitattava signaali. Potentiometrisessä sensorissa mitataan jännitteen muutosta, amperometrisessä sensorissa virran muutosta ja konduktometrisessä sensorissa konduktanssin muutosta analyytin konsentraation suhteen. Kulometrinen sensori on sähkökemiallinen sensori, jossa mitataan virran muutosta ajan suhteen. Tällainen mittaus voi antaa arvokasta tietoa aktiivisten hapetus-pelkistysentsyymien ja proteiinien kinetiikasta. Optisia sensoreita on muun muassa pintaplasmaresonanssi (SPR). Kvartsikidemikrovaaka (QCM) kuuluu massasensoreihin.

## 2.1 Sähkökemialliset ja optiset sensorit

SAM-pintoihin perustuvien sähkökemiallisten biosensorien yksi tärkeimmistä ominaisuuksista on niiden stabiilisuus yhdistettynä selektiiviseen elektroni-tunnelointiin. Nämä ovat ne ominaisuudet, jotka tekevät niistä sopivan alustan biomolekulaaristen vuorovaikutusten havainnointiin.<sup>5</sup> Sähköaktiivisia SAM-pinnan pääteryhmiä voidaan käyttää sähköisenä johdotuksena tai kommunikaatioreittinä hapetus-pelkistys -entsyymien ja elektrodipinnan välillä. Elektronin välittäjänä toimivia molekyyliä, mediaattoreja, näille systeemeille ovat muun muassa ferroseeni ja dimetyyliviologiini. Ferroseeniä on käytetty esimerkiksi glukosisensorissa liittämällä se glukosioksidaasi-entsyymiin. Tämä muokattu entsyymi on sitten liitetty kystamiini-muokattuun SAM-pintaan.

Optisista sensoreista käytetyimpiä on pintaplasmaresonanssi (SPR). SPR-laitteella voidaan mitata pintakerrosten paksuutta metallipinnalla. Menetelmä perustuu p-polarisoidun laser-säteen kulmasta riippuvaan heijastumiseen ohuen metallipinnan rajalta (10-50 nm Au tai Ag) ja sen välittömästä läheisyydestä ( $< 1 \mu\text{m}$ ). Heijastuvan säteen muodostama kulma riippuu ratkaisevasti metalli-ilma tai metalli-liuos – rajapinnan taitekertoimesta. Oikeassa kulmassa (resonanssikulma) saapuvan laser-säteen energia virittää pinnan plasmonit resonanssiin, josta seuraa heijastumisen minimi. Tästä voidaan määrittää SAM-kerroksen paksuus kullan tai hopean pinnalla. SPR:ää voidaan käyttää erityisesti suurten molekyylien kuten DNA:n ja proteiinien havaitsemiseen. SPR-tekniikalla voidaan seurata reaaliaikaisesti SAM-pintojen muodostumista ja myös biomolekyylien isäntä-vieras vuorovaikutuksia siihen sopivilla molekyyliellä.<sup>5</sup> SPR-tekniikkaa on käytetty biosensorina muun muassa stafylokokki-bakteerien määrittämisessä.<sup>6</sup>

### 3 Kvartsikidemikrovaaka

Kvartsikidemikrovaaka (QCM) on erittäin herkkä analyysilaitte, jonka avulla voidaan seurata reaaliaikaisesti muun muassa proteiinien, molekyylien ja solujen adsorptiota erilaisille pinnoille.<sup>7</sup> QCM:n toiminta perustuu pietsosähköiseen ilmiöön, jonka toimintaan käytännössä perehtyivät ensimmäisinä Jacques ja Pierre Curie jo vuonna 1880.<sup>8</sup> Tärkeä käänne tapahtui vuonna 1959 kun Sauerbrey osoitti, että kvartsikidevärähtelijän värähtelytaajuuden muutos on suoraan verrannollinen värähtelijän massa.<sup>9</sup> Tämä mahdollisti QCM:n kehityksen kvantitatiiviseksi sensoriksi. Vuoden 1995 jälkeen kehitys on ollut nopeampaa kehittyneiden tekniikoiden ja kaupallistumisen ansiosta. Kvartsikidemikrovaaka ei mittaa pelkästään massaa, vaan sen suurimmat hyödyt perustuvat adsorboituneiden materiaalien viskoelastisten ominaisuuksien havaitsemiseen. QCM:n hyötyjä on muun muassa se, että biomolekyylien sitoutumisreaktioita voidaan seurata helposti ja reaaliajassa ilman merkkiaineita. Tämä vähentää vaarallisten kemikaalien käyttöä, sillä merkkiaineet ovat usein radioaktiivisia. Myös analyysiajat lyhenevät kun esikäsitteily nopeutuu merkittävästi.<sup>10</sup>

#### 3.1 Kvartsikidemikrovaakan toiminta

Kvartsikidemikrovaaka koostuu kvartsikiteestä, siihen kiinnitetyistä elektrodeista, oskillaattorista sekä tietokoneesta. QCM:n sensorina on ohut kvartsikide, joka on asetettu kahden elektrodin väliin. Kun elektrodien välille kytketään vaihtojännite, jonka taajuus vastaa kvartsin ominaisvärähtelytaajuutta, alkaa kvartsikide värähdellä.<sup>7</sup> Kiteen värähtelytaajuus riippuu sen massasta Sauerbrey'n yhtälön (1) mukaisesti.

$$\Delta f = -\frac{1}{C} \times \Delta m \quad (1)$$

Yhtälössä (1)  $\Delta f$  on mitattu taajuuden muutos,  $\Delta m$  kiteen pinnalle adsorboitunut massa ja  $C$  on kvartsin herkkyysvakio (quartz sensitivity constant). Kerroin  $C$  riippuu ainoastaan kvartsikiteen paksuudesta ja sen luontaisista ominaisuuksista. Yllä oleva Sauerbrey'n yhtälö pätee vain jos seuraavat ehdot täyttyvät: adsorboitunut massa on

täydellisesti sitoutuneena elektrodin pinnalle eikä liiku pinnalla, se on elastinen eli energiaa ei häviä värähtelyn aikana, massa muodostaa tasaisen kerroksen, ja että materiaalin akustinen impedanssi vastaa kvartsin vastaavaa arvoa.<sup>11</sup> Sauerbreyn perusyhtälöt pätevät vain siinä teoreettisessa tilanteessa, kun värähtely ei vaimene tai kun se on niin vähäistä, että se voidaan jättää huomiotta. Kuitenkin käytännössä vesifaasimittauksissa muun muassa proteiinit, aminohapot tai elävät solut eivät kuitenkaan käyttäydy kuten elastiset massat. Tämä johtaa siihen että Sauerbreyn yhtälö saattaa antaa tulokseksi liian suuren massan suhteessa värähtelytaajuuden muutokseen.<sup>12</sup>

Kun sensorin pinnalle adsorboituu molekyyliä, muuttuu kiteen taajuus vastaavasti ja se nähdään värähtelytaajuuden muutoksena sensogrammissa. Kvartsikiteen pinnalle voidaan myös tehdä erilaisia pintoja haluttua käyttöä varten. Yleisesti ottaen QCM-sensorit on päällystetty kullalla, koska siihen on helppo sitoa muun muassa biologisia molekyyliä. Kaupallisesti on myös saatavilla erilaisia sensorisiruja (yleensä kultaa), jotka on päällystetty erilaisilla funktionaalisilla ryhmillä. Näitä ovat esimerkiksi piidioksidi, karboksyyli ja biotiini.<sup>13</sup> Kuvassa 1 on esitetty nykyaikainen Attanan QCM-laitteisto ja muutama sensorisiru.



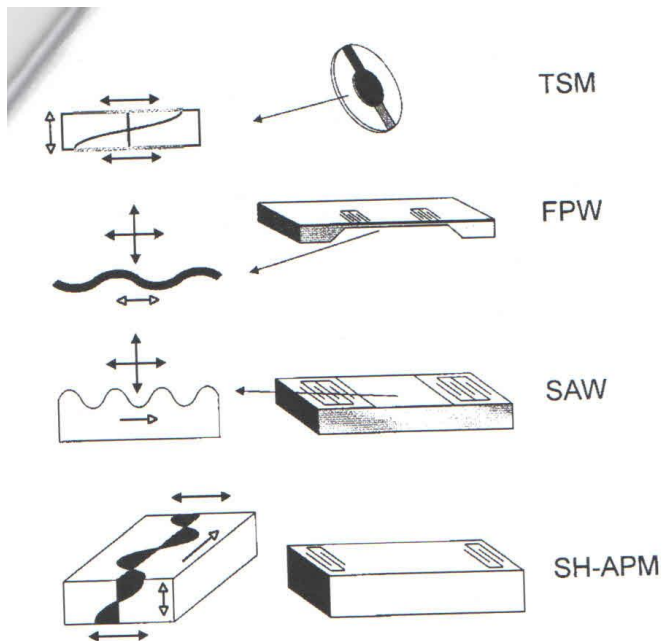
**Kuva 1.** QCM-laitteisto (Attana Cell 200) ja sensorisiruja.<sup>13</sup>

### 3.2 Pietsosähköinen ilmiö

Pietsosähköisessä ilmiössä kiinteän aineen mekaaninen rasitus saa aikaan aineen pinnassa sähköisen polarisaation. Käänteisessä pietsosähköisessä ilmiössä taas vastaavasti saadaan mekaaninen vaikutus aikaan sähkökentän avulla.<sup>14</sup> QCM:ssä hyödynnetään tätä käänteistä ilmiötä ja käytetään nimensä mukaisesti kvartsikidettä pietsosähköisenä materiaalina. Sähkökenttä saa kvartsikiteen värähtelemään. Pietsosähköinen värähtely voidaan jakaa neljään eri luokkaan, joilla on erilaiset ominaisuudet värähtelyn aiheuttaman akustisen aallon etenemisen suhteen. Tiheysleikkaustila-värähtelijää (TSM, engl. thickness-shear-mode resonator) käytetään QCM-tekniikassa. Kolme muuta ovat taivutusaaltolevy-värähtelijä (FPW, engl. flexural-plate-wave resonator), pinta-akustinen aaltovärähtelijä (SAW, engl. surface-acoustic-wave resonator) ja akustinen aaltovyleikkaus –värähtelijä (SH-APM, engl. shear-horizontal-acoustic-plate-mode resonator). TSM-värähtelijällä leikkaussiirtymän amplitudi on kvartsikiteen reunoilla nolla ja keskellä kidettä se saavuttaa maksimin. SAW-värähtelijällä sen pintaan rajoittuvat aallot etenevät yhdistyneinä pitkittäis- ja poikittaissuunnassa. SH-APM –värähtelijässä aallot etenevät värähtelijän yläpinnan ja alemman sivupinnan välillä. SH-APM -värähtelijässä siirtymäkomponentit (engl. displacement components) etenevät aaltojen kanssa samaan suuntaan. FPW-värähtelijä on ohut, suorakaiteen muotoinen piinitridikalvo. FPW-värähtelijällä on symmetrisiä aaltoja ja epäsymmetrisiä aaltoja. Näiden aaltojen nopeus vaihtelee kalvon paksuuden mukaan. Edellä mainittujen värähtelijöiden ominaisuuksia on koottu taulukkoon 1. Kuvassa 2 on havainnollistettu näiden neljän värähtelijän toimintaa.<sup>14</sup>

**Taulukko 1.** Pietsosähköisten värähtelijöiden ominaisuuksia. Taulukossa  $v_p$  on aallon etenemisnopeus,  $d$  värähtelijän pinnan paksuus ja  $\lambda$  aallonpituus.<sup>14</sup>

Värähtelijä	Värähtelijän paksuus $d$	$f$ [MHz]	Esimerkki värähtelijän ominaisuuksista	Lämpötilan kesto	Massaherkkyys $S_m$ [(Hz/Mhz)(ng/cm <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup> ]
TSM	$\lambda/2$	4-30	kvartsi 6 MHz, $d=227 \mu\text{m}$ , $v_p=3330\text{m/s}$ , $\lambda= 554 \mu\text{m}$	Korkea	0,014 (6 MHz)
SAW	$\gg \lambda$	30-500	kvartsi 158 MHz, $d=760 \mu\text{m}$ , $v_p=3160\text{m/s}$ , $\lambda= 20 \mu\text{m}$	Korkea/keskinkertainen	0,20 (158 MHz)
SH-APM	$3-10\lambda$	25-200	kvartsi 101 MHz, $d=203 \mu\text{m}$ , $v_p=5060\text{m/s}$ , $\lambda= 50 \mu\text{m}$	Korkea	0,019 (101 MHz)
FPW	$\ll \lambda/2$	2-7	ZnO 5,5 MHz, $d = 3,5 \mu\text{m}$ , $v_p = 550\text{m/s}$ , $\lambda = 100 \mu\text{m}$	Keskinkertainen	0,38 (5,5 MHz)



**Kuva 2.** Havainnekuva akustisten värähtelijöiden aallon etenemisestä. Umpinaiset nuolet kuvaavat partikkelien kulkeutumista ja avonaiset nuolet aallon etenemissuuntaa.<sup>14</sup>

### 3.3 Kvartsikidemateriaali

QCM käyttöön tarkoitettut kvartsikiteet, joiden paksuus on yleensä muutamia millimetrin kymmenyksiä, leikataan ns. AT-leikkauksella kvartsista. Tässä leikkauksessa leikkauspinta on  $35^{\circ}10'$  kulmassa optiseen pystyakseliin nähden (z-akseli). Tämän leikkauskulman ansiosta kiteen geometria on paras mahdollinen kiteen stabiilille värähtelylle ja lämpötilan vaikutus värähtelyyn on mahdollisimman vähäistä.<sup>15</sup> Kvartsikide on yleensä noin 12 mm halkaisijaltaan, mutta myös isompia kiteitä on saatavilla. Kiteen paksuus määrittää sen resonanssitaajuuden. Mitä ohuempi kide, sitä suurempi taajuus ja suurempi herkkyys. Haittapuolena on se, että ohuet kiteet ovat hyvin hauraita.<sup>15</sup> On olemassa myös muita pietsosähköisiä materiaaleja, mutta kvartsi täyttää hyvin mekaaniset, sähköiset, kemialliset ja stabiilisuusvaatimukset tieteelliseen ja kaupalliseen hyödyntämiseen.<sup>14</sup>

### 3.4 Kvartsikidemikrovaan mittausominaisuudet

Kvartsikidemikrovaan tavallisimmat mittaustekniikat ovat vaimenemis- ja resistanssitekniikat (dissipation-QCM, QCM-D ja resistance-QCM, RQCM).<sup>9</sup> Biologisten molekyylien sitoutumisen epäelastisuus johtaa sensorin värähtelyn vaimenemiseen. Tämän värähtelyn vaimenemisen nopeudesta saadaan tietoa muun muassa molekyylien sitoutumisen kinetiikasta. Värähtelytaajuuden muutosnopeutta voidaan kuvata Q-tekijän avulla (Q-factor). Q-tekijä on kääntäen verrannollinen yhden värähtelysyklin energianmuutokseen. Korkea Q:n arvo kertoo, että värähtelijä menettää vain vähän energiaa ympäristöön ja näin ollen tällaisen laitteen resoluutio on korkea. Q-tekijän käänteisarvo on vaimenemiskerroin D, jonka avulla saadaan tietoa sensoripinnan rakenteellisista tapahtumaketjuista. Vaimenemiskertoimen arvoon päästään myös mittaamalla liikevastuksen määrää. Vaimenemiskertoimen  $D_s$  ja liikeresistanssin  $R_1$  yhteyttä voidaan kuvata seuraavalla yhtälöllä (2).

$$D_s = \frac{R_1}{2\pi f_s L_1} \quad (2)$$

Yhtälöstä nähdään, että vaimeneminen on suoraan verrannollinen liikeresistanssin muutokseen, koska taajuuden suhteellinen muutos  $f_s$  on luokkaa  $10^{-5}$  ja  $L_1$  on verrannollinen taajuuden muutokseen.<sup>9</sup> Vaimenemiskertoimen muutoksen mittaukset vesifaasissa antavat arvokasta tietoa nestefaasin ja kiinteän faasin rajapinnassa tapahtuvista reaktioista ja olosuhteista.<sup>12</sup>

### 3.5 Kvartsikidemikrovaan yhdistäminen pintaplasmaresonanssiin

Pintaplasmaresonanssi (SPR) on tekniikka, jossa voidaan mitata molekyylien sitoutumista metallipintaan reaaliaikaisesti pintamateriaalin taitekertoimen muutosten avulla. Toiminta perustuu lasersäteeseen, joka ammutaan kriittisessä kulmassa prismapintaan. Pintaan sidottu metallipinta ja siihen mahdollisesti sitoutuneet biologiset molekyylit saavat laserin energian pienenemään plasmapisteiden muodostumiseen metallipinnalla. Tämä havaitaan taitekertoimen muutoksena ja sen avulla saadaan tietoa molekyylien sitoutumisesta ja reaktioista ohuen metallifilmin pinnalla.<sup>15</sup> Koska myös QCM-tekniikassa tietoa saadaan reaaliajassa, on nämä tekniikat joissakin tutkimuksissa pyritty yhdistämään.<sup>16</sup> QCM-D -tekniikassa mitataan värähtelyn vaimenemisnopeutta (kappale 3.4). Kun SPR- ja QCM-tekniikat yhdistetään, saadaan QCM-D mittauksilla kvartsikiteen pinnalle sitoutuneen massan kokonaismäärä, josta osa on pintaan sitoutunutta ja osa molekyylien väliin jäänyttä vettä. SPR:n avulla saadaan mitattua biomolekyylien massa suhteessa molekyylien tiheyteen. Näiden tietojen yhdistäminen antaa paremman ja tarkemman kuvan siitä mitä anturin pinnalla todella tapahtuu. Reimhult työryhmineen<sup>16</sup> havaitsi, että vedellä on tärkeä merkitys kvartsikiteen värähtelyn vaimenemisessa. Vettä havaittiin biomolekyylien pinnalle adsorboitumisen lisäksi myös jääneen loukkuun kvartsikiteen pinnalle adsorboituneiden biomolekyylien väliin. Nämä tulokset saatiin yhdistämällä sekä SPR- että QCM-D -mittausten tulokset.



### 3.6 Kvartsikidemikrovaan hyödyt ja haitat verrattuna pintaplasmaresonanssiin

Taulukossa 2 on vertailtu QCM- ja SPR-tekniikoita toisiinsa.<sup>17</sup> QCM-tekniikassa huomioitavia parametreja on enemmän kuin SPR-tekniikassa. Näitä ovat sensoripinnan paksuus, käytettävien liuosten tiheys, viskositeetti, pintajännitys, viskoelastisuus sekä ionivahvuus. SPR:ssä vastaavia parametreja ovat dielektrisyysvakio ja sensoripinnan paksuus. Toisaalta SPR-laitteisto on noin kaksi kertaa kalliimpi kuin QCM-laitteisto.<sup>14</sup> SPR-laitteiston herkkyys on toisaalta myös parempi. Molemmat soveltuvat silti hyvin biosensoreiksi eikä QCM:n huonompi herkkyys välttämättä haittaa termodynaamisten ja kineettisten prosessien tutkimista. Tämä sen takia, ettei alle pikomolaarisista ( $<10^{-12}$  M) pitoisuuksista voi saada termodynaamista tai kineettistä tietoa sensoripinnalla olevan pienen näytemäärän vuoksi. QCM:n miniatyrisointi on myös vaikeampaa kuin SPR:n, koska mittauspinta-ala on paljon suurempi QCM:ssä.<sup>14</sup>

**Taulukko 2.** QCM:n ja SPR:n vertailua. QCM:n sensorisirun ominaistaajuus 20 MHz.<sup>14,17</sup>

Parametri	QCM	SPR
Aaltoyhtälö	Christoffelin yhtälö	Maxwellin yhtälö
Aaltotyyppi	Elastinen leikkausaalto	Pinnan plasmonit
Fysikaaliset perussuureet	Mekaaninen impedanssi	Heijastuskyky
Mittaussuureet	Taajuus, laatutekijä (Q-tekijä), impedanssi	Heijastuskulman minimi
Materiaaliparametrit	Sensoripinnan paksuus, tiheys, viskositeetti, pintajännitys, viskoelastisuus, ionivahvuus	Sensoripinnan paksuus, dielektrisyysvakio
Tunkeutumissyvyys vedessä	126 nm	150 nm ( $\lambda=1300$ nm)
Ionivahvuuden vaikutus	Voidaan jättää huomiotta	Suuri
Mittauspinta-ala	5 mm <sup>2</sup>	0,005 mm <sup>2</sup>
Toteamisraja	10 <sup>-14</sup> mol	10 <sup>-17</sup> mol
Tiheyden herkkyys/proteiini kerros	184 Hz nm <sup>-1</sup>	0,0263° nm <sup>-1</sup>
Mittaussuureen pienin merkitsevä muutos	20-25 Hz	0,005°
Pienin havaittava massa	30 ng, 5 mm <sup>2</sup> alaa kohti	0,5-5 ng, 0,005 mm <sup>2</sup> :n alaa kohti
Herkkyyskalibrointi	Elektrolyysi	-

## 4 Kvartsikidesirun pinnoittaminen

Biologisten molekyylien ja erityisesti proteiinien kiinnittäminen kvartsikidesirun pinnalle on haastavaa, koska kiinnitysprosessissa proteiinien tulisi säilyttää biologinen aktiivisuus ja ominaisuudet. Myös proteiinien epäspesifisen sitoutumisen välttäminen on hyvin tärkeää.<sup>18</sup> Proteiinin tai molekyylin immobilisaatio voidaan määrittellä molekyylien liikkuvuuden vähenemisenä tai sen menettämisenä molekyylin kiinnittyessä pintaan. Tapa, jolla proteiini kiinnitetään pinnalle, määrittää muodostuvan pinnan ominaisuudet. Kiinnittyessä pintaan proteiini voi menettää osan aktiivisuudestaan väärän orientaation tai rakenteellisen muutoksen takia. Tekniikka, jota käytetään proteiinin tai molekyylin kiinnittämiseen täytyy valita käytettävän pinnan ja proteiinin kemiallisten ominaisuuksien perusteella.<sup>19</sup>

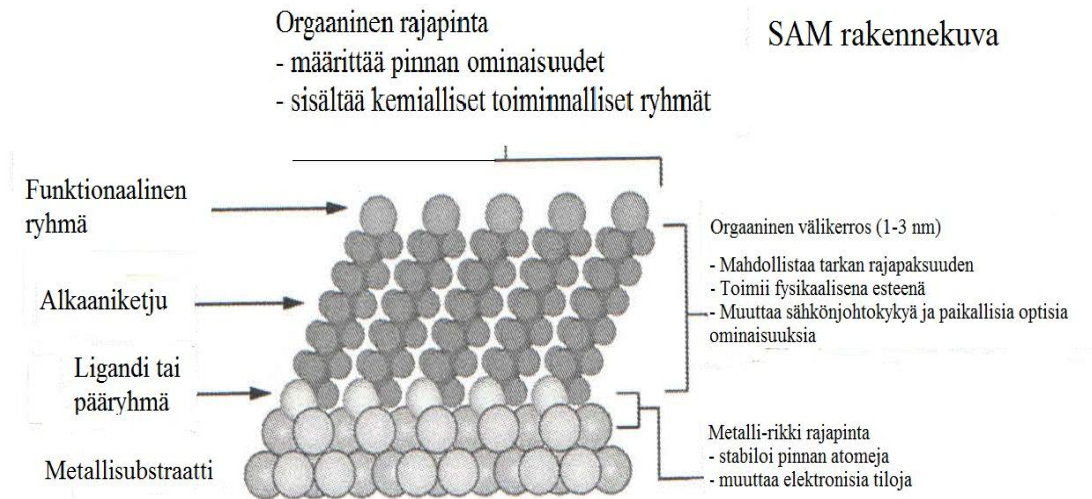
Kiinnitystekniikat perustuvat pääosin kolmeen mekanismityyppiin: fysikaaliseen, kovalenttiseen tai bioaffiniiviseen sitoutumiseen. Fysikaalisessa kiinnityksessä proteiini voi adsorboitua pinnalle molekyylien välisten voimien, esimerkiksi ionisten sidosten, hydrofobisten ja polaaristen vuorovaikutusten kautta. Muodostuva kerros on tässä tapauksessa monesti heterogeeninen ja molekyylien suuntautuminen sattumanvarainen. Kovalenttisessa kiinnityksessä proteiinit sitoutuvat aminohappojen sivuketjujen funktionaalisten ryhmien ja kiinnitettävään pintaan liitettyjen funktionaalisten ryhmien välille. Kovalenttinen sidos on pysyvä ja kiinnityspinnan pintoalue on varsin suuri. Bioaffiniivisessä kiinnityksessä proteiinit sidotaan pintaan ilman proteiinin aktiivisuuden menetystä tai rakenteen hajoamista. Suurin etu tässä tekniikassa on mahdollisuus saman pinnan uudelleenkäyttöön irrottamalla liitetty proteiinikerros pois pinnalta.<sup>19</sup>

Käytetyimpiä tekniikoita biofilmin muodostamiseksi ovat muun muassa itsemuodostuvat pintakerrokset (SAM, self-assembled monolayer) ja Langmuir-Blodgettin kerrokset. Näistä kahdesta yleisimmin käytetty on SAM sen monipuolisuuden ja hyvien ominaisuuksien vuoksi. Langmuir-Blodgettin kerros on huomattavasti vanhempi, vuonna 1917 havaittu ilmiö, jossa amfifiilistä ainetta, esimerkiksi steariinihappoa liuotetaan veteen liukenemattomaan orgaaniseen liuottimeen. Tämän jälkeen seos laitetaan puhtaaseen veteen, jolloin liuotin vähitellen

haihtuu jättäen jälkeensä järjestämättömän kerroksen amfifiilejä. Kun muodostettuun kerrokseen kohdistetaan painetta, saadaan molekyylit järjestyseen järjestyneeksi pintakerrokseksi jota kutsutaan Langmuir-Blodgettin kerrokseksi. Tätä prosessia voidaan toistaa peräkkäin useita kertoja, jolloin saadaan halutun paksuinen kerros muodostettua.<sup>15</sup> Vaikka Langmuir-Blodgettin metodi onkin varsin käyttökelpoinen, sen ongelmaksi muodostuu herkkyys lämpötilalle ja liuottimille. Altistuminen liuottimelle tai nopealle lämpötilan muutokselle aiheuttaa kerroksen kaksiulotteisen rakenteen hajoamisen. Itsemuodostuvien pintakerrosten (SAM) kehittäminen yleistyi vasta 1990-luvulla, kun huomattiin tioliyhdisteiden nopea adsorptio kullan pintaan ja muodostuneen molekyylikerroksen stabiilisuus.<sup>15</sup>

#### **4.1 Itsemuodostuvat pintakerrokset**

Itsemuodostuminen (self-assembly) eli spontaanisti muodostuvat ja järjestyvät atomit ja molekyylit on yksi tärkeimmistä elämän synnyn lähtökohdista luonnossa. SAM on yksi kätevimmistä tavoista muodostaa pinnalle orgaaninen kerros, jolla on halutut ominaisuudet.<sup>20</sup> Itsemuodostuvat pintakerrokset (SAMs) ovat orgaanisista molekyyleistä muodostuvia kerrostumia, jotka muodostuvat liuos- tai kaasufaasissa olevien molekyyliden adsorboituessa ja järjestäytyessä pinnan päälle.<sup>18</sup> Tavallisesti tämän pinnan materiaali on jalometalli, esimerkiksi kulta, hopea, palladium tai kupari. Tutkituin näistä metalleista on kulta ja erityisesti alkaanitiolien adsorptio kullan pintaan. Alkaanitioli-kulta SAM:t muodostavat hyvin järjestyneitä kerroksia. Kulta on myös metallina hyvin inerti, sillä sitä on helppo muokata ja käsitellä sekä mekaanisesti että kemiallisesti. Kullan affiniteetti tioli-yhdisteitä kohtaan on hyvin suuri eikä näiden välillä esiinny mitään epätavallisia ja häiritseviä reaktioita. Erityisesti kullon (111)-muoto muodostaa tioli-yhdisteiden kanssa hyvin tiheitä ja säännöllisiä SAM-pintoja. Kullan tärkeä ominaisuus on myös sen vaarattomuus biologisille komponenteille kuten esimerkiksi soluille. Kulta ei myöskään hapetu tai reagoi helposti kemikaalien kanssa. Kuvassa 3 on esitetty SAM-pinnan rakennekuva.



**Kuva 3.** SAM-pinnan rakennekuva.<sup>21</sup>

## 4.2 Itsemuodostuvien pintakerrosten valmistamiseen liittyvät tekijät

SAM-pintojen valmistaminen on melko yksinkertainen prosessi, josta tässä kappaleessa käydään kemialliset pääkohdat läpi. Koska erilaisia pintoja on valtava määrä, käydään tässä läpi lähinnä alkaanitoliyhdisteiden käyttö SAM-pintojen valmistuksessa. SAM-pintojen käyttö QCM:n sensorin pinnassa on varsin yleistä. Kappaleessa verrataan myös jalometallien ominaisuuksia ja niiden vaikutusta SAM-pinnan valmistamiseen. Organorikkiyhdisteet (tiolit, disulfidit ja sulfidit) adsorboituvat spontaanisti metallisubstraatin (kulta, hopea, palladium, kupari) pintaan neste- tai kaasufaasista.

Yleinen toimintatapa SAM-pintojen valmistamiseksi kullan, hopean, palladiumin tai esimerkiksi kuparin pintaan on upottaa huolellisesti puhdistettu metallisubstraatti laimeaan (n.1-10 mM) alkaanitiolia sisältävään etanoliliuokseen 12-18 tunnin ajaksi huoneenlämpöön.<sup>22</sup> Tämä tekniikka on hyväksi havaittu toistettavuuden ja koostumuksen kannalta. Alkaanitiolit adsorboituvat pintaan jopa millisekunneissa, mutta hidas molekyylien järjestymisprosessi takaa suuren pintatiheyden ja minimoi mahdolliset virheet SAM-pinnassa. Pinnan laatuun ja valmistumisnopeuteen vaikuttavat muun muassa käytetty liuotin, lämpötila, adsorbantin konsentraatio, reaktioaika,

adsorbantin puhtausaste, liuoksen happipitoisuus, metallipinnan puhtaus ja adsorbantin rakenne.<sup>22</sup>

Käytetyin liuotin SAM-pintojen valmistuksessa on etanoli. Muodostuneiden SAM-pintojen laatuun kuten pinnan peittoasteeseen tai kostuvuuteen ei ole havaittu olevan merkittäviä eroja käyttämällä muita liuottimia (tolueeni, syklo-oktaani, asetonitriili, tetrahydrofuraani, dimetyyliformamidi) etanoliiin verrattuna. Etanolilla on muita hyviä puolia, jotka ovat muun muassa kyky liuottaa myös polaarisempia alkaanitiolijohdannaisia, edullisuus, puhtaan liuottimen saatavuus ja myrkyttömyys. Liuottimen vaikutus pinnan muodostumisen kinetiikkaan tai muodostusmekanismiin on huonosti tunnettu. Liuotin aiheuttaa lisäparametreja tioli-adsorption dynaamiseen tasapainoon. Liuotin-substraatti ja liuotin-adsorbaatti vuorovaikutukset mutkistavat prosessin termodynamiikkaa ja kinetiikkaa. Liuotin-substraatti vuorovaikutukset voivat myös häiritä tiolien adsorptiota liuoksesta, koska liuotinmolekyylien täytyy siirtyä pinnalta ennen kuin tiolien adsorptio on mahdollista. Tioliyhdisteitä on liuoksessa huomattavan paljon vähemmän kuin liuotinyhdisteitä, joten liuotinmolekyylit saattavat hidastaa prosessia. Alkaanitioli-SAM-pintojen on eräissä tutkimuksissa havaittu muodostuvan nopeammin poolittomien liuottimien, kuten heptaanin ja heksaanin liuoksessa kuin etanolissa. Vaikka adsorptio tapahtuu nopeammin, on kuitenkin havaittu, että SAM-pinnan järjestäytymisaste on heikompi poolittomien liuottimien kanssa kuin etanolin kanssa. Poolisten liuottimien käytön on havaittu vähentävän joitakin virheitä SAM:n rakenteessa.<sup>23</sup> Tiolit liukenevat huonosti poolisiin liuottimiin, joten tämä yhdessä alhaisen adsorptiolämmön kanssa ”ajavat” tioleita metallin pinnalle. SAM-pintoja voi muodostua myös pinta-aktiivisten aineiden misellejä sisältävästä vesiliuoksesta. Tällöin muodostuneessa pinnassa on usein muutama rakenteellinen virhe ja muutama pistevirhe.<sup>24</sup>

SAM-pintojen muodostaminen yli 25 °C:n lämpötilassa parantaa muodostumisen kinetiikkaa sekä vähentää pintaan syntyvien virheiden määrää. Korkeampi lämpötila kiihdyttää epäedullisen materiaalin ja liuotinmolekyylien desorptiota metallin pinnalta ja helpottaa muun muassa alkaaniketjujen uudelleenjärjestymistä pinnalla. Lämpötilan vaikutus SAM-pinnan muodostumiseen on suurin ensimmäisten minuuttien aikana, jolloin suurin osa adsorptiosta ja uudelleenjärjestymisestä tapahtuu.<sup>22</sup>

Konsentraatio ja reaktioaika ovat kääntäen verrannollisia toisiinsa nähden.<sup>22</sup> Matala liuoksen tiolikonentraatio vaatii siis pitkän reaktioajan. Tyypillinen alkaanitiolien muodostaman SAM-pinnan molekyylien tiheys suurimmalla peittoasteella on luokkaa  $4,5 \times 10^{14}$  molekyyliä neliösentiä kohden. Tästä voidaan päätellä, että tiheän SAM-pinnan muodostamiseen tarvitaan vähintään noin 1  $\mu\text{M}$ :n konsentraatio, joka vastaa noin  $6 \times 10^{14}$  molekyyliä kuutiosenttimetrissä. Käytännössä kuitenkin 1  $\mu\text{M}$ :n tai alle tämän konsentraatiolla ei saavuteta samoja fysikaalisia pinnan ominaisuuksia edes viikon reaktioajalla verrattuna vahvempiin liuoksiin. Myös epäpuhtaudet ja muut mahdolliset rikkiyhdisteet seoksessa voivat vaikeuttaa hyvin laimeiden liuosten käyttöä SAM-pintojen muodostamisessa. Monet spektroskopiset ja kokeelliset todisteet viittaavat siihen, että keskiverto-ominaisuudet 1 mM alkaanitioliliuoksesta muodostetulle SAM-pinnalle eivät muutu merkittävästi 12-18 tunnin käsittelyn jälkeen. Kuitenkin SAM-pinnan rakenne voi muuttua vielä 7-10 päivän reaktioajan jälkeenkin. On havaittu, että reaktioajan kasvaessa pistevirheiden ja konformaationaalisten virheiden määrä alkaaniketjuissa vähenee.<sup>22</sup>

Tioliyhdisteiden tyypillisimpiä epäpuhtauksia ovat niiden hapetustuotteet, disulfidit. On havaittu, että alle 5 % pitoisuudella nämä disulfidit eivät välttämättä heikennä tai muuta SAM:n rakennetta. Disulfidit ovat kuitenkin yleensä huonommin liukenevia kuin tiolit ja tämä pienentynyt liukoisuus voi muuttaa SAM-pinnan fysikaalisia ominaisuuksia. Hapettuneet, polaariset epäpuhtaudet (sulfonaatit) voidaan poistaa suodattamalla tiolit neutraalin ja aktivoitun alumiinioksidin läpi.<sup>20,22</sup>

Hapen vaikutuksesta SAM-pinnan muodostumisnopeuteen tai rakenteeseen ei ole kvantitatiivista tietoa, mutta empiirinen aineisto osoittaa, että liuoksen säilyttäminen ja käyttäminen inertin kaasun alla (esim. argon) parantaa SAM:n ominaisuuksien toistettavuutta. Liuoksen happipitoisuuden pienentäminen rajoittaa tioliyhdisteiden hapettumista sulfonaateiksi ja muiksi hapetustuotteiksi. Happipitoisuuden pienentäminen on tärkeää erityisesti jos käytetään palladiumia, kuparia tai platinaa kullan sijasta. Näillä metalleilla SAM-pinnan rikkijohdokset hapettuvat 1-7 päivässä altistuessaan ilmakehälle.<sup>20,22</sup>

Metallin pinnan tulee olla hyvin puhdas ennen kuin se voidaan upottaa alkaanitioliliuokseen. Epäpuhtaudet voivat vaikuttaa negatiivisesti adsorptioprosessiin

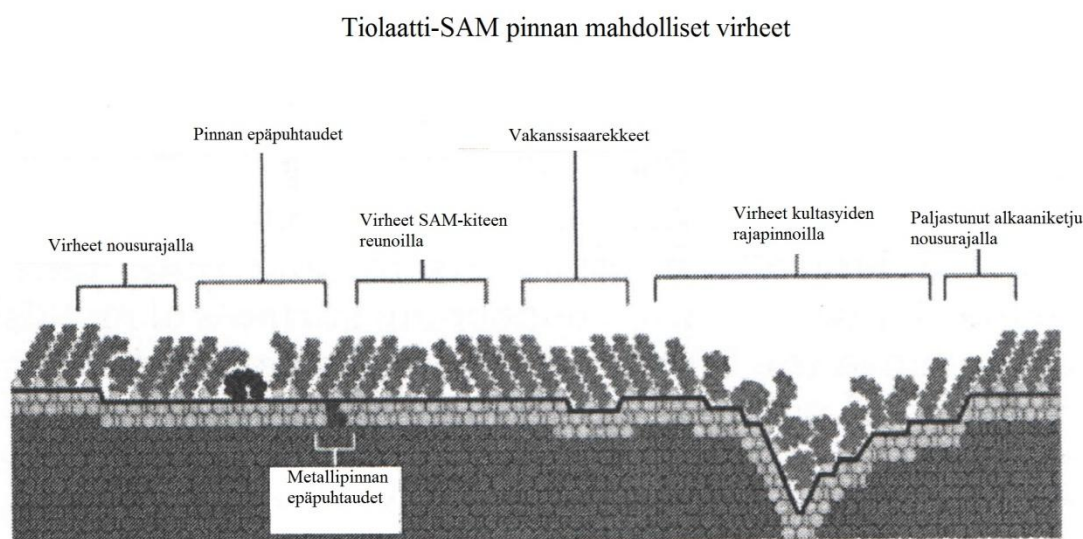
ja sen toistettavuuteen. Epäpuhtauksien poistaminen ja kontaminaation välttäminen tehdään voimakkaasti hapettavilla aineilla (esimerkiksi piranha-liuos,  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ ) tai happiplasman avulla. Pidempiaikainen substraatin säilyttäminen ympäröivissä olosuhteissa saa aikaan vaikeasti poistettavien materiaalien adsorption pinnalle.<sup>20,22</sup>

### 4.3 Substraattimetallien vertailu

Käytetyin ja tutkituin metalli SAM-pintojen valmistamisessa on kulta. Kulta ei muodosta pinnalleen oksidikerrosta, joten alkaanitiolit pystyvät reagoimaan kulta-atomien kanssa saman tien ja helposti. Muilla SAM-pintojen valmistukseen käytetyillä metalleilla kuten hopealla, platinalla ja kuparilla tämä oksidikalvo muodostuu. SAM-pintoja on muodostettu myös galliumarseenin, nikkelin, platinan ja palladiumin pinnoille. Muodostuvien SAM-pintojen rakenne on usein erilainen muilla metalleilla kuin kullalla. Esimerkiksi palladium ja hopea tuottavat rakenteeltaan melko samankaltaisia SAM-pintoja keskenään.<sup>20</sup> Toisaalta palladium-alkaanitioli SAM-pinnat eivät ole niin stabiileja ilmassa verrattuna kultaan ja hopeaan. Palladiumille muodostuvien SAM-pintojen on havaittu myös olevan paksumpia kultaan verrattuna.<sup>25</sup> Nikkelin pintaan muodostuvien SAM-pintojen muodostamisessa ongelmana on nikkelin hapettuminen ja oksidikalvo. Oksidikalvo voidaan poistaa esimerkiksi sähkökemiallisella pelkistyksellä. Toinen ongelma nikkeli-SAM:n valmistuksessa on liuotin, joka ei saa olla pooliton. Reaktioaika on myös pidempi kun SAM-pintoja muodostetaan nikkelin pinnalle.<sup>26</sup> SAM-pintoja on tehty myös platinalle, joskin metallin pinta pitää käsitellä oksidikalvon poistamiseksi esimerkiksi argon-plasmalla. Oksidikalvon paksuus platinan pinnalla on noin 2,4-2,7 nm, ja jos tätä ei poisteta, saadaan hyvin huonolaatuisia SAM-pintoja.<sup>27</sup> Alkaaniketjujen kulma suhteessa metallin pintaan on melko samansuuruinen palladiumin ja platinan välillä, alle  $15^\circ$  pinnan normaaliin nähden.<sup>27</sup> Kulta-SAM pintojen osalta tämä vastaava kulma on noin  $20^\circ$ - $30^\circ$ .

#### 4.4 Itsemuodostuvien pintakerrosten virheet

SAM-pintojen muodostuminen tapahtuu ”itsestään” eli tätä muodostumista säätelee termodynamiikka sekä monimutkaiset kemisorptioprosessit. Vaikka teoriassa SAM-pinnat tarjoavat korkeasti järjestyneen orgaanisen rakenteen, ajatellaan SAM-pintaa käytettäessä rakenteen sisältävän joitakin virheitä. Näiden virheiden syyt ja lähteet voidaan jakaa kahteen päätyyppiin: sisäisiin ja ulkoisiin virheisiin. Ulkoiset tekijät kuten metallipinnan puhtaus, pinnan valmistusprosessi ja adsorbenttiliuosten puhtaus selittävät vain osan virheistä. SAM-pinnat ovat dynaamisia systeemejä, joissa tapahtuu monimutkaisia faasimuutoksia jatkuvasti.<sup>22</sup> Kuvassa 4 on esitetty mahdollisia SAM-pinnan virheitä. Voidaan ajatella, että SAM-pinnan muodostuminen on kemiallista valintaa. Muodostuksen aikana vallitsee termodynaaminen tasapainotila pinnalla olevien adsorbenttien ja vapaana olevien adsorbenttien välillä. Epäpuhtaudet liuottimissa tai reagensseissa voivat monimutkaistaa SAM-pinnan muodostumisen kinetiikkaa ja lopullista rakennetta. Termodynaamisesti ajateltuna SAM-pinnan rakennetta voidaan pitää epävakana.



**Kuva 4.** SAM-pinnan mahdolliset sisäiset ja ulkoiset virheet. Tumma viiva kuvaa metallin ja rikkiatomin välistä kuvitteellista rajapintaa.<sup>22</sup>

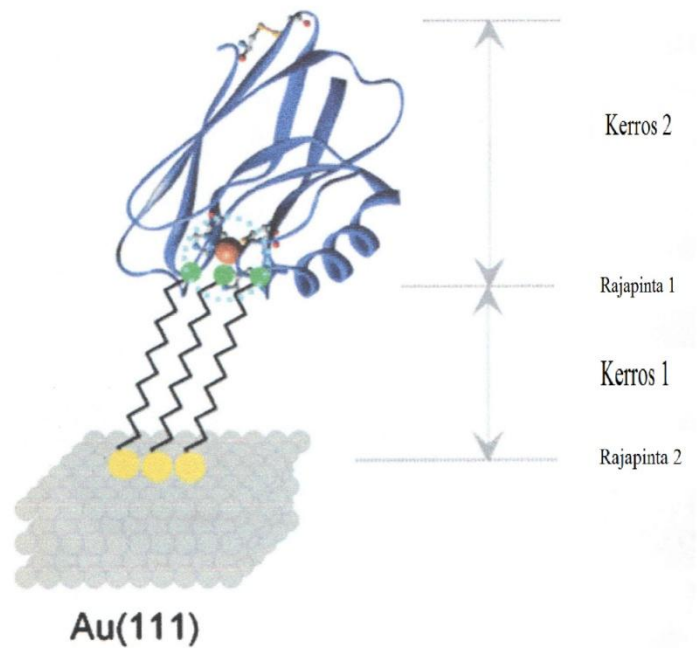


## 4.5 Vuorovaikutukset alkaanitioli-pintakerrosten ja proteiinien välillä

Kappaleessa 4 viitattiin tärkeimpiin vuorovaikutuksiin, jotka vaikuttavat SAM-pintojen, kullan ja kiinnitettävien molekyylien välillä. Tässä kappaleessa vuorovaikutukset käydään tarkemmin läpi erityisesti bioanalyttisten sovellusten näkökulmasta. Kulta-SAM -pinta tarjoaa valtavasti erilaisia mahdollisuuksia pinnan rakenteen ja haluttujen ominaisuuksien suhteen. Alkaanitioli-SAM -pintojen stabiilisuus, yhtenäinen muoto sekä ominaisuuksien helppo muokkaus mahdollistavat näiden pintojen käytön esimerkiksi biosensoreina.<sup>18</sup> Myös ns. yhdistelmä-SAM pinnat (engl. mixed SAMs) ovat osoittautuneet hyödyllisiksi esimerkiksi solujen biologisten ominaisuuksien tutkimuksessa.<sup>28</sup>

### 4.5.1 Hydrofobiset vuorovaikutukset

Joidenkin proteiinien kiinnittyminen alkaanitioli-SAM pinnoille on havaittu tapahtuvan hydrofobisten vuorovaikutusten kautta. Yksi tällainen proteiini on atsuriini (azurin). Atsuriini (14,6 kDa) vastaa elektronisiirrosta monien bakteerien hengityselimissä. Se koostuu kupariatomista, johon on sitoutuneena kaksi histidiiniä, yksi kysteini, yksi metioniini ja yksi glysiini aminohappo. Atsuriinissa tapahtuu yksielektroninen hapetus-pelkistysreaktio,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ja  $\text{Cu}^{\text{I}}$  -hapetustilojen välillä.<sup>29</sup> Kupariatomi on sitoutuneena atsuriinin hapetus-pelkistyskeskukseen. Sitoutuminen SAM-pintaan tapahtuu alkaanitioliketjujen päässä olevien metyyliryhmien sekä kupariatomin ympärillä olevien ryhmien hydrofobisten vuorovaikutusten kautta.<sup>18</sup> Kuvassa 5 on esitetty tämän sitoutumisen havainnekuva.



**Kuva 5.** Atsuriinin sivuketjujen ja metyyliryhmien hydrofobinen vuorovaikutus. Rajapinnalla 1 tapahtuu hydrofobinen vuorovaikutus metyyliryhmien ja alkaanitioliketjujen välillä.<sup>18</sup>

Hydrofobisten vuorovaikutusten kautta voidaan myös liittää alkaanitioli-SAM pinnan päälle toinen fosfolipidikerros. Tästä syntyy ns. kaksoiskerrosmembraani (HBM, hybrid bilayer membrane). Tämän rakenteen avulla voidaan matkia solukalvon kaksoiskerrosrakennetta, jossa keskikerros on hydrofobinen ja päät hydrofiilisiä. Kuva tästä rakenteesta löytyy kappaleesta 4.5.6 (sivu 31, kuva 9). SAM kerros tekee kaksoiskerrosrakenteesta erityisen vakaan, mutta fosfolipidimolekyylien sivusuuntainen liikkuminen vähentää HBM:n käyttöä solukalvojen ominaisuuksien tutkimisessa. Sen sijaan HBM-kerrosten avulla voidaan tutkia solukalvon rajapinnalla tapahtuvia reaktioita, kuten esimerkiksi proteiinin ja solukalvon pinnan välisiä vuorovaikutuksia ja ligandien sitoutumista solukalvon reseptoreihin. Hydrofobisten vuorovaikutusten avulla on kiinnitetty sytokromi-c-oksidaasi -entsyymi HBM-pintaan ja käytetty sitä syanidin detektoimiseen.<sup>30</sup>

#### 4.5.2 Sähköstaattiset vuorovaikutukset

Sytokromi c:n tutkimuksissa on havaittu, että sähköstaattinen kiinnitys elektrodin pintaan on hyvin hellävarainen menetelmä entsyymin rakenteen ja ominaisuuksien kannalta. Tämä mahdollistaa myös elektronien siirtymisen suoraan proteiinin ja elektrodin välillä. Tämä menetelmä sopii erityisesti SAM-pinnoille, jossa pinnalla on joko positiivisesti varautuneet amiiniryhmät tai negatiivisesti varautuneet karboksyyliiryhmät. Onnistuneen kiinnityksen aikaansaamiseksi on proteiinin oltava sähköisesti riittävän varautunut eivätkä elektrodi ja proteiinin hapetus-pelkistysryhmät saa olla liian kaukana toisistaan.<sup>31</sup> Nämä ominaisuudet voidaan päätellä proteiinin isoelektrisen pisteen avulla ja myös SAM:n pinnalla olevan proteiinin konformaatiosta.

Proteiinin sähköstaattisen kiinnityksen suurin etu on se, että se ei tarvitse ylimääräisiä liitosreagensseja eikä liitettävää proteiinia tarvitse muokata. Ongelmana on kuitenkin kiinnittyminen ei-kovalenttisten vuorovaikutusten kautta. Vaikka nämä vuorovaikutukset ovat suhteellisen heikkoja ja reversiibeilitä, vaikuttavat nämä häiritsevästi muodostuvan SAM:n kestävyteen ja uudelleenkäytettävyyteen. Erityisesti ne haittaavat analyttistä työtä ja sensorisovelluksia.<sup>18</sup> Adsorptioprosessissa proteiinissa tapahtuu usein rakenteellisia muutoksia ja denaturaatiota, jotka voivat heikentää proteiinin aktiivisuutta merkittävästi.<sup>32</sup> Aktiivisuuden heikentyminen johtuu muun muassa siitä, että proteiinien pakkautuminen on kontrolloimatonta. Tästä seuraa se, että kasvavat steeriset esteet sekä epäspesifinen adsorptio vielä entisestään alentavat proteiinin aktiivisuutta.

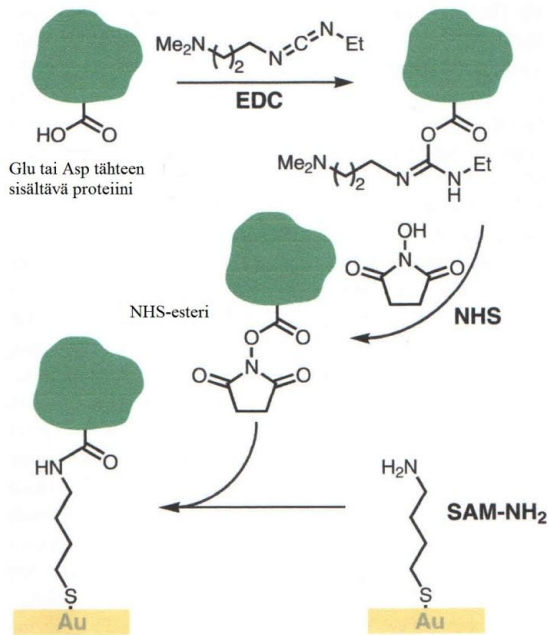
Proteiinien epäspesifisen adsorption hillitsemiseksi on kehitetty inerttejä pintoja. Erityisen käytettäväksi menetelmäksi on havaittu alkaanitioli SAM-pinta, jossa alkaaniketjun päässä on oligo(etyleeniglykoli)-ketju (OEG). Tämä OEG-ketju sitoo hydrofiilisenä ryhmänä muun muassa SAM-pinnan ja proteiinin välissä olevia vesimolekyylejä ja näin estää proteiinin epäspesifistä adsorptiota pinnalle.<sup>33</sup>

### 4.5.3 Kovalenttiset vuorovaikutukset

Proteiinien liittäminen pysyvästi alkaanitioli-SAM:n pinnalle tapahtuu kovalenttisten sidosten avulla. Kiinnitysreaktiot tapahtuvat yleensä proteiinien aminohapposivuketjujen kautta, joissa on suurin osa proteiinin funktionaalisista ryhmistä. Näitä reaktioita voidaan käyttää muokkaamattomille proteiineille, koska reaktiot tapahtuvat proteiinissa luonnostaan olevien ryhmien kautta.<sup>18</sup> Reaktioluokkia, joita voidaan hyödyntää SAM-pintojen muokkaamisessa, ovat muun muassa nukleofiilinen substituutio, esteröinti, asylaatio ja nukleofiilinen additio.<sup>34</sup> Sopivissa kokeellisissa olosuhteissa SAM-pinnan alkaaniketjuun liitetyt terminaaliset ryhmät voivat reagoida suoraan ligandi-liuoksessa olevien molekyylien kanssa. SAM-pinnat, joihin on liitetty maleimidi ryhmä, reagoivat proteiinien kanssa, joissa on reaktiivinen kysteini-aminohappo. Maleimidi-ryhmät suosivat tioliadditiota fysiologisessa pH:ssa (6,5-7,5), sillä näissä olosuhteissa amiinit ovat pääosin protonoituneessa muodossa.<sup>35</sup>

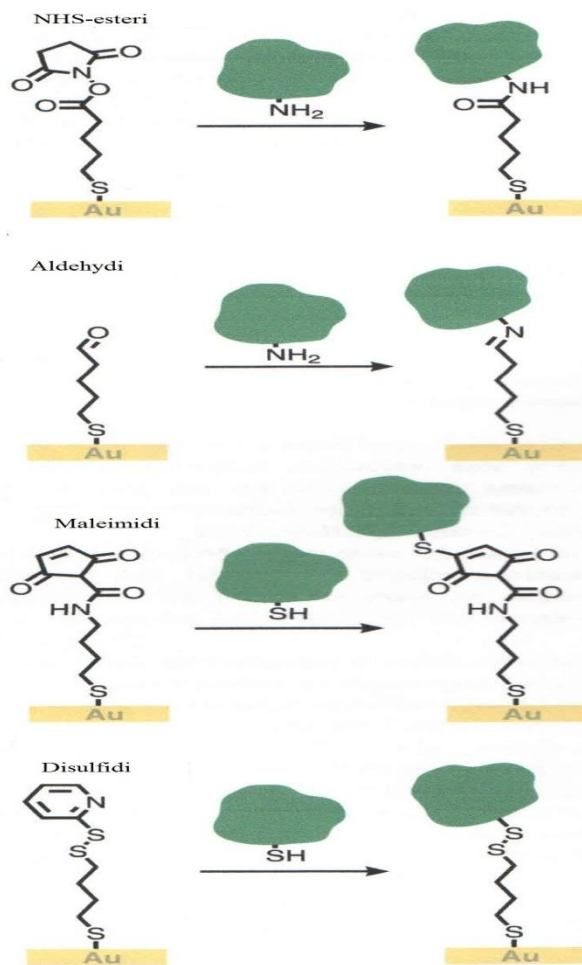
Yleisin tapa sitoa proteiineja kovalenttisesti SAM-pintoihin on sitoa ensin SAM-pintaan reaktiiviinen välituote, joka liittyy sitten haluttuun ligandiin. Tällä tavoin tämä välituote voi reagoida monien eri ligandien kanssa. Tästä seuraa ainakin teoriassa se, että valmistettavaan pintaan voidaan tehdä alueita, jotka ovat joko aktiivisia tai inaktiivisia eli alueiden reaktiivisuuksia voidaan kytkeä päälle ja pois. Yksi yksinkertaisimmista ja yleisimmistä menetelmistä SAM-pinnan muokkaamiseen on hyödyntää amidisidosten muodostumista anhydridi-välituotteen kautta. Tämä tapahtuu esimerkiksi SAM-pinnan karboksyyli ryhmän dehydraation kautta käyttämällä reagenssina trifluoriasetanhydridiä. Reaktio tapahtuu sen jälkeen proteiinin lysiiniketjun amiiniryhmän ja SAM-pinnan välillä jolloin muodostuu amidisidos. Vaihtoehtoisesti voidaan muodostaa proteiinien amiiniryhmien ja SAM-pinnan aldehydiryhmän kanssa imiini, joka voidaan lopuksi pelkistää natriumsyanoboorihydridillä sekundääriseksi amiiniksi. Amiiniryhmän funktionaalisuus mahdollistaa myös epoksidi-muokattujen materiaalien käyttämisen.<sup>18,36</sup> Epoksidien etuna on niiden kestävyys hydrolyysiä vastaan neutraalissa pH:ssa. Tämä helpottaa materiaalien käsittelyä, mutta voi johtaa hitaaseen tai epätäydelliseen sitoutumiseen. Proteiinin glutamaatti ja aspartaattiryhmiä voidaan myös käyttää kiinnittämiseen muodostamalla esterit N-hydroksisukkinimidin (NHS) kanssa.<sup>37</sup> Toinen vaihtoehto esterin muodostamiseen on N-etyyli-N-(3-dimetyyliaminopropyyli)

karbodiimidi (EDC). Disulfidi-tioli vaihtoreaktiota käytetään yleisesti tioli-muokattujen peptidien ja proteiinien liittämiseksi SAM-pinnoille. Sen on havaittu tapahtuvan helpommin kuin tiolin poistaminen pinnalta.<sup>38</sup> Kuvassa 6 on esitetty EDC:n ja NHS:n avulla esterin kautta liitettävän proteiinin reaktio. Kuvassa 7 on esitetty edellä kuvatut kovalenttiset kiinnittämisreaktiot SAM-pinnan ja proteiinin erilaisten ryhmien välillä.



**Kuva 6.** Glutamaatti- tai aspartaattiryhmän sisältävän proteiinin liittäminen SAM-pintaan.<sup>18</sup>

Proteiinien kiinnittämiseen käytetään yleisesti perinteisiä kemiallisia reaktioita, mutta epäspesifisen kiinnittymisen kemiaa ei tunneta kovin tarkasti. Tämä johtaa usein siihen, että kiinnitettyjen proteiinien ominaisuudet voivat hävitä kokonaan tai osittain kiinnityksen yhteydessä. Muokattujen SAM-pintojen valmistuksen tutkimisessa olisi tärkeää löytää irreversiibeli kiinnitysmetodi ja samalla keino valmistaa uudelleenkäytettäviä sensoripintoja ja siruja.<sup>18</sup>



Kuva 7. Proteiinien liittäminen SAM-pintaan kovalenttisten sidosten kautta.<sup>18</sup>

#### 4.5.4 Kelaatioon perustuvat vuorovaikutukset

Kelaatioon perustuvissa kiinnitystekniikoissa käytetään oligohistidiini-merkkejä (engl. His-tags) yhdessä metalli-ionien kanssa, jotka on kiinnitetty kelaattoreiden, esimerkiksi iminodietikkahapon sekä nitrilotrietikkahapon (NTA) avulla. Kelaatiota käytetään myös kromatografiseen proteiinien puhdistamiseen. Pieni histidiini-merkki, joka koostuu yleensä kuudesta peräkkäisestä histidiini-yksiköstä, kelatoi siirtymämetalleja, kuten Cu (II)-, Co (II)-, Zn (II)- ja Ni (II)-metalleja. Näistä käytetyin on nikkeli. His<sub>6</sub>-merkittyjen proteiinien kiinnittäminen Ni-NTA SAM-pintaan tarjoaa monia hyviä ominaisuuksia verrattuna muihin biokemiallisiin tunnistuselementteihin, kuten esimerkiksi vasta-aine

systemeihin. Näitä ovat muun muassa se, että kaupallisesti on saatavilla monia N- tai C-päähän His<sub>6</sub>-merkattuja proteiineja, histidiini-nikkeli (II) -kompleksin muodostuminen on nopeaa proteiinin toimintaan vaikuttamatta, reaktio on reversiibeli kun käytetään voimakkaampaa kelaattoria kuten etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA) tai imidatsolia, ja histidiini-merkkien alueellisesti rajattu kiinnittyminen mahdollistaa kontrolloidun kiinnittymisen.<sup>18,39</sup> Huonona puolena voidaan pitää selektiivisyyden puutetta, sillä iso osa endogeenisistä proteiineista voivat sitoa metallioneja. Tämä johtaa siihen, että muut proteiinit kilpailevat haluttua His<sub>6</sub>-merkattua proteiinia vastaan. Sen lisäksi sitoutumisen vuorovaikutus on melko heikko ja johtaa mahdollisesti kiinnitetyn proteiinin dissosiaatioon.<sup>39</sup>

#### 4.5.5 Supramolekulaariset vuorovaikutukset

Ei-kovalenttisten vuorovaikutusten kautta tapahtuva spesifinen SAM-pinnan muokkaaminen voi perustua myös ns. supramolekulaarisiin vuorovaikutuksiin. Näitä vuorovaikutuksia hyödynnetään muun muassa syklodekstriini-muokatuissa SAM-pinnoissa. Syklodekstriini-SAM kerrokset perustuvat supramolekulaarisiin isäntä-vieras (host-guest) vuorovaikutuksiin pienten linkittäjämolekyyliden välityksellä. Tällaisia pintoja kutsutaan myös molekulaarisiksi piirilevyiksi (molecular printboards), koska proteiineja voidaan sitoa pinnalle tarkoin valittujen ominaisuuksien saavuttamiseksi. Syklodekstriinin (CD) avulla proteiinin sitoutuminen SAM:n pintaan saadaan hyvin spesifiseksi, jolloin tuloksena on täsmälleen haluttu SAM-pinta. Valitsemalla halutun vieras-komponentin määrä ja tyyppi, voidaan hallita moniarvoisten molekyylien adsorption ja desorption termodynamiikkaa, kinetiikkaa ja stoikiometriaa SAM-pinnalle.<sup>40</sup> Multivalenssi on käsite, joka kuvaa vuorovaikutuksia moniarvoisen isäntä-molekyylin ja moniarvoisen vieras-molekyylin välillä. Multivalenssissa yhdellä komponentilla on monia vuorovaikutuskohtia toisen komponentin moniin vuorovaikutuskohtiin yhtä aikaa. Näin ollen tällainen systeemi on termodynaamisesti ja kineettisesti hyvin erilainen verrattuna vaikkapa monovalenttisiin systeemeihin.<sup>41,42</sup>

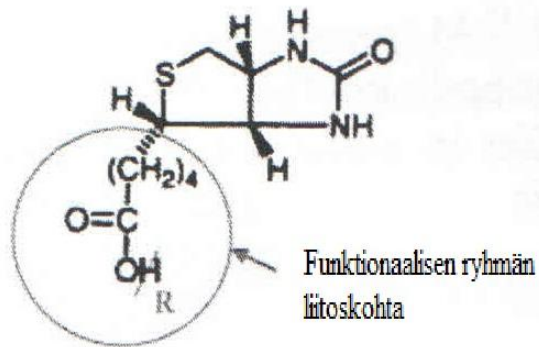
#### 4.5.6 Bioaffiniiviset vuorovaikutukset

Bioaffiniteetin hyödyntäminen SAM-pintojen valmistuksessa on mahdollistanut proteiinien sitomisen SAM-pintaan hajottamatta proteiinin rakennetta tai toimintaa. Tutkituin reaktiopari on biotiini-avidiiini -pari. Biotiinin ja avidiinin välistä voimakasta vuorovaikutusta on hyödynnetty monissa sovelluksissa. Sen avulla on tutkittu muun muassa mitokondrioiden membraanien proteiinien toimintaa.<sup>43</sup> Elie-Caille tutkimusryhmineen havaitsi, että mitokondrioiden sisämembraanin proteiinien puhdistusvaihe voitiin jättää pois, kun käytettiin oligo-polyetyleeniglykolikerrosta (oligo-PEG) suojaamaan SAM-pintaa.<sup>43</sup> Taulukkoon 3 on koottu laaja joukko SAM-pintojen muokkauksessa käytettäviä reaktioita, reagensseja ja reaktioilla haluttuja tuotteita. Kuten taulukosta 3 nähdään, on reaktioreittejä suuri määrä.

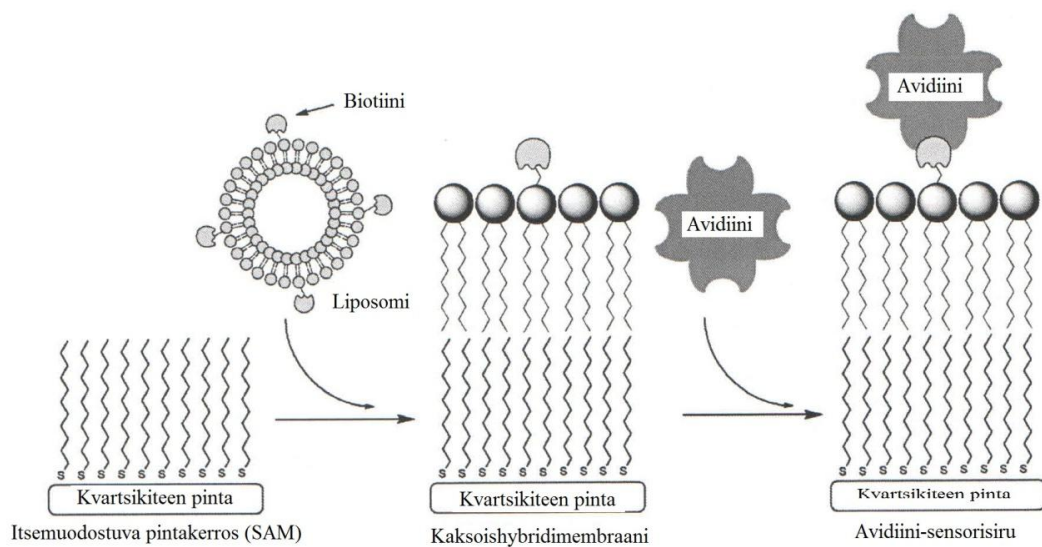
Biotiini-avidiiini parin kiinnitys sensorin pintaan perustuu spesifiseen vuorovaikutukseen avidiinin ja biotiinin välillä. Avidiini ja streptavidiiini ovat hyvin samankaltaisia tetrameerisiä proteiineja, jotka pystyvät sitomaan neljä biotiini-molekyyliä suurella affiniteetilla. Avidiini ja streptavidiiini eroavat toisistaan molekyyliä painon sekä elektroforeettisen liikkuvuuden osalta. Substraatin (esim. kulta) pinta päällystetään ensin avidiinilla ja tämän jälkeen haluttu biotiini-käsitelty biomolekyyli kiinnitetään pintaan hyödyntäen biotiinin ja avidiinin (erit. streptavidiiini) välistä affiniteettia. Tällä menetelmällä on suuria hyötyjä muihin kiinnitystekniikoihin verrattuna.<sup>44,45</sup> Sidosaffiniteetti biotiini-avidiiini parille on lähes kovalenttisen sidoksen suuruinen ( $K = 10^{13} - 10^{16} \text{ M}^{-1}$ ). Reaktion voi sanoa olevan lähes palautumaton. Tämän kompleksisidoksen lujuus perustuu useisiin vetysidoksiin ja van der Waals -vuorovaikutuksiin. Biotiini-avidiiini parin sidos muodostuu hyvin nopeasti ja on riippumaton pH-arvosta, lämpötilasta, orgaanisista liuottimista, entsyymaattisesta proteolyysistä tai muista denaturoivista aineista. Yleensä streptavidiiinia käytetään avidiinin sijasta, sillä avidiinin glykoaminohapot saattavat aiheuttaa epäspesifistä adsorptiota.<sup>21,46,47</sup> Näiden hyvien ominaisuuksien vuoksi biotiini-streptavidiiini paria voidaan hyödyntää monenlaisissa sovelluksissa. Esimerkiksi biotiinin pH:sta riippuvainen sitoutuminen avidiiniin on saatu aikaan muokkaamalla avidiinin DNA:ta yhdellä pistemutaatiolla.<sup>47</sup> Kuvassa 8 on esitetty biotiinin rakenne ja kuvassa 9 biotiini-avidiiiniparin muodostama kaksoiskerrosyhybridi-SAM-pinta. Biotiini voidaan liittää



erilaisiin funktionaalisiin ryhmiin häiritsemättä vuorovaikutusta avidiinin kanssa. Näitä ryhmiä ovat muun muassa amiini-, tioli-, karboksyyli-, proteiini- tai hiilihydraattiryhmä sekä DNA/RNA-molekyyli.



**Kuva 8.** Biotiinin rakennekuva.<sup>46</sup>



**Kuva 9.** Biotiini-Avidiini parin hyödyntäminen.<sup>44</sup>

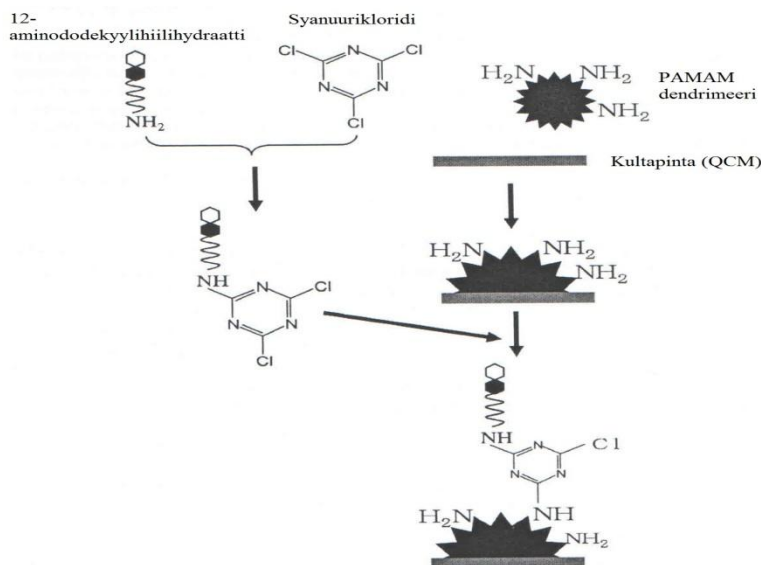
**Taulukko 3.** SAM-pinnan muokkaukseen käytettäviä reaktioita. Ensimmäisessä sarakkeessa on SAM-pinnan alkaaniketjun päähän liitetty funktionaalinen ryhmä.<sup>34</sup>

F. ryhmä	Reaktiotyyppi	Reagenssit	Tuote	
Alkeeni	Hapettuminen	Kaliumpermanganaatti	Ketoli/dioli	
Amiini	Nukleofiilinen substituutio	(9-fluoronyyli)metoksikarbonyylin	Fmoc-suojattu amiini	
		(Fmoc) NHS-esteri		
		4-nitrobentsaldehydi (kromofori)		
		Karboksyylihapot	Imiini (palautuva reaktio)	
	Nukleofiilinen additio	Klooridimetyylisilaani (S <sub>N</sub> 2)	Amidit/Aminosilaani	
		Isotiosyanaatit	Tioureat	
		Di-isosyanaatit	Karbamaatti (uretaani)	
	Asylaatio	Polymeerisidotut isosyanaatit	Ureaani (substituoidut ureat)	
		Happokloridit	Amidit	
		Aktivoidut esterit		
Alkoholi	Asylaatio	Happokloridit	Esterit	
		Anhydridit	Esterit	
	Anhydridien alkoholyysi	Fluorietikkahapon anhydridit	Fluorinoidut esterit	
	Nukleofiilinen substituutio	Alkyylitrikloorisilaanit	SAM-kaksoiskerros	
	Nukleofiilinen additio	Fenyylisosyanaatti	Ureaani	
		S <sub>N</sub> 1	Dimetoksitrietylikloridit	DMT-suojatut,
	Nukleofiilinen substituutio	(DMT)	suojauksen poisto hapolla	
		(9-fluoronyyli)metoksikarbonyylin	Fmoc-suojattu, suojauksen	
			(Fmoc) NHS-esteri	poisto emäksellä
	Karboksyylisappo	Nukleofiilinen substituutio	Trifluorietanoli/	Esteri
di-tert-butyylidikarbodi-imidi				
Alifaattinen nukleofiilinen substituutio/dehydraatio		Intramolekulaarinen karboksyylisappo+	Ketjujen väliset anhydridit	
Nukleofiilinen additio		Trifluorietikkahapon anhydridi		
		Fenyylisosyanaatti	Seka-anhydridi	
Nukleofiilinen substituutio		Amiinit	Amidit	
	Amiinien asylaatio			
Aldehydi	Nukleofiilinen substituutio	Amiinit	Imiinit	
Epoksidi	Nukleofiilinen substituutio	Primääriset amiinit	Sekundääriset amiinit	
	Epoksidien alkoholyysi	Hydroksi (glykolit)	β-hydroksi eetteri	
	Nukleofiilinen substituutio	Karboksyylimuokatut polymeerit	β-hydroksialkyylisilylaattit	
Tioli	Hapettuminen	Proteiinit	Proteiinien kemisorptio disulfidi-sillan kautta	
Sulfidi	Hapettuminen	Vetyperoksidi	Sulfoksidi	
Alkyylihalidi	Nukleofiilinen substituutio/	Natriumjodidi	Alkyylijodidi (hidas reaktio)	
	Halidien vaihto			
	SN2	Vahvat anioniset nukleofiilit (SCN <sup>-</sup> , N <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Substituoitu tuote	
Hydrokinoni	Diels-Alderin	Peptidiin liitetty	Peptidi,	
	jälkeinen hapettuminen	syklopentadieni	solujen kiinnitystä varten	

## 4.6 Biomolekyylien kiinnitys sensorisirun pinnalle

Monet hiilihydraatit ovat solujen pinnalla yhdistyneinä lipidien (glykolipidi) tai proteiinien kanssa (glykoproteiini). Hiilihydraateilla on monia tärkeitä tehtäviä, esimerkiksi suojella soluja haitallisilta ympäristötekijöiltä, helpottaa solujen kiinnittymistä, osallistua signaalien välitysketjuihin ja toimia reseptorina mikro-organismeille ja niiden myrkyille.<sup>48</sup> Yksi uusi menetelmä hiilihydraattiketjun sitomiseksi kvartsikiteen pinnalle on käyttää polyamidiamiini dendrimeerejä (PAMAM), joihin hiilihydraattiketju (12-aminododekyylihiilihydraatti) liitetään. Osigo työryhmineen<sup>48</sup> käytti reagenssina hiilihydraattiketjun aktivoimiseksi syanuurikloridia (engl. cyanuric chloride). PAMAM-ryhmät kiinnittyivät adsorptiolla ensin sirun pintaan ja tämän jälkeen syanuurikloridilla muokatut hiilihydraattiketjut kiinnittyivät PAMAM-ryhmien pintaan. Kuvassa 10 on esitetty reaktion kulku lyhyesti.

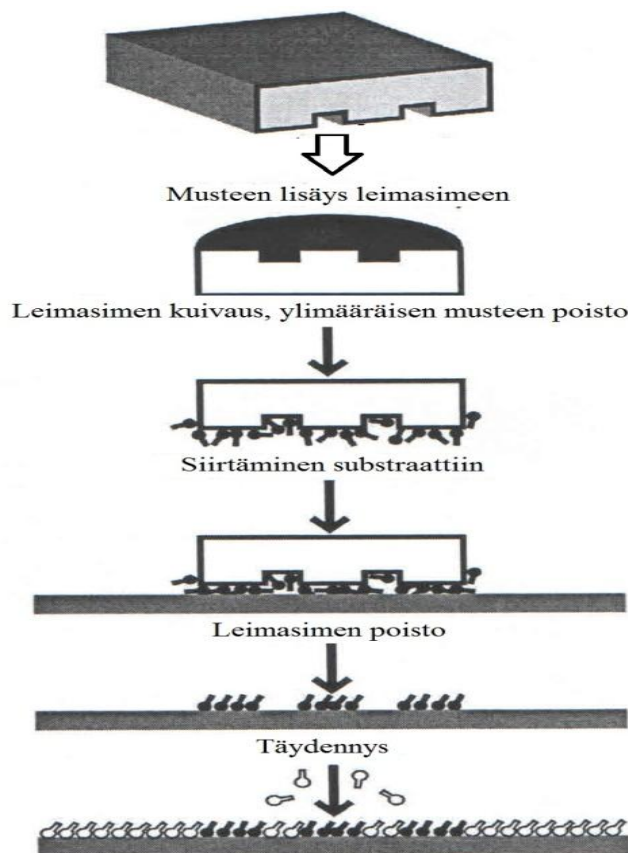
**Kuva 10.** Hiilihydraattiketjun kiinnitys sensorisirun pintaan.



Proteiinien kiinnittämiseksi sensorisirun pintaan voidaan käyttää esimerkiksi mikrokontaktitulostus-tekniikkaa (engl. micro contact printing,  $\mu\text{CP}$ ).  $\mu\text{CP}$ :n avulla halutulle pinnalle voidaan kiinnittää proteiineja haluttuun kohtaan menettämättä niiden aktiivisuutta. Kiinnitys voidaan tehdä joko suorasti tai epäsuorasti.<sup>49</sup> Suorassa

menetelmässä bioaktiiviset molekyylit kiinnitetään ilman välivaiheita tai muokkausta suoraan pinnalle haluttuun kohtaan. Epäsuorassa menetelmässä bioaktiiviset molekyylit adsorboituvat spontaanisti pinnalle. Epäsuoran menetelmän hyvänä puolena on se, että esim. proteiini säilyy paremmin aktiivisena kun taas suorassa menetelmässä proteiinin dehydraatio saattaa heikentää sen biologista aktiivisuutta.<sup>49</sup> Tekniikassa käytettävä leimasin voi olla valmistettu esimerkiksi polydimetyylisiloksaanista (PDMS).<sup>50</sup> Kuvassa 11 on esitetty menetelmän perusperiaate.

**Kuva 11.** Epäsuoran  $\mu$ CP:n periaate.<sup>49</sup> Muste voi olla esim. proteiini, leimasimen materiaalina on esimerkiksi PDMS.



Entsyymien kiinnitys on ratkaiseva tekijä tehokkaiden biosensorien kehittämiseksi.<sup>51</sup> Entsyymien kiinnitykseen sensorisirujen pinnoille on käytetty pääasiassa viittä erilaista tekniikkaa. Nämä ovat loukutus (engl. entrapment), adsorptio, ristisilloitus (engl. cross-linking), kovalenttinen kiinnitys ja affiniitivinen kiinnitys. Näillä jokaisella tekniikalla on sekä hyviä että huonoja puolia. Tekniikoiden hyvät ja huonot puolet on koottu taulukkoon 4. Loukutuksessa entsyymi, mediaattori sekä muut reagenssit laitetaan yhtä

aikaa sensoripinnalle, jonka materiaali on esimerkiksi geeli- tai polymeeripinta. Tekniikka ei vaadi molekyylien kemiallista muokkausta, joten biomolekyylien biologinen aktiivisuus säilyy.

Entsyymien adsorptio kiinteälle pinnalle on helpoin fysikaalinen kiinnitysmenetelmä.<sup>51</sup> Tätä menetelmää hyödynnetään SAM-pintojen valmistuksessa. Adsorption mekanismi perustuu Van der Waalsin, sähköstaattisiin ja/tai hydrofobisiin vuorovaikutuksiin. Ristisilloituksessa entsyymi silloitetaan proteiiniin esimerkiksi glutaraalialdehydin kautta. Entsyymit voidaan silloittaa joko toistensa kanssa tai jonkun reagoimattoman proteiinin kanssa (esim. albumiini). Kovalenttisessa kiinnityksessä entsyymi voidaan sitoa suoraan sensorin pinnalle. Kiinnitys vaatii usein kuitenkin sensoripinnan muokkauksen, jotta entsyymi voi kiinnittyä siihen menettämättä aktiivisuuttaan. Affiniivisessa kiinnityksessä tavoitteena on muodostaa bioaffiniivisiä sidoksia aktivoituneen pinnan (esim. metalli-kelaatti, lektiini, avidiini) ja proteiinin spesifisen ryhmän välille (hiilihydraattiketju, biotiini, histidiini). Menetelmän avulla on mahdollista säädellä biomolekyylin suuntautumista pinnalla ja välttää siten entsyymin aktiivisen kohdan tukkeutuminen tai aktiivisuuden menettäminen.<sup>51</sup>

**Taulukko 4.** Entsyymien kiinnittämistekniikat sensorin pinnalle.<sup>51</sup>

Kiinnitysmetodi	Sitoutumisen luonne	Edut +	Haitat -
Adsorptio	Heikot sidokset	Helppo ja yksinkertainen, entsyymin aktiivisuus säilyy hyvin	Desorptio, epäspesifinen adsorptio
Kovalenttinen kiinnitys	Kemiallinen sitoutuminen entsyymin ja pinnan välisten funktionaalisten ryhmien kautta	Ei diffuusioestettä, stabiili, lyhyt reaktioaika	Materiaalia ei voi elvyttää, sitoutuminen myrkyllisten tuotteiden kanssa, entsyymin aktiivisuuden menettäminen
Loukutus	Entsyymin yhdistäminen geeliin tai polymeeriin	Ei kemiallista reaktiota monomeerin ja entsyymin välillä, joka voisi vaikuttaa aktiivisuuteen; monenlaisia entsyymejä voidaan kiinnittää samaan polymeeriin	Diffuusioeste, entsyymin vuotaminen, monomeeria ja entsyymiä tarvitaan suuri pitoisuus sähköpolymeerisointiin
Ristisilloitus	Sidos entsyymin ja linkittäjän (glutaraldehydi) tai inertin molekyylin (esim. BSA) välillä	Yksinkertainen	Entsyymin aktiivisuuden menettäminen todennäköistä
Affiniteetti	Esimerkiksi biotiini-avidini	Hallittu ja suuntautunut kiinnitys	Entsyymissä tulee olla oikeanlainen reaktiivinen ryhmä (esim. His, biotiini)

## 4.7 Itsemuodostuvien pintakerrosten stabiilisuuteen vaikuttavat tekijät

Yksi oleellisimmista SAM-pintojen ominaisuuksista on stabiilisuus. Tämä on myös tärkeää, kun kehitetään näiden pintojen ominaisuuksia sähköisiin sensorisovelluksiin. SAM-pintojen virheiden määrään, järjestykseen ja stabiilisuuteen vaikuttaa alkaaniketjujen väliset van der Waals –vuorovaikutukset. Mitä sileämpi kullan pinta ja pidempi alkaaniketju, sen stabiilimpi SAM-pinta muodostuu verrattuna epätasaiseen kullan pintaan ja lyhyempiin alkaaniketjuihin. Ketjun pituus vaikuttaa myös virheiden määrään SAM-pinnalla siten, että pidempi ketju tuottaa vähemmän virheitä pintaan. Metallipinnan topografia eli pinnan muoto vaikuttaa myös muodostuvan SAM-pinnan laatuun. Pinnan muodon vaihtelut saisivat olla enintään samaa luokkaa kuin käytettävän adsorbenttien koko.<sup>52</sup> Atomaarisesti tasaisten kultapintojen valmistamiseksi on kehitetty joitakin menetelmiä hyödyntämällä silikaattimineraaleja.

SAM-pintojen pitkät alkaaniketjut (yli 10 alkyylilihiiltä) passivoivat elektrodien pintoja. Käytettävän sovelluksen tyyppi ratkaisee kuinka pitkää ketjua tarvitaan. Jos esimerkiksi halutaan estää komponenttien pääsy kullan pintaan, voidaan valita pitkä alkaaniketju. Jos taas kultapintaa halutaan käyttää hyödyksi, valitaan lyhyt alkaaniketju. Yksi vaihtoehto on myös tehdä SAM-pinta, jossa pitkiä alkaaniketjuja on jaksottain.<sup>43</sup> Sähkökemiallisten sensorien kannalta SAM-pinnan stabiilisuus on erityisen tärkeää. SAM-pintojen on havaittu olevan stabiileja jännitepotentiaalien +0,8 V ja -1,4 V välillä. Tämä jänniteväli sopii suurimpaan osaan sähköisistä sovelluksista. Tämän potentiaalivälin ulkopuolella tiolit hapettuvat tai pelkistyvät ja tapahtuu desorptio. Jänniteherkkyyttä voidaan toisaalta käyttää hyödyksi SAM-pinnan valmistuksessa vaikuttamalla ketjujen järjestymiseen jännitteellä. Tarkka jännitetaso, jolla SAM-pinnat desorboituvat riippuu alkaanitioliketjujen ominaisuuksista kuten ketjun pituudesta ja pääryhmien välisestä repulsiosta. Tässäkin tapauksessa ketjun pidentyessä pinnan kestävyys paranee. Alkaaniketjun pituus vaikuttaa myös SAM-pinnan lämmönkestävyyteen. Esimerkiksi butaanitioliketjun desorptiolämpötila on havaittu olevan 75 °C ja vastaavasti yli 100 °C dodekaanitioliketjulle. Ketjujen välisen vuorovaikutuksen suuruus lisää myös lämmönkestävyyttä. Tämän vuoksi erityisesti vetysidoksia ja  $\pi$ - $\pi$  sidoksia sisältävät SAM-pinnat kestävät lämpötilaa paremmin kuin alifaattiset hiilivedyt.<sup>52</sup>

## 4.8 Itsemuodostuvien pintakerrosten mahdollisuudet, edut ja rajoitukset

SAM-pintojen käyttömahdollisuudet ovat hyvin laajat. Niiden avulla voidaan muun muassa matkia solukalvon rakennetta, valmistaa biosensoreita ja sitoa DNA-molekyylejä, entsyymejä ja proteiineja SAM-pinnalle.<sup>15,53</sup> Biosensoreista esimerkkejä ovat muun muassa glukoosioksidaasi-entsyymien avulla valmistettu glukoosisensori sekä metalleja (Cd, Cu, Hg ja Zn) femtomolaarisella määrällä määrittävä biosensori. Nämä sensorit pohjautuvat nimenomaan alkanitiolikulta-SAM pintoihin. Näiden kaikkien sovellusten kehittämisen mahdollistaa SAM-pintojen hyvät ominaisuudet. Näitä ovat muun muassa: tarkkarajainen rakenne, mahdollisuus valmistaa inerttejä pintoja, molekyylien ja proteiinien kiinnittämiseen strategioita on valtava määrä, yhdistäminen analyttisiin menetelmiin, pintojen valmistus ”muotin” mukaan ja todistettu toimivuus.<sup>28</sup> SAM-pinnan tarkkarajainen rakenne mahdollistaa pinnan joustavan räätälöinnin ligandien ja funktionaalisten ryhmien suhteen. Valmistamisen joustavuus takaa myös sen, että voidaan käyttää dynaamisia substraatteja, jotka voivat vaikuttaa ligandien käyttäytymiseen. Inerttien pintojen valmistuksessa käytetty OEG estää tehokkaasti proteiinien epäspesifistä adsorptiota, josta on hyötyä monimutkaisten liuosten käsittelyssä (esim. seerumi). SAM-pintoja voidaan hyödyntää sekä tutkimuksessa että kaupallisesti bioanalytiikassa.

Biosensorisovelluksissa SAM-pintojen hyviä ominaisuuksia puoltaa muun muassa solukalvojen kaltainen rakenne, joka helpottaa biomolekyylien kiinnittymistä, SAM-pinnan tarkka hydrofobisuuden tai hydrofiilisyyden säätely, pinnan valmistukseen tarvitaan hyvin vähän biologista materiaalia ja pinnan stabiilisuus mahdollistaa useat ja luotettavat mittaukset samasta kokeesta. SAM-pinnan avulla saadaan tietoa molekyyllitasolla tapahtuvista ilmiöistä, kuten proteiinien adsorptiosta, DNA:n hybridisaatiosta ja antigeenivasta-aine vuorovaikutuksista.<sup>5</sup>

SAM-pintojen rajoituksia biosensorikäytössä ovat muun muassa pintaan kiinnitettyjen entsyymien herkkyys pH:n muutoksille, ionivahvuudelle ja lämpötilalle. Pienet muutokset joissakin näistä saattavat aiheuttaa entsyymien aktiivisuuden katoamisen. Joidenkin SAM-pintojen kemiallinen stabiilisuus ei ole kovin hyvä, jolloin pinta saattaa hapettua tutkimusten aikana. Sähkökenttä ja SAM-pintojen herkkyys lämpötilalle eivät ole hyviä ominaisuuksia biosensoreille. SAM-pinnan hydrofobisuus voi myös aiheuttaa

ei-toivottujen epäpuhtauksien adsorptiota pintaan samalla tukkien analyyttien tunnistuskohdat.<sup>5,54</sup> Biomolekyylit voidaan liittää SAM-pintaan tietyllä tavalla, jolloin valmistettavan biosensorin herkkyys paranee.<sup>55</sup>

## **5 Käytännön sovelluksia, joissa QCM toimii biosensorina**

QCM-sensorin pintana usein käytettävä kulta mahdollistaa hyvin laajan kirjon SAM-pintoja, joita voidaan käyttää hyödyksi QCM-sovelluksissa. Biosensorien kehitys on tärkeää erityisesti lääketieteessä, jossa parempien diagnosointijärjestelmien kehittäminen on ensisijaista ihmisten hyvinvoinnin kannalta. Tässä kappaleessa käsitellään biosensorisovelluksia IgE-kvantitointiin, enantiomeerien erotukseen, kloramfenikolin määrittämiseen sekä vasta-aine-antigeeni- ja solu-lääkeaine -vuorovaikutustutkimuksiin.

### **5.1 Kvartsikidemikrovaaran ja pintaplasmaresonanssin vertailu ihmisen immunoglobuliini E:n kvantitoinnissa**

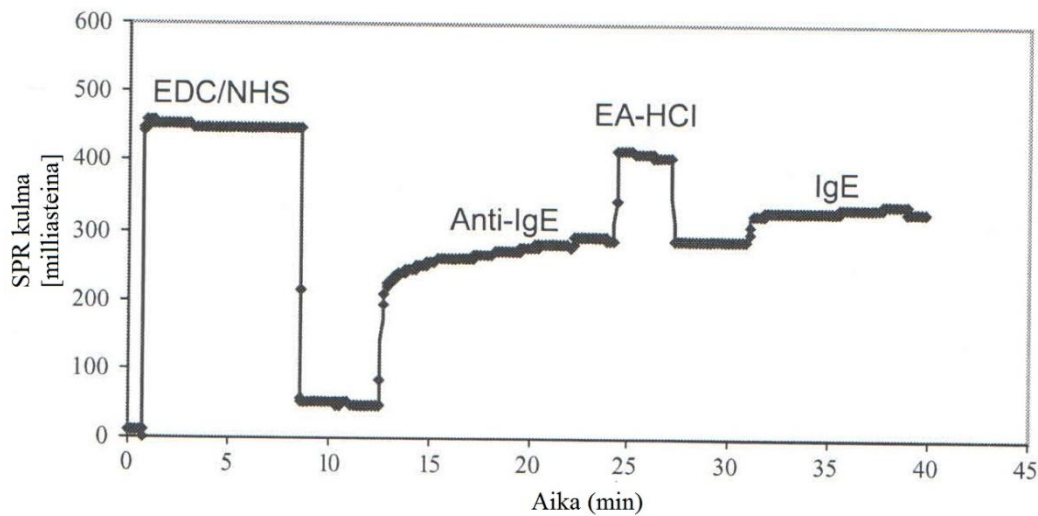
Allergia on yksi yleisimmistä taudeista maailmassa, josta kärsii maailmanlaajuisesti arviolta 10-20 % väestöstä. Ihmisen seerumin korkea immunoglobuliini E:n (IgE) pitoisuus viittaa allergiaan. IgE-pitoisuuden määrittämiseen on kaupallisesti saatavilla monia testikittejä, jotka perustuvat perinteisiin immunomääritystekniikoihin. Nämä tekniikat ovat kuitenkin varsin työläitä ja aikaa vieviä joihin sisältyy vaarallisia reagensseja ja kalliita laitteistoja. Tämän vuoksi viime vuosina on kehitetty monia kustannustehokkaita, nopeita ja helppokäyttöisiä allergianmääritystekniikoita. Su ja



Zhang kehittivät menetelmän IgE:n kvantitointiin käyttämällä SPR ja QCM-laitteistoja.<sup>56</sup>

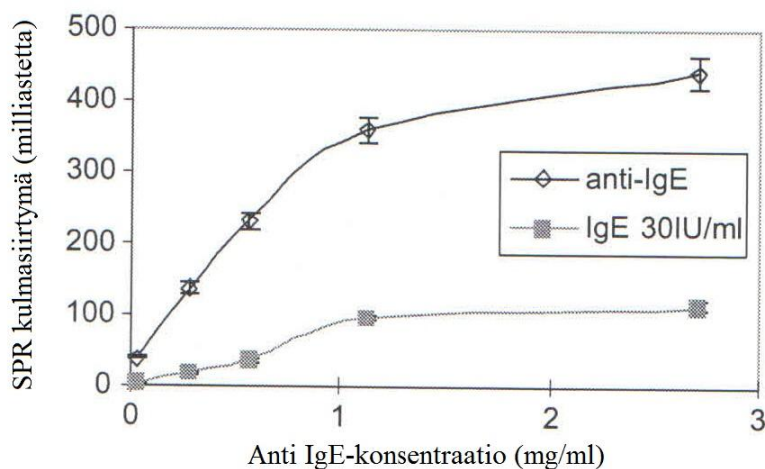
Su ja Zhang käyttivät tutkimuksessaan ihmisen IgE:n ja anti-IgE:n (IgE:n vasta-aine) välistä sitoutumisreaktiota ihmisen IgE-pitoisuuden määrittämiseen. SPR-laitteisto oli Eco Chemien valmistama (Hollanti) AUTOLAB SPR. Laserin aallonpituutena käytettiin 670 nm:ä ja mittauksissa kyvettä, jonka pohjassa oli linssi ja halkaisijaltaan 17 mm:n kultalevy. QCM-laitteiston kvartsikiteinä käytettiin AT-leikattuja 10 MHz kultapintaisia kvartsikiteitä. Kiteet ja kideoskillaattori ostettiin ICM-yrityksestä (International Crystal Manufacture Co. Inc., Oklahoma City, OK, USA). Kiteen värähtelytaajuuden muutoksia mitattiin TF830 yleislaskurilla (Thurlby-Thandar, UK). Sekä SPR- että QCM – laitteistojen liuosten injektioinnissa ja vaihdossa käytettiin laboratoriossa kehitettyä järjestelmää.

Anti-IgE:n kiinnityksessä SPR-levyjen ja QCM-sirujen pintaan käytettiin 11-merkaptoundekaanihapolla (MUA) muokattua SAM-pintaa karbodiimidin reaktion kautta. Pinta muodostettiin seuraavasti. Piranha-liuoksessa puhdistetut SPR-levyt ja QCM-sirut upotettiin 10 mM MUA:a sisältävään etanoliliuokseen neljäksi tunniksi huoneenlämpöön. Sen jälkeen pinnat pestiin etanolilla ja vedellä sekä kuivattiin typpellä. Nämä käsitellyt sensorit asetettiin SPR-kyvettiin tai QCM-kennoon, jonka jälkeen lisättiin 50 µl PBS-puskuria pohjatason määrittämiseksi. PBS-puskurin (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ja 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH oli 7,2. Pohjatason asettumisen jälkeen lisättiin 0,4 molaarisen N-(3-dimetyyliaminopropyli)-N'-etylikarbodiimidin vetykloridi (EDC)-liuoksen ja 0,1 molaarisen N-hydroksisukkinimidin (NHS) liuoksen 1:1 seosta (tislatussa vedessä) seitsemän minuutin ajan. Tämän tarkoituksena oli aktivoita pinnan karboksyylihappo-ryhmät. Aktivoinnin jälkeen anti-IgE-liuosta lisättiin ja annettiin reagoida. Liuoksen konsentraatiot olivat 0,02-2,0 mg/ml. Tämän jälkeen, ennen IgE:n lisäämistä lisättiin 0,2 M (pH 8,5) etanoliamiini-vetykloridipuskuria (EA-HCl) NHS-esteriryhmien deaktivoimiseksi. Kahden peräkkäisen näytteen välissä SPR-kyvetti ja QCM-kenno huuhdottiin PBS-puskurilla. Anti-IgE-pinnan regeneroimiseksi ja sitoutuneen IgE:n irrottamiseksi pinnalta käytettiin 1 % SDS-liuosta tai glysiini-HCl-puskuria (pH 2,5). Kaikki mittaukset tehtiin huoneenlämpötilassa. Kuvassa 12 on esitetty SPR-laitteiston signaali kussakin pinnan valmistuksen vaiheessa sekä IgE:n injektioinnissa.



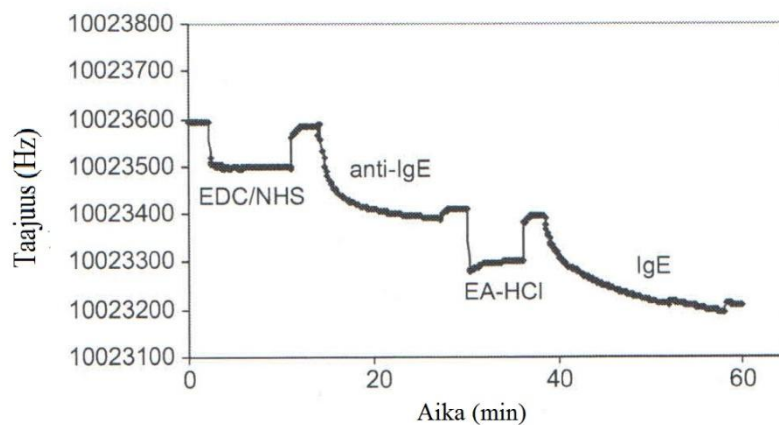
**Kuva 12.** MUA-käsitellyn sensorin SPR-signaali EDC/NHS-aktivoinnissa, anti-IgE:n kiinnityksessä (0,6 mg/ml), EA-HCl deaktivoinnissa ja IgE:n sitoutumisessa (30 IU/ml). Pohjataso on PBS-puskurin vaste. Kahden peräkkäisen reaktion välissä kennoa huuhdottiin PBS-puskurilla ja annettiin asettua 2 min ajan.<sup>56</sup>

Kuvassa 13 on esitetty SPR-signaali anti-IgE:n ja IgE:n konsentraation funktiona. Kuvasta 13 nähdään, että anti-IgE-konsentraation ollessa 1-2 mg/ml muuttuvat SPR-signaalit riippumattommiksi anti-IgE-konsentraatiosta eli suurin osa pinnan esteriryhmistä kyllästyy. Tästä voidaan päätellä, että 2 mg/ml anti-IgE:tä on riittävä pitoisuus hyvän sensoripinnan valmistamiseksi.



**Kuva 13.** SPR-signaali anti-IgE ja IgE konsentraatioiden funktiona.<sup>56</sup>

Kuvassa 14 on esitetty kuvaa 12 vastaavat mittaukset QCM-anturille. Kuvan 14 kuvaajasta voidaan nähdä, että SPR ja QCM-mittausten kestot eroavat toisistaan. Näiden mittausten perusteella SPR reagoi nopeammin muutoksiin QCM:n verrattuna. Erot selittyvät muun muassa sillä, että QCM-sensorissa yhdisteiden tulee fyysisesti kiinnittyä pintaan kun taas SPR-tekniikassa muutokset näytteen ominaisuuksissa pinnan läheisyydessä näkyvät heti.



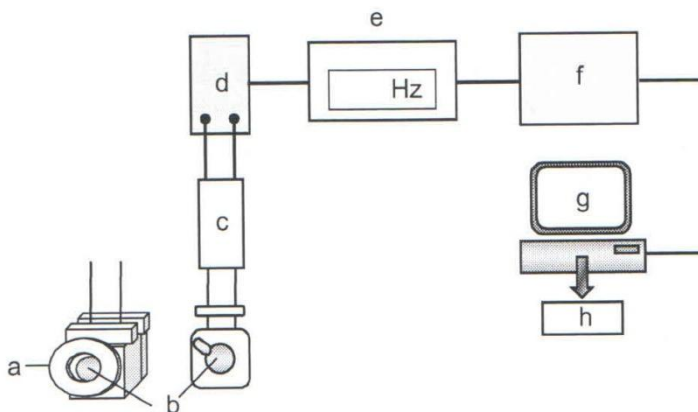
**Kuva 14.** MUA-käsitellyn QCM-sensorin taajuusvaste EDC/NHS aktivaatioon, anti-IgE kiinnitykseen (2,0 mg/ml), EA-HCl deaktivoointiin ja IgE-sitomiseen (150 IU/ml).<sup>56</sup>

Tutkimuksessa mitattiin myös SPR-sensorin ja QCM-sensorin toistettavuutta ja luotettavuutta. Havaittiin, että SPR-sensorin luotettavuus ja toistettavuus olivat selvästi paremmat kuin QCM-sensorissa. SPR-sensorin RSD-arvo (%) erilaisilla IgE-konsentraatioilla oli alle 5 %. QCM-sensorilla RSD-arvot vaihtelivat konsentraatiosta riippuen 9 – 17 % välillä. QCM-sensorin huonompi toistettavuus johtuu todennäköisesti QCM:n herkkyydestä ympäristön muutoksille kuten lämpötilalle, paineelle ja mekaanisille häiriöille. Myös QCM-sensorin pinnalle sitoutunut vesi aiheuttaa värähtelytaajuuden muutosta.

## 5.2 Kloramfenikolin määrittäminen kvartsikidemikrovaakaavulla

Kloramfenikoli (CAP) on laajalti käytetty tehokas antibiootti, jolla hoidetaan monia karjan, siipikarjan ja sikojen sairauksia. CAP:n kvantitatiiviset detektointimenetelmät ovat tavallisesti HPLC- ja GC-MS –menetelmiä. Perinteisillä menetelmillä toteutetut raja-arvot ovat välillä 1-25 µg/l. Maailmalla on kuitenkin herännyt huoli, että antibioottijäämiä päätyy ihmisravintoon, joten CAP:n käyttö on EU:ssa, Sveitsissä ja USA:ssa kielletty ihmisravinnon tuotannossa. Muista maista tulevilta ruuilta vaaditaan alle 1 µg/l pitoisuutta. Tämän vuoksi on tärkeää kehittää nopea analyysimenetelmä tämän kemikaalin määrittämiseksi lukuista liha- ja karjatuotteista. QCM soveltuu tähän erinomaisesti sen yksinkertaisuuden, nopeuden, toistettavuuden ja helppokäyttöisyyden vuoksi.<sup>57</sup> In-Seon Park työryhmä kehitti merkkiaineettoman CAP-sensorin käyttämällä SAM-pintojen muokkausta sekä liittämällä muokattuun SAM-pintaan anti-CAP vasta-ainemolekyylejä.

Tämän tutkimusryhmän käyttämä QCM-laitteisto on esitetty kuvassa 15. QCM-laitteen kvartsi oli AT-leikattua ja resonanssitaajuus 9 MHz. Puskuriliuoksena mittauksissa käytettiin 0,01 M fosfaattipuskuria (pH 7,4). Reaktioastiaan, jonka tilavuus oli 500 µl, lisättiin 200 µl fosfaattipuskuria ja mitattiin kvartsikiteen resonanssitaajuutta kunnes tasainen pohjataso oli saavutettu. Tämän jälkeen lisättiin 200 µl näytettä.



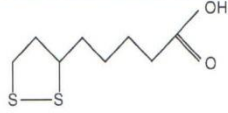
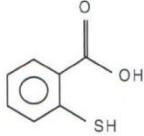
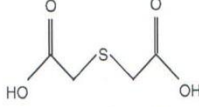
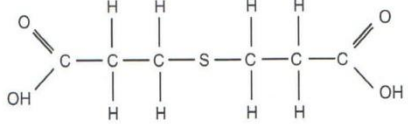
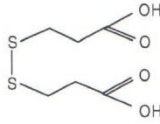
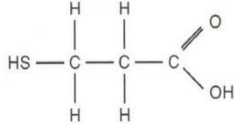
**Kuva 15.** CAP-sensorisysteemin havainnekuva. Kuvassa a) mittauskammion pidike, b) QCM/kulta pinta, c) konektori, d) oskillaattorimoduuli, e) kvartsikideanalyysointilaite, f) potentioasti, g) PC, h) ohjelmisto.<sup>57</sup>

CAP-yhdisteen vasta-aine kiinnitettiin SAM-pintaan seuraavasti. Ensin kvartsikide käsiteltiin 1,2 M NaOH-liuoksella 5 minuutin ajan, sen jälkeen huuhdeltiin tislattulla vedellä ja käsiteltiin 1,2 M HCl-liuoksella 5 minuutin ajan. Tämän jälkeen huuhdottiin jälleen tislattulla vedellä, jonka jälkeen 20 µl väkevää suolahappoa laitettiin kultaelektrodin päälle minuutin ajaksi. Lopuksi huuhdottiin kvartsikide etanolilla, tislattulla vedellä ja ilmakeivattiin. Puhdas kvartsikide upotettiin absoluuttisesta etanolista valmistettuun 10 mM tioli- tai sulfidiliuokseen vuorokaudeksi. Käsittelyn jälkeen kide huuhdottiin etanolilla ja annettiin kuivua. Pinnan aktivoimiseksi lisättiin tämän jälkeen 100 µl tislattuun veteen valmistettua 46 mM EDC- ja 46 mM NHS-liuosta peräkkäin samalla varovasti sekoittaen. Reagenssien annettiin reagoida kiteen pinnalla tunnin. Sen jälkeen pinta huuhdottiin tislattulla vedellä ja fosfaattipuskurilla. 10 µl vasta-aineliuosta lisättiin aktivoituneen kidepinnan päälle ja annettiin vaikuttaa 60 min. Pinta huuhdeltiin lopuksi fosfaattipuskurilla. Vasta-aineliuos sisälsi 500-1000 µg kanin seerumin proteiineja, jossa joukossa oli CAP vasta-aineita.

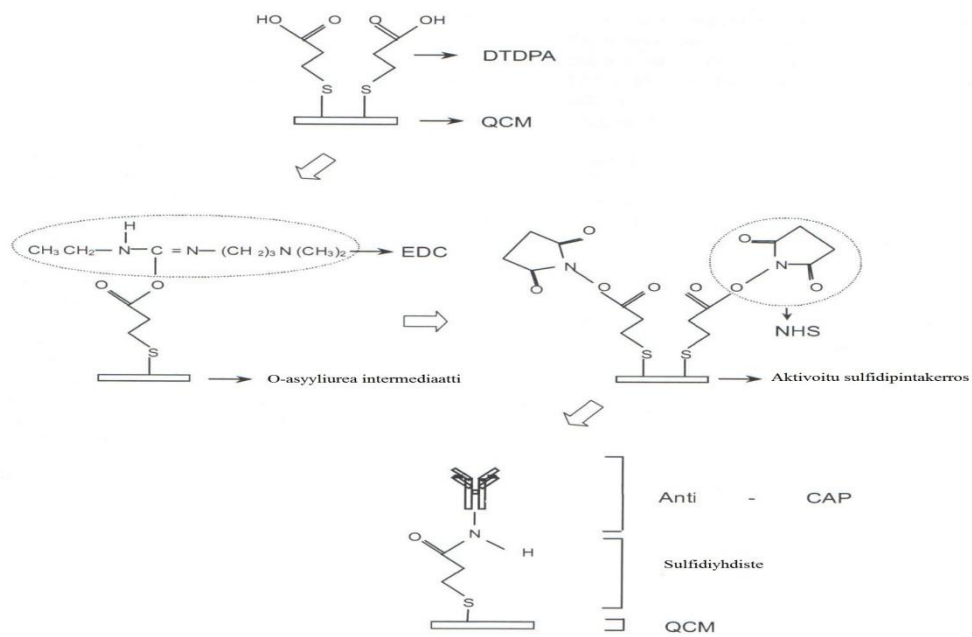
Tutkimuksessa käytettiin kuutta eri tioli- tai sulfidiyhdistettä anti-CAP vasta-aineiden kiinnittämiseksi kvartsikiteen kultaelektrodin pintaan. Nämä yhdisteet on esitetty rakenteineen kuvassa 16. Valmistettiin siis anti-CAP SAM-pinta kuudella eri tioli- tai sulfidiyhdisteellä. Näissä yhdisteissä on yhteistä terminaalinen karboksyyli-ryhmä, johon EDC/NHS pääsee reagoimaan. Karboksyyli-ryhmä korvataan näin ollen anti-CAP vasta-aineella. Reaktion eteneminen DTDPA:n osalta on esitetty kuvassa 17.

Nähdäkseen kuinka erilaiset tioli/sulfidi yhdisteet vastaavat CAP-molekyyleihin, tutkijaryhmä valmisti liuoksen, joka sisälsi 0,05 M CAP-yhdistettä. Jokaisella kuudella eri SAM-pinnalla varustettu kvartsikide ajettiin tällä liuoksella. Näistä ajoista saadut tulokset ovat kuvassa 18. MPA-muokatun pinnan kuvaaja (f) on parhaimman muotoinen. Toistuvan käytön aiheuttamat herkkyysmuutokset voivat olla ongelma monimutkaisissa SAM-rakenteissa. Yleisesti ottaen QCM-sensorisirut ovat melko pitkäikäisiä ja niitä voidaan käyttää regeneroimalla siru laimealla hapolla tai emäksellä. Taulukossa 5 on esitetty SAM-pinnan herkkyyskehitys kahdeksan peräkkäisen ajon ja kaikkien kuuden yhdisteen osalta. Taulukon 5 perusteella parhaiten CAP-herkkyys säilyttää MPA-modifioitu pinta, jossa 8. ajon herkkyys on melkein 90 % ensimmäisestä ajosta kun se esimerkiksi TSA:lla on vain 50,5 %. MPA-modifioituneen SAM-pinnan

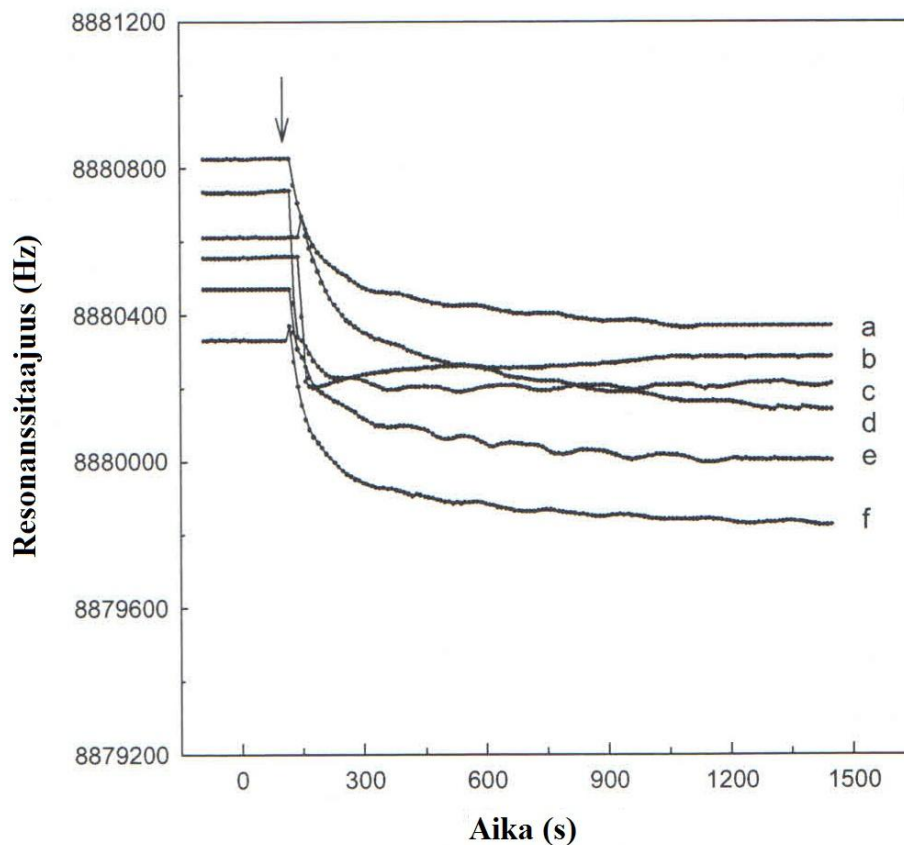
mittausten perusteella tehty kalibraatiokäyrä on esitetty kuvassa 19. Näiden todisteiden valossa MPA-SAM on paras yhdistelmä CAP-yhdisteen kvantitointiin.

Numero	Tioli tai sulfidiyhdiste	Kemiallinen rakenne
1	<b>Tioktiinihappo (TCA)</b>	
2	<b>Tiosalisyylihappo (TSA)</b>	
3	<b>Tiodiglykolihappo (TDGA)</b>	
4	<b>Tiodipropaanihappo (TDPA)</b>	
5	<b>3,3-Ditiolidipropaanihappo (DTDPA)</b>	
6	<b>3-Merkaptopropaanihappo (MPA)</b>	

**Kuva 16.** CPA-sensorin valmistuksessa käytetyt tioli- ja sulfidiyhdisteet. Näiden yhdisteiden avulla saatuja SAM-pintoja vertailtiin toisiinsa.<sup>57</sup>



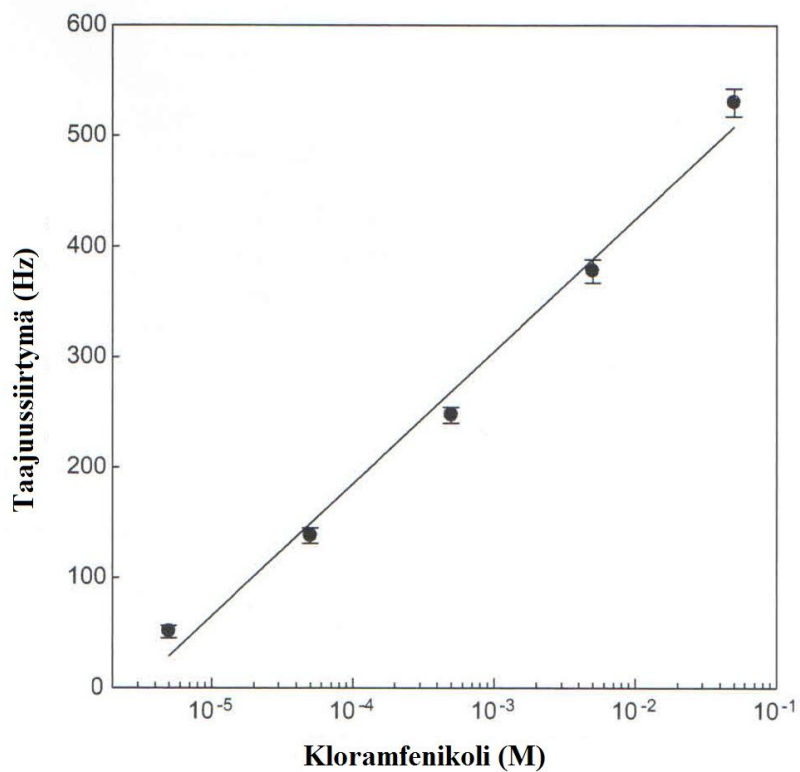
**Kuva 17.** Anti-CAP ryhmän liittäminen QCM-SAM pintaan. Esimerkkinä DTDPA.<sup>57</sup>



**Kuva 18.** CAP-sensorin taajuusvaste kullekin tioli/sulfidiyhdisteelle. CAP-yhdisteen pitoisuus 0,05 M. Yhdisteet a) TDPA, b) TCA, c) TSA, d) DTDPA, e) TDGA ja f) MPA. Nuoli kuvaa injektointihetkeä.<sup>57</sup>

**Taulukko 5.** CAP-sensorin detektointiherkkyys toistuvassa käytössä. Kuuden eri tioli/sulfidiyhdisteen vertailu. Parhaimmat arvot antanut MPA lihavoitu.<sup>57</sup>

Kokeen numero	Herkkyyssuhteessa alkutilaan (%)					
	TCA	TSA	TDGA	TDPA	DTDPA	<b>MPA</b>
1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>
2	80,8	85,6	89,8	93,8	88,2	<b>97,2</b>
3	81,8	77,7	89,3	89,1	82,9	<b>95,7</b>
4	79,3	74,4	85,5	77,7	83,9	<b>94,5</b>
5	76,8	76,4	79,6	76,7	78,0	<b>95,0</b>
6	72,2	58,0	80,1	76,7	78,6	<b>92,5</b>
7	70,7	53,1	75,8	74,1	76,1	<b>90,0</b>
8	65,7	50,5	75,3	71,0	72,1	<b>88,7</b>



**Kuva 19.** CAP-konsentraatioiden ja taajuusmuutosten välinen suhde MPA-muokatun SAM-pinnan sensorilla. Mittaukset tehtiin kolmeen kertaan ja keskiarvoitettiin. Kuvaajaan on merkitty myös virhepalkit.<sup>57</sup>

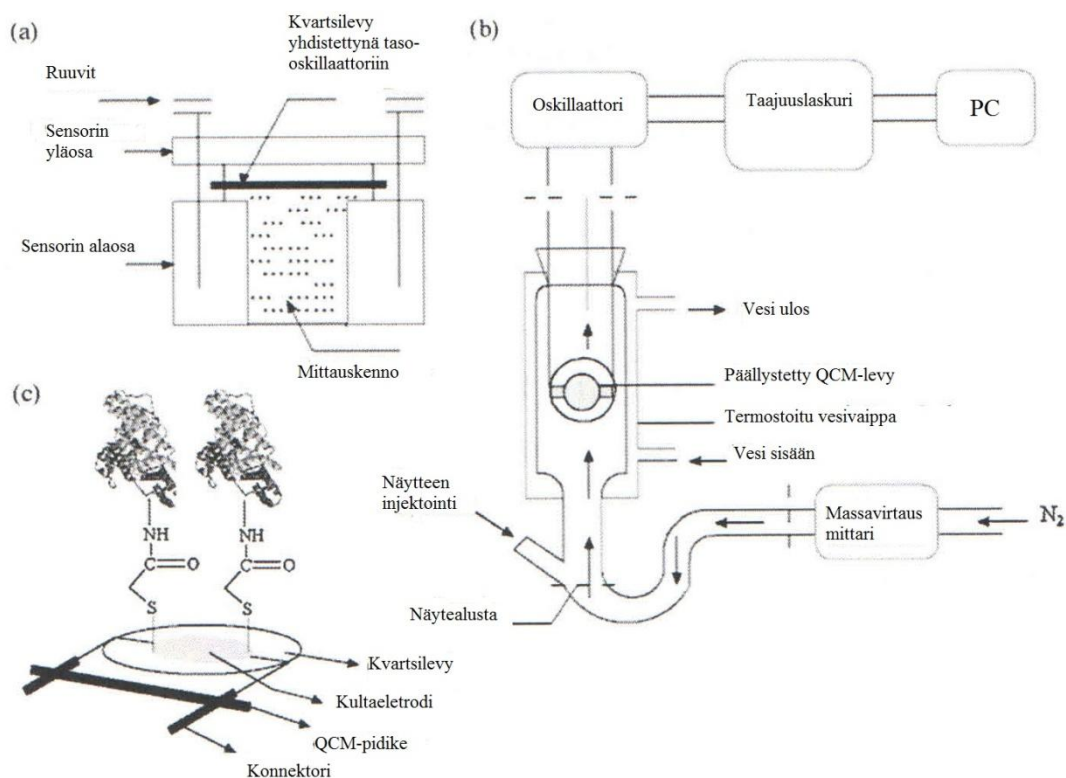


### 5.3 Kiraalisten enantiomeerien nopea erottaminen kvartsikidemikrovaaka-biosensorilla

Elävät organismit sisältävät valtavan määrän biologisia makromolekyylejä. Näiden joukosta proteiinit ja entsyymit noudattavat luonnollista enantioselektiivisyyttä. Seerumin albumiinit ovat verenkierroelimistön yleisimpiä proteiineja, jotka ylläpitävät normaalia plasman osmoottista painetta. Erityiset albumiinien pyöreät rakenteet, jotka koostuvat kolmesta hydrofobisesta alueesta sitovat ja kuljettavat endogeenisiä ja eksogeenisiä aineita palautuvien ei-kovalenttisten sidosten kautta. Vaikka QCM-tekniikkaa on harvoin sovellettu kiraaliseksi biosensoriksi, Wen Cui Su työryhmineen kehitti tähän perustuvan QCM-pohjaisen sensorin.<sup>58</sup>

Su:n työryhmän kehittänyt laitteisto koostui kahdesta QCM-laitteistosta. Toinen oli vesifaasissa olevia yhdisteitä varten ja toinen kaasufaasissa mitattavia yhdisteitä varten. QCM-laitteistojen sensorisirun halkaisija oli 13,0 mm ja resonanssitaajuus 10 Mhz. Albumiini kiinnitettiin kullan pintaan kappaleessa 5.2 kuvatulla tavalla tioliyhdisteiden karboksyylihapporyhmiä hyödyntäen. Kaasumittauksissa käytettiin typpikaasua näytteen haihduttamiseen. Typpivirtauksen taso oli  $250 \pm 2 \text{ ml min}^{-1}$ . Enantiomeerit erotettiin QCM-tekniikalla ja detektoitiin sekä fluoresenssispektroskopiolla että UV-spektroskopiolla.<sup>58</sup>

Kuvassa 20 on esitetty tutkimuksessa käytetty laitteisto. Kuvassa 20 on myös havainnekuva QCM-sensorisirusta. SAM-pinnalle liitettiin joko naudan seerumialbumiinia (BSA) tai ihmisen seerumialbumiinia (HSA). Näiden kahden pinnan kiraalista erotustekijää verrattiin keskenään. Taulukossa 6 on esitetty saadut erotustekijät ja tutkitut enantiomeerit sekä UV- että fluoresenssimittauksista. Taulukon 6 perusteella voidaan todeta, että UV-mittauksissa BSA-sensori erotti paremmin R,S-4-MPEA ja R,S-3-MPEA-enantiomeerit kuin HSA-sensori. Toisaalta HSA-sensori erotti paremmin TNA-, OT- ja MEL-enantiomeerit. Fluoresenssilla mitattuna tulokset olivat samankaltaisia lukuun ottamatta TNA ja MEL yhdisteitä. Näille erotustekijät olivat likimain samat sekä BSA- että HSA-sensoreilla. QCM-mittauksista saadut erotustekijät ovat taulukossa 7. Tutkimuksessa tutkittiin aromaattisia ja neutraaleja molekyylejä ja tulevaisuudessa on haasteena erottaa enantiomeereja myös aminohapoista ja hiilihydraateista.



**Kuva 20.** Enantiomeerien erotuksessa käytetty laitteisto. Kohta a) vesifaasissa olevien näytteiden mittausjärjestely, b) kaasufaasimittaus ja c) 10 MHz kvartsikide-elektrodi.<sup>58</sup>

**Taulukko 6.** Enantiomeerien mittauksista saadut erotustekijät.<sup>58</sup>

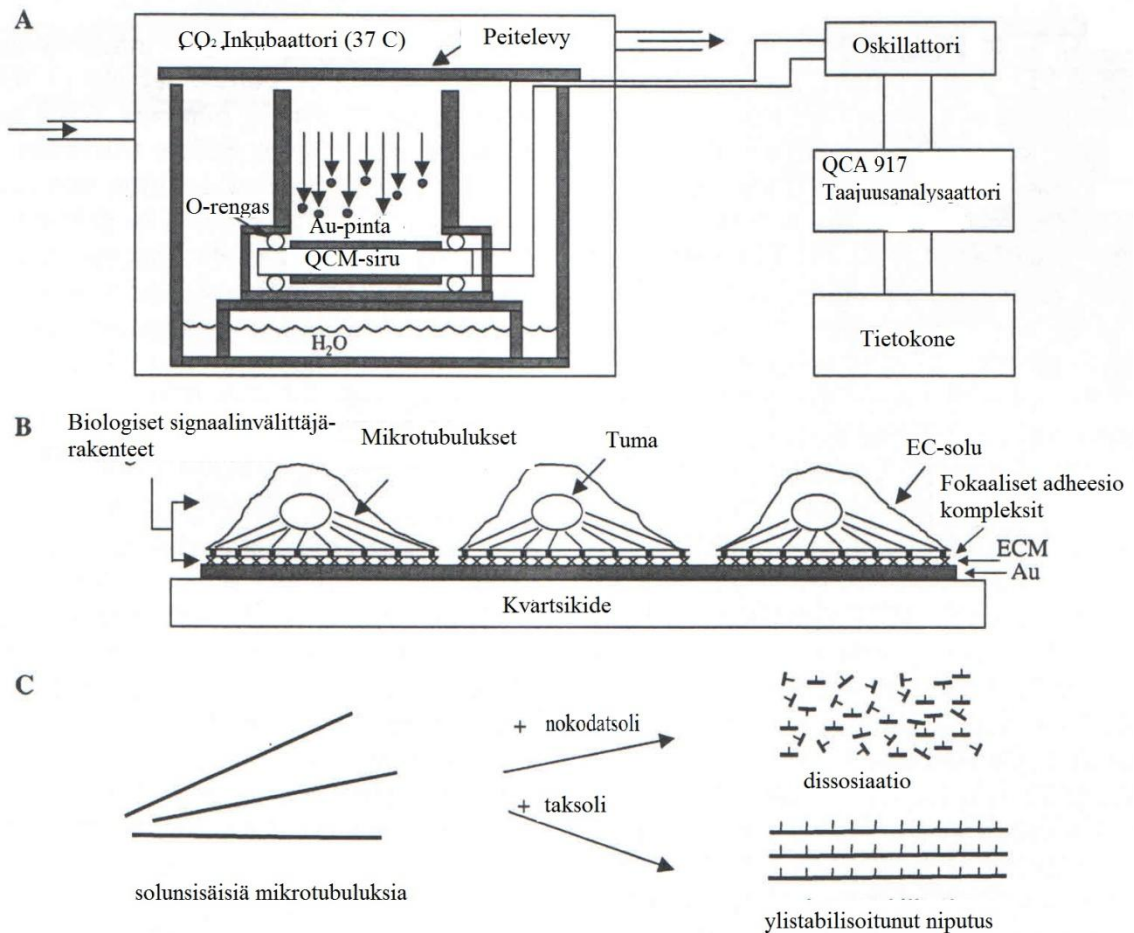
Enantiomeeri ja yhdisteen nimi	BSA / UV-mittausten erotustekijä $\alpha_{UV}$	HSA / UV-mittausten erotustekijä $\alpha_{UV}$	BSA / Fluoresenssimittaus ten erotustekijä $\alpha_{FL}$	HSA / Fluoresenssimittausten erotustekijä $\alpha_{FL}$
R,S-tetrahydronaftyyliamiini (R,S-TNA)	0,68	0,71	0,91	0,86
R,S-1-(4-metoksifenyyli)etyyliamiini (R,S-4-MPEA)	0,31	0,17	0,49	0,15
R,S-1-(3-metoksifenyyli)etyyliamiini (R,S-3-MPEA)	0,17	0,029	0,15	0,017
R,S-2-oktanoli (R,S-2-OT)	0,079	0,14	0,089	0,13
R,S-metyylilaktaatti (R,S-MEL)	0,049	0,058	0,066	0,065

**Taulukko 7.** QCM-mittauksista saadut enantiomeerien erotustekijät.<sup>58</sup>

Enantiomeeri	BSA / QCM- mittausten erotustekijä $\alpha_{\text{QCM}}$	HSA / QCM- mittausten erotustekijä $\alpha_{\text{QCM}}$
R,S-TNA	1,34	1,57
R,S-4-MPEA	1,2	1,18
R,S-3-MPEA	1,16	1,06
R,S-2-OT	1,15	1,16
R,S-MEL	1,11	1,13

#### **5.4 Kvartsikidemikrovaaka biosensorina solutukirankaan sitoutuvien lääkeaineiden tutkimuksessa**

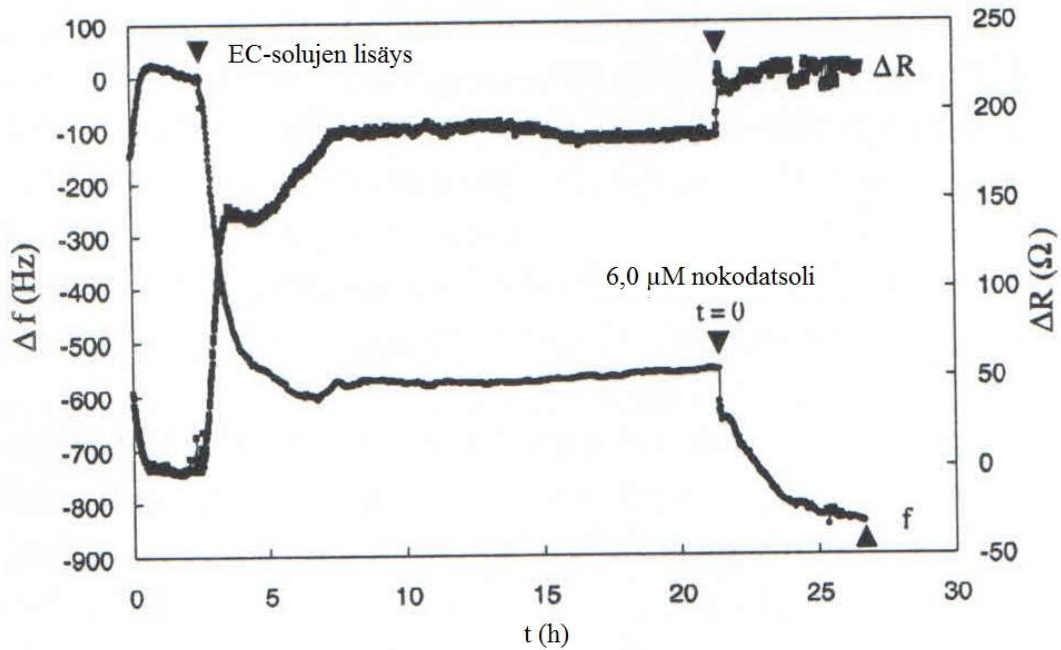
Kehittyneiden tekniikoiden ansiosta kokonaisten solujen käyttö biosensorisovelluksissa on lisääntynyt. Kokonaisten solujen käyttö yksittäisten biomolekyylien sijasta mahdollistaa solun sisällä tapahtuvien reaktioiden hyödyntämisen. Solujen avulla voidaan kehittää entistä älykkäämpiä ja monimutkaisempia systeemejä biosensorikäyttöön. Marx työryhmineen<sup>59</sup> kehitti menetelmän, jolla kahta solujen mikrotubuluksiin sitoutuvaa lääkettä, nokodatsolia ja taksolia, tutkittiin QCM-sovelluksen avulla. Taksolia käytetään muun muassa rinta- ja munasarjasyövän hoidossa. Nokodatsoli heikentää endoteelisolujen (EC) rakennetta ja riittävällä pitoisuudella myös hajottaa niitä. Marx työryhmineen käytti EC-soluja QCM-sensorin pinnalla ja tutki näiden kahden lääkeaineen pitoisuuden vaikutusta EC-soluihin. Kuvassa 21 on esitetty tutkimuksessa käytetty QCM-laitteisto ja sensoripinnan rakenne. Kuvassa 21 on myös havainnollistettu mikrotubulusten reagointi tutkittuihin lääkeaineisiin.<sup>59</sup>



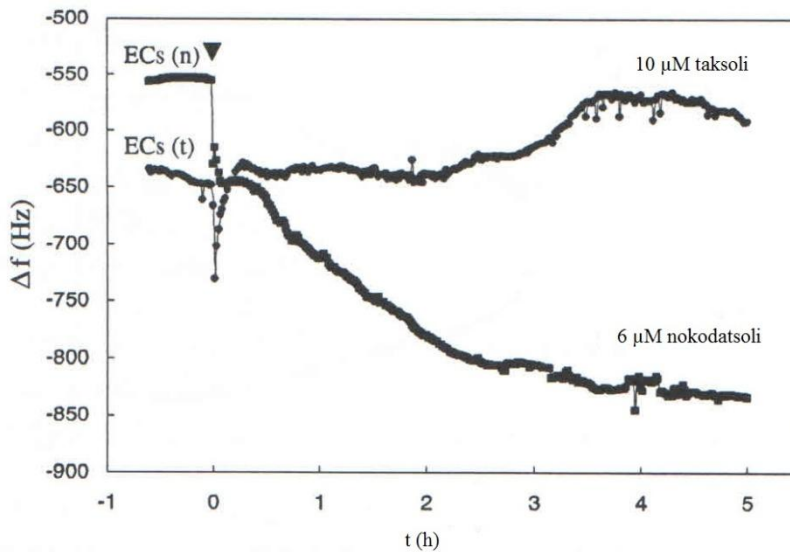
**Kuva 21.** A) QCM-solu biosensori systeemi kokonaisuudessaan, B) EC-QCM biosensorin kvartsikiteen pinta ja signaalinvälittäjät ja C) nokodatsolin ja taksolin kanssa vuorovaikuttavat mikrotubulukset.<sup>59</sup>

QCM-mittauksissa käytettiin AT-leikattua kvartsikidettä, jonka resonanssitaajuus oli 8,85 MHz (kulta elektrodi, 5 mm halkaisija). Kullan pinta sterilisoitiin ja huuhdeltiin tislattulla vedellä ja fosfaattipuskurilla (PBS). Huuhtelun jälkeen elektrodin pinnalle lisättiin 52  $\mu\text{l}$  liuosta, joka sisälsi 10 % vasikan seerumia (CS). Sen jälkeen elektrodi laitettiin inkubaattoriin, jonka sisällä oli 10 %:n  $\text{CO}_2$ -pitoisuus. Kahden tunnin jälkeen stabiilit mittausravot otettiin lähtöarvoiksi ja lisättiin 250  $\mu\text{l}$  10 % CS-liuosta, jossa oli tutkittuja EC-soluja. Solujen annettiin asettua 24 tuntia. Solujen asettumisen jälkeen QCM-sirun pinnalta otettiin pois 50  $\mu\text{l}$  liuosta ja lisättiin 50  $\mu\text{l}$  liuosta, jossa oli dimetyylisulfoksidiin (DMSO) liuotettuna 1  $\mu\text{l}$  nokodatsolia tai taksolia. Nokodatsolin

vaikutusta EC-QCM biosensoriin on esitetty kuvassa 22. Kuten kuvasta 22 nähdään, värähtelytaajuus laskee noin 300 Hz kun nokodatsoli lisätään.



**Kuva 22.** EC-QCM biosensorin reagointi 20 000 EC-solun lisäykseen ja 6,0  $\mu\text{M}$  nokodatsoliin. Taajuuden ja resistanssin muutosta mitattiin jatkuvasti kunnes vakaan tilan merkit oli nähtävissä.<sup>59</sup>



**Kuva 23.** Nokodatsolin ja taksolin vaikutus EC-QCM biosensoriin. ECs (n) kuvaa nokodatsolin mittausta ja ECs (t) taksolin mittausta.<sup>59</sup>

Nokodatsolin ja taksolin vaikutuksen vertailu on esitetty kuvassa 23. Kuvasta nähdään, että taksolin vaikutuksesta värähtelytaajuus kasvaa ja nokodatsolin vaikutuksesta pienenee. Tämä voi johtua siitä, että nokodatsoli hajottaa mikrotubulusten (EC) rakennetta, kun taas taksoli ei vaikuta EC-rakenteeseen yhtä voimakkaasti, kuten kuvasta 21 voidaan todeta.

Tutkimuksen vahvuuksina voidaan pitää sitä, että kehitettiin QCM-tekniikkaan perustuva lääkeaineita määrittävä biosensori. Tällä sovelluksella voisi olla käyttöä esimerkiksi patologille syöpätyypin määrittämisessä tai syöpälääkärille sopivan kemoterapiahoidon valitsemisessa. QCM-sirun pinnalle voidaan kiinnittää myös muita soluja, jotka pystyvät ankkuroitumaan kullan pintaan. Suurimmiksi puutteiksi havaittiin mittausten kesto ja ennen kaikkea se, ettei biosensori ole palautuva. Sen seuraus on se, että valmistetulla pinnalla voidaan tehdä vain yksi mittaus näissä olosuhteissa. Jatkossa tärkeää on biosensorin uudelleenkäyttömahdollisuuden parantaminen.<sup>59</sup>

## **5.5 Vasta-aine määrittäminen ihmisen seerumista hyödyntämällä QCM- ja SPR-tekniikoita**

Antigeeni-vasta-aine vuorovaikutusten tutkiminen on tärkeää, sillä autoimmuunisairaudet johtuvat monesti muutoksista näissä vuorovaikutuksissa. Näitä vuorovaikutuksia voidaan hyödyntää myös autoimmuunisairauksien diagnostiikassa. Ayela työryhmineen<sup>60</sup> tutki IA-2-proteiinia ja sen vasta-aineita QCM- ja SPR-tekniikoita hyödyntämällä. Ykköstyypin diabetesta sairastavilla elimistö tuottaa vasta-aineita IA-2-proteiinin tiettyjä alueita kohtaan. Ayela työryhmineen kiinnitti IA-2-proteiinista valmistetun peptidin (15 aminohappoa) ja sen polyklonaalisen anti-peptidin SPR- ja QCM-sensorien pinnalle. Tutkimuksessa määritettiin toteamisraja ihmisen seerumista määritetyille vasta-aine/anti-peptidi -parille. SPR-laitteisto oli BIACORE 3000 system (Biacore AB, Uppsala, Ruotsi) ja QCM-laitteisto oli QCM-D 300 (Q-sense AB, Göteborg, Ruotsi).

Taulukossa 8 on esitetty tutkimuksessa käytetyt yhdisteet ja valmistetut SAM-pinnat lyhenteineen.

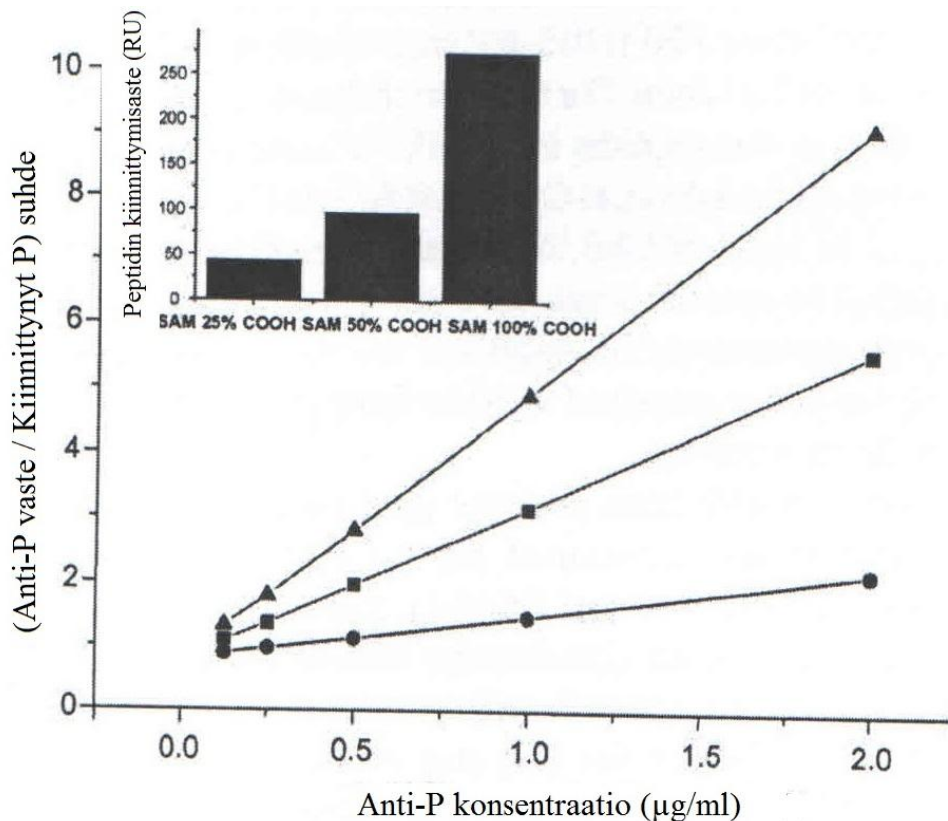
**Taulukko 8.** Ayelan työryhmän käyttämät yhdisteet ja SAM-pinnat.<sup>60</sup>

<b>Yhdisteet</b>	<b>Lyhenne</b>
N-hydroksisukkinimidi	NHS
N-etyyli-N'-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodiimidi	EDC
2-(2-pyridiyyliditioli)etaaniamiini	PDEA
11-merkaptoundekaanihappo	MUA
11-merkpto-1-undekanoli	MUD
Polyetyleeniglykoli-johdos	HSC11-EG6OCH2COOH
Polyetyleeniglykoli-johdos	HSC11-EG6
<b>SAM-pinnat</b>	
100 % 11-MUA	SAM <sub>100%COOH</sub>
50 % 11-MUA / 50 % 11-MUD	SAM <sub>50%COOH</sub>
25 % 11-MUA / 75 % 11-MUD	SAM <sub>25%COOH</sub>
<b>SAM-pinnat seerumimäärityksiin:</b>	
100 % HSC11-EG6OCH2COOH	EG <sub>6</sub> -SAM <sub>100% COOH</sub>
50 % HSC11-EG6OCH2COOH / 50 % HSC11-EG6	EG <sub>6</sub> -SAM <sub>50% COOH</sub>
25% HSC11-EG6OCH2COOH / 75 % HSC11-EG6	EG <sub>6</sub> -SAM <sub>25% COOH</sub>

Peptidien kiinnitys SAM-muokattuihin kultapintoihin tehtiin seuraavasti. Ensin 10 µl 0,1M NHS:n ja 0,02 M EDC:n seosta lisättiin SAM-pinnan karboksyylihapporyhmien aktivoimiseksi. Aktivoinnin jälkeen lisättiin 20 µl 80 mM PDEA-liuosta (100 mM boraattipuskurissa, pH=8,5). Näiden kahden vaiheen jälkeen lisättiin Hepes-puskuria (pH 7,4, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl ja 0,005 % P20 ionitonta pinta-aktiivista ainetta, HBS-EP) 5 µL/min nopeudella. Kiinnitysvaiheessa peptidin 100 µg/ml liuosta (10 mM asetaattipuskuri, pH 3) injektoidiin 10 µL/min. 50 mM L-kysteiiniä (0,1 M natriumformiaattipuskuri, 1M NaCl, pH 4,3) käytettiin ylimääräisten reaktiivisten ryhmien deaktivoimiseksi. Spesifinen proteiini P ja kontrollipeptidi T kiinnitettiin kahteen eri virtauskennoon. Kolmannelle kennolle tehtiin sama käsittely, mutta ilman peptidiä.

Analyyseissä käytetty ihmisen seerumi laimennettiin 1:100 Hepes-puskuriin (HBS-EP). QCM-mittauksissa osaan näytteistä lisättiin sarkosyyliä (pinta-aktiivista ainetta) 0,25, 0,5 ja 1 %. Tällä tavoin saatiin tutkittua kiinnitetyn peptidikerroksen epäspesifistä sitoutumista. Taulukossa 8 mainittujen SAM-pintojen ominaisuuksia on vertailtu kuvassa 24. Kuvassa 24 on kolmen eri SAM-pinnan hydroksyyli- ja karboksyyli-ryhmien suhteilla saadut vasteet anti-peptidi P:n sitoutumisesta peptidi P-

muokattuun SAM-pintaan. Parhaat tulokset saadaan SAM-pinnalla, jossa on 25 % karboksyyliiryhmiä ja 75 % hydroksyyliiryhmiä. Tämä ilmiö selittyy muun muassa näiden ryhmien kokoerona. Karboksyyliiryhmät ovat kooltaan suurempia ja näin steerisesti estävät anti-peptidin sitoutumista SAM-pintaan.

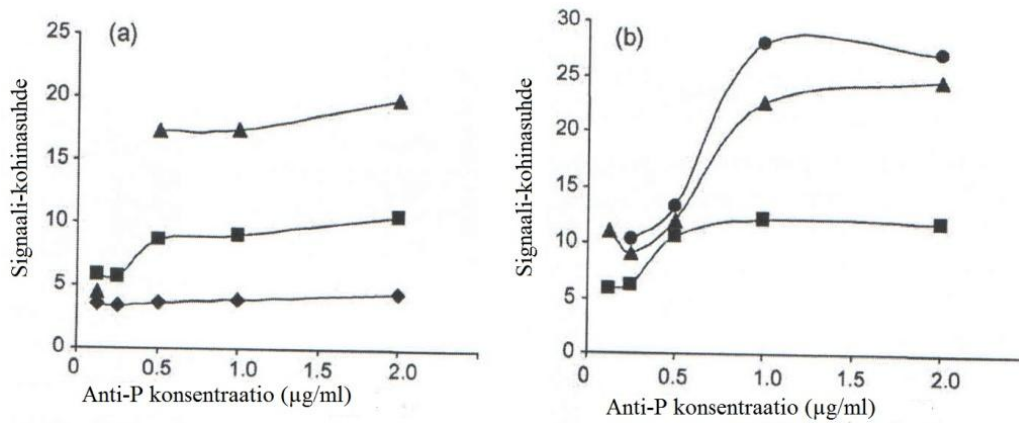


**Kuva 24.** Anti-peptidi P:n sitoutumisen vaste erilaisiin SAM-pintoihin, joihin peptidi P oli sidottu. Kolmio kuvaa 25 % COOH-ryhmiä sisältävää SAM-pintaa, neliö kuvaa 50% COOH-ryhmiä sisältävää SAM-pintaa ja ympyrä 100 % COOH-ryhmiä sisältävää SAM-pintaa. Anti-peptidi P:n konsentraatio oli välillä 0,125-2 µg/ml.<sup>60</sup>

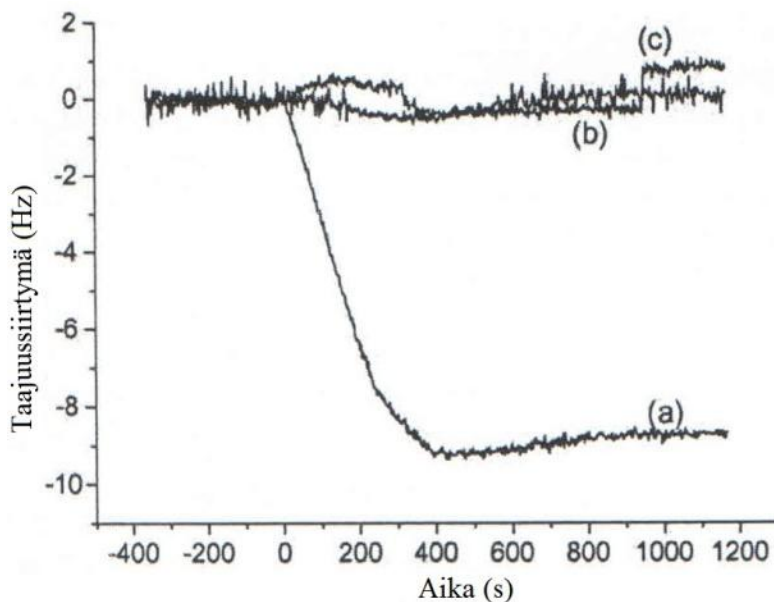
Kuvassa 25 on verrattu taulukon 8 SAM-pintoja signaali-kohinasuhteen (S/N) avulla. Kuvasta 25 voi todeta, että polyetyleeniglykoli-suojatut SAM-pinnat tuottavat paremmat tulokset estämällä epäspesifistä adsorptiota. Kuvan 25 kuvaajista havaitaan myös, että vasta-aine pitoisuuden kasvaessa S/N-suhde paranee. Tämä voi johtua siitä,



että epäspesifinen sitoutuminen kasvaa hitaammin kuin spesifinen sitoutuminen vasta-ainepitoisuuden noustessa.



**Kuva 25.** a) Suojaamattomien SAM-pintojen signaali-kohinasuhde, SAM-pintojen koostumukset kolmio = 25 % COOH, neliö = 50 % COOH, ruutu = 100 % COOH, b) vastaavien SAM-pintojen EG6-johdokset, ympyrä = 25 % COOH, kolmio = 50 % COOH ja neliö 100 % COOH.<sup>60</sup>



**Kuva 26.** QCM-D mittaukset anti-peptidi P:n vasta-ainevuorovaikutuksille, a) anti-peptidi P:n vasta-aineen sitoutuminen peptidiin P, b) anti-peptidi P:n vasta-aineen sitoutuminen peptidiin T, c) anti-peptidi T:n vasta-aineen sitoutuminen peptidiin P.<sup>60</sup>

Kuvasta 26 nähdään, että vasta-aineen sitoutuminen on hyvin spesifistä. Anti-peptidi P:n vasta-aine ei sitoudu muuhun kuin peptidiin P. QCM-D –mittauksissa käytettiin lähes samoja parametrejä BIACORE –laitteen kanssa. Voidaan todeta, että SPR-menetelmä toimii myös QCM-D –laitteella. Valitettavasti QCM-D –laitteen herkkyys ei vielä tämän tutkimuksen perusteella riitä vasta-aineiden määrittämiseen seerumista. Kuitenkin SPR-laitteiston avulla toteamisrajaksi saatiin 0,2 nM ihmisen seerumista (laimennus 1:100). Kalibroitamiseksi lineaarinen alue oli konsentraatioalueella 0,2-13,3 nM. Tarvitaan kuitenkin vielä paljon kehitystä ennen kuin QCM-sensoreilla päästään yhtä alhaisiin toteamisrajoihin vasta-aineanalytiikassa.

## **Kokeellinen osa II: Kapillaarielektrokromatografia matalatiheyksisen lipoproteiinin tutkimuksessa**

### **6 Työn tavoite**

Tämän pro gradu –tutkielman kokeellisen osan tarkoituksena oli selvittää kapillaarielektrokromatografisesti (CEC) sokereilla käsitellyn LDL:n stabiilisuutta kapillaarin päällystämässä sekä LDL-päällysteen lipidien poiston ja hapettumisen aiheuttamia muutoksia LDL-partikkeleissa. Muutosten havaitsemiseksi hyödynnettiin elektro-osmoottista virtausta (EOF). Kolmen, malliaineina käytettyjen steroidien avulla saatiin selvyyttä päällysteen hydrofobisuudesta ja elektro-osmoottisen virran avulla tietoa LDL:n varauksesta. Näiden päällysteessä tapahtuvien muutosten perusteella määritettiin stabiileimmat sokeri-LDL pinnoitteet sekä tutkittiin erilaisia mahdollisuuksia stabiilin päällysteen valmistamiseksi. Osittainen lipidien poisto LDL-partikkeleista mahdollisti apolipoproteiini B-100 (apoB-100)-steroidi vuorovaikutustutkimukset ja vertailun aikaisemmin raportoituihin tuloksiin.

## 7 Tutkitut yhdisteet

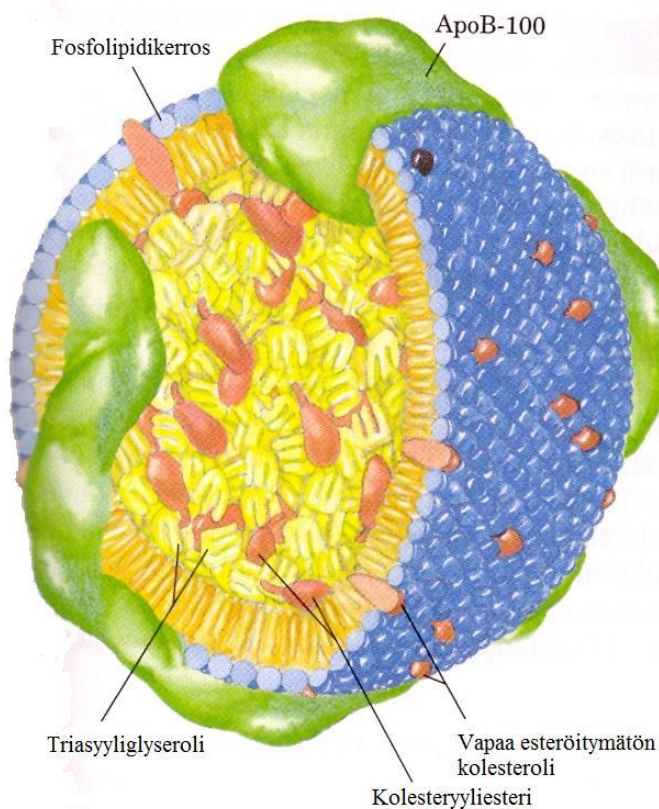
### 7.1 Lipoproteiinit

Lipoproteiinien päätehtävänä on kuljettaa veteen liukenemattomia kolesterolia ja kolesteroliesteriä soluihin ja kudoksiin, joissa niitä varastoidaan tai käytetään energianlähteinä. Lipoproteiinit ovat pyöreän muotoisia makromolekyylejä, jotka koostuvat spesifisistä kantajaproteiineista eli apolipoproteiineista ja fosfolipideistä, kolesterolista, kolesteroliestereistä sekä triasyyliglyserolista.<sup>61</sup> Lipoproteiinit voidaan jakaa kokonsa ja koostumuksensa perusteella viiteen eri luokkaan: kylomikronit, hyvin matalatiheyksiset lipoproteiinit (VLDL), keskitiheyksiset lipoproteiinit (IDL), matalatiheyksiset lipoproteiinit (LDL) ja korkeatiheyksiset lipoproteiinit (HDL). HDL-partikkelit voidaan vielä edelleen jakaa tiheyden perusteella kahteen alaluokkaan, jotka ovat HDL<sub>2</sub> ja HDL<sub>3</sub>. Näistä luetelluista lipoproteiineista HDL<sub>3</sub>:n tiheys on suurin, 1,210 g/ml.<sup>62</sup> Yllä luetellut lipoproteiinit ovat kokojärjestyksessä suurimmasta pienimpään halkaisijan vaihdellessa kylomikronien 50-200 nanometristä aina HDL:n 7-12 nanometriin.<sup>63,64</sup>

Lipoproteiinin ydin on yleensä triasyyliglyserolien ja kolesteroliesterien muodostama, ja tätä ydintä ympäröi hydrofiilinen fosfolipidikalvo. Fosfolipidikalvon hydrofobiset osat ovat suuntautuneet kohti ydintä ja kalvon pintaan on kiinnittyneenä apolipoproteiineja. Näitä apolipoproteiineja tunnetaan ainakin 10 erilaista ja ne huolehtivat muun muassa lipoproteiinipartikkelin kiinnittymisestä solun pintareseptoreihin sekä aktivoivat tai inhiboivat partikkelin käsittelyyn osallistuvia entsyymejä, muun muassa lipoproteiinilipaasia, solun sisällä. Kylomikroneissa on esimerkiksi yhtenä viidestä apolipoproteiinista apoB-48 ja LDL-partikkeleissa on yksi apoB-100, apolipoproteiineista suurin ( $M \approx 513000 \text{ g/mol}$ ), kietoutuneena fosfolipidikalvon ympärille.<sup>61</sup>

### 7.1.1 Matalatiheyksiset lipoproteiinit

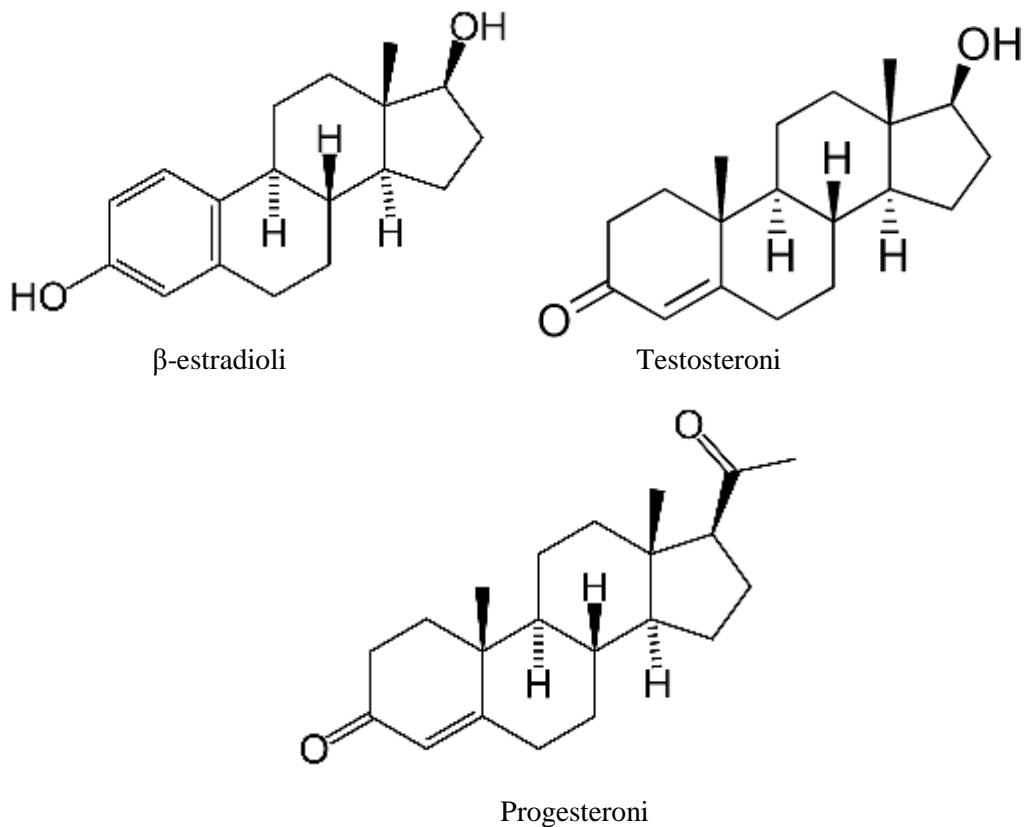
LDL-partikkelit ovat noin 20-25 nm:n kokoisia pyöreän muotoisia lipoproteiineja, jotka huolehtivat kolesterolin kuljettamisesta verenkierrosta soluihin. Partikkelin pinta koostuu esteröitymättömästä kolesterolista sekä fosfolipideistä, jotka ovat fosfatidyylikoliini ja spingomyeliini. Lisäksi LDL-partikkelia ympäröi apoB-100 polypeptidi. LDL-partikkelin tiheys vaihtelee arvosta 1,006 g/ml arvoon 1,063 g/ml. Apolipoproteiini apoB-100 varmistaa partikkelin pääsyn soluun sitoutumalla solun pinnan LDL-reseptoreihin. Kun partikkeli pääsee soluun, se hajoaa entsyymien toimesta ja soluun vapautuu muun muassa aminohappoja, rasvahappoja ja kolesterolia.<sup>65</sup> Jos kolesterolia kertyy esimerkiksi ravinnon mukana elimistöön enemmän kuin sitä tarvitaan membraanien rakentamiseen ja steroidien synteesiin, syntyy verisuonen sisäpintaan vähitellen kolesterolista koostuva plakki. Muodostunut plakki voi kasvaa ja ahtauttaa verisuonia, jolloin tätä tilaa kutsutaan ateroskleroosiksi.<sup>61</sup> Kuvassa 27 on esitetty LDL-partikkelin rakenne pääpiirteissään.



**Kuva 27.** LDL-partikkelin rakenne.<sup>61</sup>

## 7.2 Steroidit

Työssä käytettiin kolmea steroidia kapillaarin pinnoitteen hydrofobisuuden selvittämiseksi. Steroidit olivat  $\beta$ -estradioli, testosteroni sekä progesteroni, joista progesteroni on hydrofobisin yhdiste. Seuraamalla näiden hormonien vuorovaikutusta kapillaarin pinnoitteen kanssa, saatiin tietoa hydrofobisuuden muutoksista pinnoitteessa.  $\beta$ -estradiolissa on kaksi hydroksyyliyrhmää, joten se on näistä hydrofiilisin. Vastaavasti testosteronissa on yksi ja progesteronissa ei yhtään hydroksyyliyrhmää. Progesteroni säätelee naisen lisääntymissykliä ja  $\beta$ -estradioli vaikuttaa muun muassa sekundaaristen seksuaalisten ominaisuuksien kehittymiseen naisilla sekä testosteroni samaan miehillä.<sup>61</sup> Tutkittujen steroidien rakennekaavat on esitetty kuvassa 28.



**Kuva 28.** Kolmen työssä tutkitun steroidin rakennekaavat.<sup>61</sup>

### 7.3 Puskuriliuos

Puskuriliuksena kapillaarielektroforeesissa käytettiin fosfaattipuskuriliuosta. Puskuriliuokseen käytettiin fosforihappoa, vettä ja sen pH:n säätämiseen 1,0 M natriumhydroksidia. Puskuriliuoksen pH oli kaikissa mittauksissa 7,4 ja ionivahvuus  $I = 20 \text{ mM}$ . Puskurina käytettiin fosfaattia, koska haluttiin työskennellä ihmisen fysiologisessa pH-arvossa 7,4. Valmistettua fosfaattipuskuria säilytettiin +4 °C:ssa jääkaapissa ja analyyseissä käytettiin aina tuoretta puskuriliuosta.

## 8 Teoria

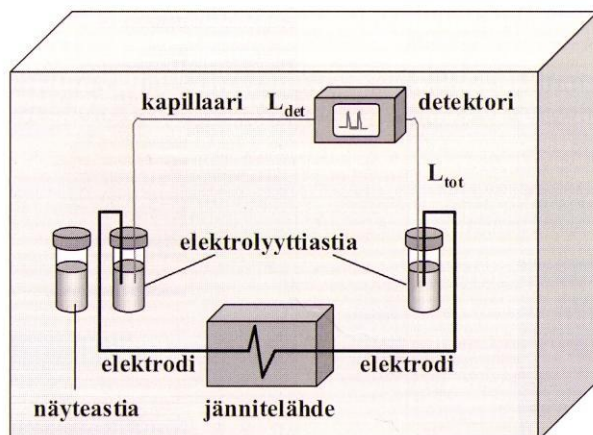
### 8.1 Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesi (CE) on analyysitekniikka, jossa sähkökentän avulla saadaan varaukselliset yhdisteet erottumaan toisistaan. Erottuminen perustuu pääasiassa yhdisteiden koko- ja varauseroihin. Koska erottuminen perustuu sähkökentän käyttämiseen, eroaa menetelmä perinteisistä kromatografisista menetelmistä. CE:n suosio on kasvanut analytiikassa paljon viimeisen kymmenen vuoden aikana sen tehokkuuden, nopeuden, erotuskyvyn sekä laitteistojen halpenemisen ja kehittymisen johdosta.

Tyypillinen kapillaarielektroforeettinen laitteisto on melko yksinkertainen. Laitteisto koostuu ohuesta, yleensä silikasta valmistetusta kapillaarista, elektrodeista, jännitelähteestä, detektorista ja tietokoneesta. Lisäksi olennaisena osana laitteistoon kuuluu elektrolyytti- ja näyteliuokset. Ohuen ja yleensä melko hauraan silikakapillaarin käyttöä helpottaa siinä käytettävä polyimidi-pinnoite kapillaarin ulkopuolella. Tämä estää kapillaarin rikkoontumisen sitä taivutettaessa. Yleisesti ottaen kapillaarin sisähalkaisija on hyvin usein 50  $\mu\text{m}$ , ja pituus alle 80 cm.<sup>66</sup>

Elektrodit on valmistettu jostakin inertistä, sähköä hyvin johtavasta metallista, kuten esimerkiksi platinasta. Elektrodit on yhdistetty korkeajännitelähteeseen, joka tuottaa

yleensä korkeintaan  $\pm 30\text{ kV}$ :n jännitteen elektrodien välille. Myös suuremmat käyttöjännitteet ovat mahdollisia. Detektoreina käytetään yleisimmin UV/VIS-detektoria tai fluoresenssidetektoria. Myös massaspektrometrin yhdistäminen laitteistoon on mahdollista. Lisäksi detektorina voidaan käyttää sähkökemiallisia detektoreita, kuten esimerkiksi johtokykydetektoria. Detektorilta lähtevät signaalit johdetaan tietokoneelle ja muutetaan numeeriseen ja graafiseen muotoon. Kapillaarin pieni sisähalkaisija saattaa aiheuttaa joskus ongelmia UV/Vis-detektointin herkkyydessä valotien pituuden lyhyden vuoksi. Nykyään on saatavilla myös kapillaareja, joiden detektointi-ikkuna on tehty leveämmäksi ja näin valotien pituus ja absorbanssi kasvaa Lambert-Beerin lain mukaisesti. Kuvassa 29 on esitetty tyypillisen CE-laitteiston kaaviokuva.



**Kuva 29.** Tyypillinen CE-laitteisto.<sup>66</sup>

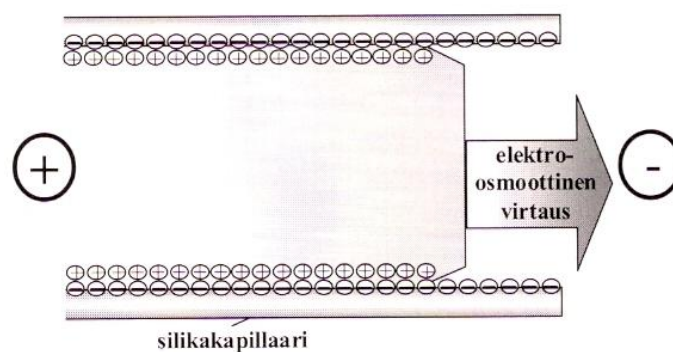
Olellaisena osana CE-tekniikoiden tehokkuudessa voidaan pitää ns. elektroosmoottisen virtauksen (EOF) muodostumista kapillaariin. Silikakapillaarin sisäpinta on silanoliryhmien dissosioitumisen vuoksi negatiivisesti varautunut. Negatiivinen varaus on sitä suurempi mitä suurempi on käytettävän elektrolyyttiliuoksen pH. Kun elektrolyyttiliuoksessa on läsnä positiivisesti varattuja ioneja, hakeutuvat ne negatiivisesti varatun sisäpinnan läheisyyteen kulombisten voimien vaikutuksesta. Tätä muodostuvaa kerrosta kutsutaan ns. Sternin kerrokseksi. Koska elektrolyyttiliuoksessa on usein runsaasti positiivisesti varautuneita ioneja, muodostuu kapillaariin myös sähkökentässä liikkuva diffuusiokerros. Sternin kerroksesta ja diffuusiokerroksesta



käytetään yhteisnimitystä sähköinen kaksoiskerros. Kun elektrolyyttiliuoksella täytettyyn kapillaariin kytketään sähkökenttä, alkaa tämä liikkuva ja positiivisesti varatuista ioneista koostuva diffuusiokerros kulkeutua kohti negatiivista katodia. Muodostuneen sähköisen kaksoiskerroksen paksuus on vain alle 10 nanometriä, jolloin liuoksen virtausprofiili on hyvin tylppämäinen.<sup>66</sup>

Koska virtausprofiili kapillaarielektroforeesissa on tylppä nestekromatografian parabolisen profiilin sijasta, saadaan huomattavasti terävämmät detektiosignaalit. Lisäksi elektro-osmoottisen virtauksen avulla saadaan kaikki ionit ja myös neutraalit yhdisteet kulkeutumaan samaan suuntaan, kunhan vain EOF on tarpeeksi nopeaa. Neutraaleja yhdisteitä ei tosin voi erottaa ilman erikoistekniikoita perinteisessä kapillaarielektroforeesissa, koska erottuminen perustuu ionisiin vuorovaikutuksiin. EOF:n nopeuteen voidaan vaikuttaa käytettävällä puskurilla, pH:lla, lämpötilalla, elektrolyyttiliuoksen ionivahvuudella sekä käytettävällä jännitteellä. EOF:n kontrollointi on hyvin tärkeää onnistuneen analyysin saavuttamiseksi.<sup>66</sup>

Käytettäessä korkeita jännitteitä ongelmaksi saattaa muodostua kasvava sähkökenttä ja sitä kautta kasvava sähkövirta. Sähkövirran kasvaessa elektrolyyttiliuoksen lämpötila nousee kapillaarin sisällä. Tätä kutsutaan Joule-lämmöksi. Kapillaarin sisään muodostuu lämpötilagradientti, eli toisin sanoen elektrolyyttiliuoksen lämpötila on keskellä kapillaaria korkeampi kuin laidoilla. Tästä aiheutuu virtausprofiilin muuttuminen paraboliseksi ja herkkyyden huonontumista. Joule-lämpö täytyy ottaa huomioon, jos kasvatetaan jännitettä erotuksen nopeuden lisäämiseksi.<sup>66</sup> Elektro-osmoottisen virran muodostuminen kapillaariin on esitetty kuvassa 30.



**Kuva 30.** Elektro-osmoottisen virtauksen muodostuminen kapillaariin.<sup>66</sup>

### 8.1.1 Kapillaarielektrokromatografia

Kapillaarielektrokromatografiassa (CEC) merkittävänä erona CE:iin nähden on kapillaarin sisäpinnan päällystäminen. CE:ssa erottuminen perustuu elektroforeettisiin mekanismeihin, kun taas CEC:ssa erottuminen perustuu sekä elektroforeettisiin että näytekomponenttien ja stationäärifaasin välisiin vuorovaikutuksiin. Kolonni voidaan pakata muun muassa samoilla materiaaleilla, joita käytetään nestekromatografiassa, esimerkiksi oktadekyyli C-18 partikkeleilla.<sup>66</sup> Kapillaarin päällystämiseen voidaan toisaalta käyttää esimerkiksi proteiineja, lipidejä ja muita biologisia makromolekyylejä, esimerkiksi LDL:a. Biologisilla molekyyleillä päällystetyn kapillaarin etuna on sen tarjoama mahdollisuus tutkia ja yrittää matkia elimistön olosuhteita sekä havainnoida päällystepartikkelien vuorovaikutuksia tutkittavien analyyttien kanssa.

Yksi merkittävä etu CEC:ssa CE:hen verrattuna on myös mahdollisuus neutraalien yhdisteiden erotukseen. Päällystäminen on usein myös melko yksinkertaista ja nopeaa. Nämä ominaisuudet sekä mahdollisuus biologisten prosessien tutkimiseen on lisännyt CEC:n käyttöä erityisesti tutkimuskäytössä viime vuosina voimakkaasti.

## 9 Työssä käytetyt laitteet

Työssä käytetyt laitteet olivat kaikki säännöllisesti huollettuja ja testattuja. Laboratoriossa oli laitteistojen kunnosta ja huollosta vastaavia henkilöitä, jotka takasivat laitteiden toiminnan luotettavuuden.

### 9.1 Kapillaarielektrokromatografia (CEC)

Kapillaarielektrokromatografiset mittaukset suoritettiin käyttämällä Hewlett-Packard <sup>3D</sup>CE -laitteistoa (Agilent, Waldbronn, Saksa), jonka detektorina käytettiin diodirividetektoria. Detektorin keräysnopeutena oli 100 Hz ja vasteaikana 0,1 s. Mittausaallonpituudet olivat 214 nm ja 245 nm. Kapillaarikasetin lämpötilaa kontrolloitiin ilmajähdytyksen avulla ja näytekarusellin lämpötilaa käyttämällä ulkoista vesihaudetta (Lauda Ecoline, Lauda-Königshofen, Saksa). Kapillaareina käytettiin päällystämättömiä silikakapillaareja, joiden sisähalkaisijat olivat 50 µm ja ulkohalkaisijat 375 µm (Optronis, Kehl, Saksa). Kapillaarien kokonaispituudet koko työn ajan olivat 38,5 cm ja detektoripäiden pituudet 30 cm. Analyyseistä saatua dataa käsiteltiin Agilentin Chemstation -ohjelman avulla. Elektrolyyttiliuosten pH säädettiin käyttäen Radiometerin valmistamaa MeterLab PHM220 pH -mittaria (Radiometer, Kööpenhamina, Tanska). Laimennettaessa liuoksia vedellä käytettiin Milliporen valmistamia vedenpuhdistuslaitteistoja tislattun veden puhdistamiseksi (Millipore S.A., Molsheim, Ranska).

## 9.2 Reagenssit ja niiden käsittely

Tässä kappaleessa on kuvattu käytetyt reagenssit sekä niiden käsittely työn aikana.

### 9.2.1 Reagenssit

Alla olevassa taulukossa 9 on esitetty työssä käytetyt reagenssit ja niiden valmistajat.

**Taulukko 9.** Työssä käytetyt reagenssit ja niiden valmistajat.

Yhdiste	Valmistaja
Dimetyylisulfoksidi	FF-Chemicals (Yli-Ii, Suomi)
EDTA dinatriumsuola	Merck (Darmstad, Saksa)
$\beta$ -estradioli	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Yhdysvallat)
Fosforihappo 84 %	Merck (Darmstad, Saksa)
Kuparisulfaatti (CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O)	Merck (Darmstad, Saksa)
Metanoli (HPLC)	VWR International (Espoo, Suomi)
Natriumhydroksidi 1,0 M	FF-Chemicals (Yli-Ii, Suomi)
Nonidet P-40	Roche Diagnostics (Mannheim, Saksa)
Progesteroni	Merck (Darmstad, Saksa)
Testosteroni	Fluka (Zwijndrecht, Hollanti)
Vetykloridihappo, 0,1 M / 1,0 M	FF-Chemicals (Yli-Ii, Suomi)

### 9.2.2 LDL:n eristäminen plasmasta

Ihmisen LDL (tiheys 1,019-1,050 g/ml) eristettiin vapaaehtoisten luovuttajien plasmasta käyttämällä jaksottaista ultrasentrifugointia 3 mM etyleenidiamiinitetraetikkahapon (EDTA) läsnä ollessa. Aluksi kiinteää kaliumbromidia (KBr) lisättiin plasmaan, kunnes plasman tiheydeksi saatiin 1,019 g/ml. Nestepinnan päällä kelluneet VLDL- ja IDL-fraktiot poistettiin ja jäljelle jääneen liuoksen tiheydeksi säädettiin 1,050 g/ml KBr:a lisäämällä. Tämän jälkeen sentrifugoitiin 72 tuntia 35 000 minuuttikierronnopeudella Beckmanin valmistamalla Coulter type 50.2 Ti rotor –ultrasentrifugilla. Tämän jälkeen saadun liuoksen tiheys säädettiin arvoon 1,060 g/ml ja sentrifugoitiin samalla

kierrosnopeudella 24 tuntia Beckman Coulter type 80 Ti rotor –ultrasentrifugilla. Tämän jälkeen liuos dialysoitiin käyttämällä LDL puskurina suolaliuosta, jonka pH oli 7,4 ja jonka EDTA -konsentraatio oli 1 mM ja natriumkloridin konsentraatio 150 mM. pH säädettiin käyttämällä natriumhydroksidia ja lopuksi EDTA poistettiin käyttämällä PD-10 suolanpoisto kolonnia ja Dulbecon fosfaattipuskuria.

### **9.2.3 Sokerikäsitellyn LDL:n eristäminen plasmasta**

LDL-partikkelien sokerikäsitteily suoritettiin ultrasentrifugoinnin avulla käyttämällä tiheysgradienttina 20 % (w/w) sokeriliuosta. Tämä suoritettiin pipetoimalla 800 µl plasmaa 1600 µl:aan 20 % (w/w) sokeriliuosta 1,5 ml:n polykarbonaatista valmistetussa koeputkessa. Sokerina oli glukoosi, fruktoosi, sorbitoli tai sukroosi. Tätä seosta sentrifugoitii 100 000 minuuttikierronnopeudella 4 tuntia 10 min lämpötilan ollessa 20 °C käyttämällä Beckmannin TL100 Benchtop Centrifuge -laitetta. Sentrifugoinnin jälkeen näyte fraktioitiin 16 osaan ja määritettiin kolesterolin pitoisuus, jonka jälkeen näytteet olivat laimennusta vailla valmiita käyttöön. LDL:n pitoisuuden määrittämiseen käytettiin ns. Lowryn metodia, mutta sokerikäsiteltyjen partikkelien osalta menetelmää ei voitu käyttää sokerin häiritsevän vaikutuksen vuoksi.

### **9.2.4 Näytteiden valmistaminen**

Mittauksissa käytetyn plasmasta eristetyn LDL-kantaliuoksen konsentraatio proteiinin konsentraationa ilmoitettuna oli käsittelemättömän LDL:n osalta 0,602 mg/ml ja glukoosikäsitellyn LDL:n pitoisuudeksi arvioitiin 0,09 mg/ml. Glukoosikäsitellyn LDL:n pitoisuus arvioitiin käyttämällä kenttävirtausfraktiointia. Kantaliuoksia laimennettiin käytetyllä fosfaattipuskurilla siten, että pinnoituksessa käytetyn näytteen pitoisuudeksi saatiin 0,1 mg/ml tai noin 0,015 mg/ml. Tämä LDL:n päällystämiseen käytettävä pitoisuus on optimoitu aikaisemmin samoissa olosuhteissa suoritetuissa päällystyksissä.<sup>67</sup> Näytepulloon valmistettiin 100 µl näytettä, jolloin käytettiin 17 µl 0,602 mg/ml konsentraation LDL-näytettä ja 83 µl fosfaattipuskuria. Näin saatiin näyteliuoksen LDL konsentraatioksi 0,1 mg/ml.

Steroidien kantaliuokset valmistettiin laimentamalla steroidit metanoliin. Valmistetun kantaliuoksen konsentraatiot  $\beta$ -estradiolille, testosteronille ja progesteronille olivat 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pidättymättömänä yhdisteenä elektro-osmoottisen virran (EOF) voimakkuuden määrittämiseksi käytettiin 1 % (v/v) dimetyylisulfoksidia (DMSO). DMSO laimennettiin käyttämällä Milliporen Milli-Q -laitteen vettä. Näytepulloihin pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$  näytettä ja 50  $\mu\text{l}$  fosfaattipuskuria steroidien ja DMSO:n osalta. Käytettiin myös näytteitä, joissa sekä DMSO että steroidit olivat samassa näyteastiassa, jolloin lopputilavuudeksi tuli 70  $\mu\text{l}$ . Kaikki kantaliuokset, LDL kantaliuos sekä fosfaattipuskuriliuos säilytettiin jääkaapissa lämpötilassa +4 °C.

### 9.2.5 Puskuriliuoksen valmistaminen

Fosforihaposta valmistettiin fosfaattipuskuri veteen ja sen pH säädettiin arvoon 7,4 käyttämällä 1,0 M natriumhydroksidia (NaOH) ja 1,0 M vetykloridihappoa (HCl). Työssä käytetyn puskurin ioninvahvuus oli 20 mM ja se laskettiin käyttämällä R.W.Rametten (Carleton College, 1989) tekemää tietokoneohjelmaa *Acid-Base* ennen liuoksen valmistamista. Ohjelma ilmoitti tarvittavat ainemäärät määritettyyn tilavuuteen, joka oli tässä tapauksessa 1,0 litraa. pH säädettiin käyttäen Radiometerin valmistamaa MeterLab PHM220 pH -mittaria (Radiometer, Kööpenhamina, Tanska). Ennen käyttöä pH-mittari kalibroitiin kaupallisilla kalibroitiliuoksilla. Puskuriliuoksen lopputilavuus oli 1,0 litraa, ionivahvuus 20 mM ja pH 7,4. Liuos säilytettiin koko työn keston ajan kylmäkaapissa, +4 °C:ssa.

### 9.2.6 Lipidien poistoliuoksen valmistaminen

Lipidien poistossa käytetty reagenssi Nonidet P-40 on polymeerinen, eetteripohjainen pinta-aktiivinen aine. Yhdiste ei siedä juuri UV-valoa eikä happea, jonka vuoksi liuosta käsitellessä käytettiin apuna typpeä. Lisäksi näytepullo, jossa liuosta säilytettiin typen alla, oli suojattu valolta alumiinifoliolla. Puhdasta reagenssia laimennettiin Milli-Q vedellä konsentraatioon 0,1 mM lopputilavuuden ollessa 10 ml, ja suojattiin sulkemalla näytepullo typen alla.

### **9.3 Kapillaarin päällystäminen**

Ennen kapillaarin päällystämistä kapillaaria huuhdeltiin ensin 1,0 M HCl –liuoksella 20 min, 0,1 M HCl-liuoksella 10 min, 25 min Milli-Q vedellä ja lopuksi 5 min fosfaattipuskurilla paineen ollessa 940 mbar. Tämän esikäsitteilyn jälkeen, joka toistettiin aina ennen päällystämistä, kapillaari päällystettiin huuhtelemalla kapillaaria 0,1 mg/ml LDL-liuoksella 50 mbar paineella 40 min. Huuhtelun jälkeen LDL-partikkelien täyttämän kapillaarin annettiin seisahtua 15–60 min LDL-liuoksen näytepulloissa, jonka jälkeen kapillaaria huuhdeltiin fosfaattipuskurilla 940 mbar paineella 10–60 minuutin ajan. Jokaisessa päällystämisenä käytettiin juuri ennen ajoja kantaliuoksista valmistettua LDL-näytettä. Lämpötilana analyyseissä oli joko 25 °C tai 37 °C.

### **9.4 LDL-päällysteen lipidien poisto**

Kun LDL-pinnoitteen stabiilisuus oli varmistettu, suoritettiin pinnoitteen lipidien poisto käyttämällä Nonidet P-40 –liuosta. Kapillaaria huuhdeltiin 0,1 mM Nonidet P-40 liuoksella 940 mbar paineella 25 min ajan, Milli-Q-vedellä 25 min ja lopuksi fosfaattipuskurilla 40 min ajan. Lipidien poistossa lämpötilana käytettiin 25 °C jokaisessa ajossa. Nonidet P-40 -liuosta pipetoitiin 500 µl näyteastiaan (800µl) noin 5 min ennen käyttöä. Pipetointi suoritettiin typpikaasun alla hapen kanssa reagoimisen estämiseksi. Näin varmistettiin reagenssin toimivuus jokaisen lipidien poiston yhteydessä.

### **9.5 Lipideistä poistetun kapillaaripinnoitteen käsittely glukoosilla**

Lipidien poiston jälkeen, jolloin teorian mukaan jäljellä oli apoB-100 apolipoproteiini, osa kolesteryyliestereistä ja fosfolipidikalvo, käsiteltiin LDL-päällyste 20 % (w/w) glukoosin vesiliuoksella. Glukoosia injektoidiin 50 mbar paineen avulla kapillaariin 15 min tai 40 min ajan, jonka jälkeen jätettiin kapillaari glukoosiliuokseen 15 min ajaksi. Lisäksi tehtiin muutama käsittely jättämällä kapillaarin päät glukoosiliuokseen yön yli.

Seisotusajan jälkeen kapillaaria huuhdottiin 15 min 940 mbar paineella käyttäen fosfaattipuskuria, jonka pH oli 7,4. Lämpötilana lipidien poiston jälkeen tehdyissä sokerikäsittelyssä oli aina 25 °C.

## 9.6 Kapillaaripäällysteen hapettaminen

Päällysteen hapettaminen suoritettiin kapillaarissa joko LDL:a päällystämisen tai lipidien poiston jälkeen. Hapettamisessa käytettiin kuparisulfaattia, jonka konsentraatio oli joko 5 µM tai 10 µM. Kuparisulfaatti oli laimennettu veteen kantaliuokseksi, jonka konsentraatio oli 32 µM. Hapetus suoritettiin huuhtelemalla päällystettä ensin 5 min 940 mbar paineella taustaelektrolyyttiliuoksella (BGE), joka oli sama fosfaattipuskuri kuin edellä, ja 5 min 50 mbar paineella 5 µM tai 10 µM kuparisulfaattiliuoksella. Kapillaarin täytyttyä CuSO<sub>4</sub> liuoksella annettiin hapetusreaktiolle aikaa tapahtua 5h tai 12 h pienemmällä kuparikonsentraatiolla tai viisi tuntia 10 µM kuparikonsentraatiolla. Hapetusreaktio keskeytettiin huuhtelemalla kapillaaria 1 mM EDTA -liuoksella 940 mbar paineella 15 min. EDTA-liuos oli laimennettu käytettyyn fosfaattipuskuriin, jonka ionivahvuus oli 20 mM ja pH 7,4.

## 9.7 EOF ja retentiotekijän määrittäminen

Elektro-osmoottisen virran voimakkuus määritettiin dimetyylisulfoksidin (DMSO) avulla ja päällysteen hydrofobisuuden muutoksia kolmen luvussa 2.2 kuvailtujen steroidien avulla. Elektrokromatografisten ajojen perusteella laskettiin elektro-osmoottinen liikkuvuus sekä retentiotekijät kolmelle steroidille. Määrittäykset suoritettiin päällystämisen, lipidien poiston, sokerikäsittelyn sekä hapetuksen jälkeen. Aina ennen näytteen injektointia kapillaaria huuhdeltiin 940 mbar paineella 2 min käyttämällä fosfaattipuskuria. Injektoinnissa käytettiin paineinjektiota 50 mbar paineella ja injektointiaikana oli 2 sekuntia. Jännite oli jokaisessa ajossa 20 kV; kapillaarikasetin ja näytekarusellin lämpötila oli joko 25 °C tai 37 °C.



## 10 Kokeellisen työn tulokset ja tulosten tarkastelua

### 10.1 Päälystyksen stabiilisuus

Lähtökohtana kaikille LDL-päälysteen jatkotoimenpiteille on sen valmistuksen stabiilisuus. Tällöin voidaan varmistua tehtävien toimenpiteiden, kuten esimerkiksi lipidien poiston, olevan pääsyyinä päälystyksessä tapahtuviin muutoksiin. Päälysteen stabiilisuus varmistettiin injektoimalla samaa näytettä samoissa olosuhteissa kuusi (6) kertaa kapillaariin ja vertaamalla saatuja migraatioaikoja keskenään. Steroidien erotuksessa laskettiin retentiotekijät  $\beta$ -estradiolille, testosteronille ja progesteronille. Lisäksi laskettiin migraatioaikojen keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta (RSD %) sekä elektroforeettinen liikkuvuus näille yhdisteille.

Taulukossa 10 on esitetty LDL-päälysteen stabiilisuus. Kuutena peräkkäisenä päivänä LDL-partikkeleilla päälystettyihin kapillaareihin injektoitiin 0,17 % (v/v) DMSO-näytettä. Ennen LDL-päälystystä kapillaarit oli käsitelty hapolla, kuten kappaleessa 10.3 on kuvattu. Migraatioaikojen perusteella laskettiin RSD % -arvot kullekin injektointisarjalle, jotka koostuivat kuudesta saman näytteen injektoinnista. Lisäksi laskettiin elektroforeettiset liikkuvuudet jokaiselle kapillaarille. Kuten taulukosta 10 voidaan havaita, RSD:n arvot ovat korkeintaan 3,1 % ja ottaen huomioon lämpötilan (25 °C) voidaan olettaa LDL-päälysteen olleen hyvin stabiili näissä olosuhteissa.

**Taulukko 10.** LDL-päällysteen toistettavuus. Alimmalla rivillä ovat keskiarvot. Analyysin olosuhteet:  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ , kapillaarin kokonaispituus 38,5 cm ja efektiivinen pituus 30 cm. DMSO 0,17 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL:n konsentraatio proteiinkonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,1\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). Päällystämässä: seisotusaika 15 min ja BGE-huuhtelu 15 min paineella 940 mbar.

<b>Kapillaari</b>	<b><math>t_{eo}</math> [min]</b>	<b>RSD % (<math>t_{eo}</math>)</b>	<b><math>\mu_{eo}</math> [<math>\text{cm}^2/\text{Vs}</math>]</b>
1	3,82	<b>1,8</b>	2,52E-04
2	4,44	<b>0,9</b>	2,17E-04
3	4,11	<b>2,1</b>	2,34E-04
4	4,24	<b>1,6</b>	2,27E-04
5	4,39	<b>3,0</b>	2,19E-04
6	4,00	<b>3,1</b>	2,41E-04
n=6	4,17	<b>2,1</b>	2,32E-04

## 10.2 LDL-päällysteen lipidien poisto

Stabiilin LDL-päällysteen varmistuttua voitiin suorittaa lipidien poisto käyttämällä Nonidet P 40 –reagenssia. Käytännön suoritus on kuvattu tarkemmin kappaleessa 4.4. Lipidien poiston tavoitteena oli saada aikaan stabiili LDL-päällyste, joka koostui pääosin apolipoproteiinista B-100. Tämän päällysteen avulla oli tarkoituksena tutkia apoB-100 -lipoproteiinin kokonaisvarauksen muutoksia hapetuksessa sekä sokerikäsittelyssä ja saada näiden avulla tietoa apo B-100 partikkelien käyttäytymisestä ihmiskehossa. Koska apo B-100 -lipoproteiineja ei ole kyetty eristämään hajottamatta niiden sekundäärirakennetta, on tämä menetelmä melko yksinkertainen ja tehokas apo B-100 –partikkelien tutkimiseen.

Lipidien poiston vaikutus päällysteen hydrofobisuuteen voidaan havaita hydrofobisten steroidien avulla laskemalla näiden retentiotekijät ennen ja jälkeen lipidien poiston. Oletuksena oli, että lipidien poiston jälkeen, kun suurin osa hydrofobisista partikkeleista oli kulkeutunut käsittelyn mukana ulos kapillaarista, retentiotekijät pienenisivät merkittävästi. Toisin sanoen oletettiin, että LDL-päällysteen hydrofobisuus laskisi

huomattavasti. Taulukossa 11 on esitetty kolmen tutkitun steroidin retentiotekijät suhteellisine keskihajontoineen (RSD %) LDL-päällystyksen sekä lipidien poiston jälkeen. Analyysit taulukossa 11 on suoritettu kolmella eri kapillaarilla ja myös DMSO:n migraatioaikojen keskiarvo on kirjattu.

Kuten taulukosta 11 voidaan todeta, lipidien poisto on onnistunut hyvin. Retentiotekijät varsinkin hydrofobisimman steroidin, progesteronin, osalta on pienentynyt jopa noin 85 %.  $\beta$ -Estradiolin osalta retentiotekijä pieneni keskimäärin noin 75 % ja vastaavasti testosteronin retentiotekijä noin 72 %. Suhteelliset keskihajonnat ovat myös melko pieniä ja erityisesti voidaan todeta, että lipidien poiston jälkeen keskihajonta on pienentynyt selvästi. Tämä saattaa johtua myös muun muassa melko pitkstä kapillaaripinnan huuhtelusta (yht. 90 min), jolloin LDL-partikkelit ovat saattaneet myös irrota kapillaarin sisäpinnalta. Retentiotekijöiden absoluuttiset arvot ovat myös melko lähellä toisiaan näiden kolmen kapillaarin osalta. Liitteessä 1 on esitetty vastaavat arvot taulukon muodossa useamman kapillaarin osalta samoissa olosuhteissa. Liitteen 1 taulukon perusteella LDL-päällystyksen retentiotekijän päivittäisen uusittavuuden suhteellinen keskihajonta 13 kapillaarille on noin 7 %. Apolipoproteiini B-100 päällystetyille kapillaareille vastaava suhteellisen keskihajonnan arvo on noin 12 %. Näiden prosenttirajojen sisällä steroidien retentiotekijät vaihtelevat kapillaarista ja päivästä toiseen. Vaihteluväli on melko pieni ottaen huomioon muun muassa kapillaarien laadun vaihtelu sekä muut satunnaiset muuttujat.

**Taulukko 11.** Kolmella LDL- ja apolipoproteiini B-100 päällystetyllä kapillaarilla saadut retentiotekijät. Taulukossa k on retentiotekijä, jokaisen osalta 6 injektointia. Analyysiolosuhteet:  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ , DMSO 0,14 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL:n konsentraatio proteiinikonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,1\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). Steroidien pitoisuus näytteessä noin 7,1  $\mu\text{g/ml}$ . Päällystämässä: seisotusaika 15 min ja BGE -huuhtelu 15 min paineella 940 mbar. Lipidien poisto: 0,1 mM Nonidet P-40 (tarkemmin kappale 10.4).

Yhdiste	$\beta$ -estradioli		testosteroni		progesteroni		$t_{\text{eo}}$ [min]		
	k	RSD %	k	RSD %	k	RSD %	1.	6.	RSD %
Päällystämisen jälkeen	0,252	0,876	0,085	0,848	<b>0,734</b>	0,765	4,47	4,42	0,87
Lipidien poiston jälkeen	0,061	0,978	0,026	0,919	<b>0,109</b>	0,843	3,68	3,63	0,92
Päällystämisen jälkeen	0,258	2,419	0,087	2,169	<b>0,737</b>	2,448	4,24	4,01	2,10
Lipidien poiston jälkeen	0,058	0,788	0,024	0,682	<b>0,099</b>	0,919	3,47	3,43	0,63
Päällystämisen jälkeen	0,233	1,831	0,078	1,697	<b>0,653</b>	1,914	4,36	4,16	1,61
Lipidien poiston jälkeen	0,053	0,858	0,021	0,792	<b>0,087</b>	1,005	3,65	3,58	0,76

Taulukossa 12 on esitetty DMSO:n migraatioaikojen keskiarvo sekä näiden avulla lasketut elektro-osmoottiset liikkuvuudet taulukossa 11 esiintyvien kolmen kapillaarin osalta. Taulukosta 12 havaitaan, että elektro-osmoottinen liikkuvuus kasvaa hieman lipidien poiston jälkeen, eli kapillaarin päällysteen negatiivinen varaus kasvaa. Tämä näkyy myös pienentyneenä DMSO:n migraatioaikana.

**Taulukko 12.** Kolmen kapillaarin elektro-osmoottiset liikkuvuudet LDL-partikkeleilla päällystämisen ja lipidien poiston jälkeen. Analyysiolosuhteet samat kuin taulukossa 11.

Aine	$t_{eo}$ [min]			
	Muuttuja	Elektro-osmoottinen liikkuvuus $\mu_{eo}$ [ $\cdot 10^{-4}$ cm <sup>2</sup> /Vs]	keskiarvo [min]	RSD %
<b>Päällystämisen jälkeen</b>		2,17	4,44	0,87
		2,34	4,11	2,10
		2,27	4,24	1,61
<b>Lipidien poiston jälkeen</b>		2,63	3,66	0,92
		2,81	3,43	0,63
		2,67	3,61	0,76

Liitteessä 2 on esitetty esimerkit elektroferogrammeista LDL-päällystyksen sekä lipidien poiston jälkeen. Kuten liitteen 2 elektroferogrammeista nähdään, ero on hyvin selkeä ennen ja jälkeen lipidien poiston. Päällystyksen jälkeen pidättymättömän DMSO:n ja hydrofobisimman steroidin, progesteronin, migraatioaikojen välinen ero on noin 3,25 min. Vastaavasti lipidien poiston jälkeen ero on enää noin 0,46 min. Tämä kertoo LDL-päällysteen menettäneen selvästi hydrofobista luonnettaan.

### 10.3 LDL:n hapettuminen ja vuorovaikutukset steroidien kanssa

Ateroskleroosin kehittyminen alkaa todennäköisesti LDL:n hapettumisesta. Hapettuminen johtaa kolesterolin kertymiseen monosyytti- ja makrofaagisoluihin, joka puolestaan aiheuttaa vaahtosolujen muodostumista. Luonnolliseen LDL-partikkeliin verrattuna hapettunut LDL-partikkeli sitoutuu makrofaagien solumembraanin reseptoreihin, jotka eivät ole negatiivisesti säädeltyjä solunsisäisen kolesterolikonsentraation suhteen.<sup>68</sup> Tämä johtaa kolesterolin kertymiseen ja tilanteen pahenemiseen.

Sen lisäksi, että hapettunut LDL osallistuu vaahtosolujen muodostukseen, sillä on monia muita biologisia vaikutuksia, jotka edistävät ateroskleroottisen plakin syntyä. Se on muun muassa myrkyllistä viljellyille entodeelisoluille, toimii kemiallisena houkuttimena monosyytti-makrofaagisoluille sekä on vastustuskykyä tuottavaa.

Ihmisestä ja monista eläimistä voi yleisesti ottaen löytää vasta-aineita hapettuneita LDL-partikkeleita vastaan.<sup>69-71</sup>

LDL:n hapettuminen kehossa tapahtuu todennäköisesti verisuonten seinämien endoteelin alapuolisessa tilassa tai plasmassa.<sup>67</sup> Hapettumiseen vaikuttaa muun muassa LDL-partikkelin koostumus sekä partikkelia ympäröivä mikroympäristö. Koostumuksessa tärkeää on erityisesti poly- ja monotydyttymättömien rasvahappojen suhde sekä antioksidanttien määrä. Mikroympäristön vaikuttavimmat tekijät ovat muun muassa hapettimien konsentraatio ja pH. Tässä työssä LDL:n hapettamiseen käytettiin kupari-ioneita ( $Cu^{2+}$ ), joiden on todettu johtavan hyvin samankaltaisiin hapettuneisiin LDL-partikkeleihin kuin ovat kehossa makrofaagien muokkaamat LDL-partikkelit.<sup>67</sup>

LDL-partikkeleiden hapettumisen mittarina voidaan käyttää LDL-partikkeleiden kokonaisvarausta. Niiden varaus voidaan mitata epäsuorasti elektroforeettisen liikkuvuuden muutoksena. Mitä enemmän LDL-partikkelit ovat hapettuneet, sitä enemmän niillä on negatiivista varausta, ja sitä voimakkaammaksi käy elektroosmoottinen virtaus. Tällöin siis kapillaariin pidättymättömän yhdisteen, tässä työssä DMSO:n, migraatioaika pienenee, kun LDL hapettuu. Tässä työssä hapetusprosessi suoritettiin dynaamisesti kapillaarin sisällä.

Muutokset kapillaarin LDL-päällysteen hydrofobisuudessa havaittiin päällysteen ja kolmen, hydrofobisuudeltaan erilaisen, steroidin välisten vuorovaikutusten avulla. Steroidit olivat  $\beta$ -estradioli, testosteroni ja progesteroni ja niiden rakennekaavat on esitetty kuvassa 28 kappaleessa 7.2. Hydrofobisuuden tutkimiseksi jokaisen ajon migraatioaikojen perusteella määritettiin retentiotekijät kaikille steroideille.

Taulukossa 13 on esitetty steroidien retentiotekijät LDL-päällystyksen, lipidien poiston sekä hapetuksen jälkeen. Niin kuin taulukosta 13 nähdään, hapettaminen näyttäisi pienentävän retentiotekijöitä hieman. Tämä tarkoittaisi LDL-päällysteen hydrofobisuuden pienenemistä. Kolmannen kapillaarin osalta LDL-päällystys ei ole onnistunut kunnolla, koska retentiotekijät poikkeavat niin selvästi kahdesta muusta. Ilman lipidien poistoa retentiotekijöiden on aiemmissa tutkimuksissa huomattu kasvavan kuparilla hapettamisen jälkeen, joten lipidien poisto vaikuttaa myös hapetusprosessiin.<sup>67</sup> Syynä saattaisi olla se, ettei LDL-partikkelissa ole lipidien poiston jälkeen jäljellä tarpeeksi hydrofobisia komponentteja voimakkaiden hydrofobisten vuorovaikutusten tuottamiseksi.

**Taulukko 13.** Steroidien retentiotekijät ja niiden suhteelliset keskihajonnat (RSD %) kolmen eri kapillaarin päällystämisen, lipidien poiston ja hapetuksen jälkeen. Hapetuksessa 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  12 h ja muut analyysiolosuhteet vastaavat kuin taulukossa 8.

Yhdiste	$\beta$ -Estradioli		Testosteroni		Progesteroni		$t_{\text{eo}}$ [min]		
	Retentiotekijä (k)	RSD %	Retentiotekijä (k)	RSD %	Retentiotekijä (k)	RSD %	1.	6.	RSD %
Päällystyksen jälkeen	0,252	0,876	0,085	0,848	<b>0,734</b>	0,765	4,473	4,415	0,867
Lipidien poiston jälkeen	0,061	0,978	0,026	0,919	<b>0,109</b>	0,843	3,677	3,626	0,923
Hapetuksen jälkeen	0,052	0,247	0,021	0,223	<b>0,096</b>	0,360	3,121	3,109	0,211
Päällystyksen jälkeen	0,258	2,419	0,087	2,169	<b>0,737</b>	2,448	4,242	4,008	2,096
Lipidien poiston jälkeen	0,058	0,788	0,024	0,682	<b>0,099</b>	0,919	3,466	3,429	0,630
Hapetuksen jälkeen	0,065	0,554	0,020	0,345	<b>0,077</b>	0,421	3,439	3,420	0,333
Päällystyksen jälkeen	0,109	1,308	0,043	1,284	<b>0,296</b>	1,303	3,877	3,879	0,903
Lipidien poiston jälkeen	0,038	1,797	0,018	1,872	<b>0,045</b>	1,787	3,793	3,793	1,981
Hapetuksen jälkeen	0,038	1,647	0,017	1,550	<b>0,045</b>	1,752	3,925	3,967	1,623

#### 10.4 Kuparisulfaatin käyttö LDL:n hapettamisessa

Kuparisulfaatin avulla kapillaarin sisällä suoritettun hapettamisen perusteella havaittiin, että vaikka hapettaminen ei sinänsä merkittävästi retentiotekijöitä, parantaa se toistettavuutta merkittävästi pienentämällä suhteellisia keskihajontoja. Toisaalta havaittiin myös, että EOF-liikkuvuudet kasvoivat. Tämä puolestaan antaa vihjettä siitä, että LDL-partikkelin nettovaraus muuttuu hapettamisen aikana enemmän negatiivisemmaksi.

Taulukon 14 perusteella kuitenkin näyttäisi siltä, ettei lipidien poiston jälkeen suoritettu hapettaminen juuri vaikuta päällysteen ominaisuuksiin. Toisaalta taulukosta 14 nähdään myös se, että päällyste vaikuttaa muuttuneen stabiilimmaksi hapettamisen jälkeen. Se näkyy retentiotekijöiden pienentyneinä suhteellisina keskihajontoina. Liitteestä 3 on esitetty suuremmalla kuparin konsentraatiolla (10  $\mu\text{M}$ ) suoritettut hapetukset. Hapetusprosessin kestoa lyhennettiin tällöin 12 tunnista 5 tuntiin. Taulukoiden perusteella EOF-liikkuvuus toisinaan kasvaa ja välillä pienenee. Erot eivät kuitenkaan ole merkittäviä. Ainoastaan voidaan todeta, että kapillaarin päällyste pysyy stabiilina myös hapetuksen jälkeen.

**Taulukko 14.** Pinta-aktiivisen aineen (Nonidet P-40) avulla saadun ApoB-100 päällysteen hapettamisen tulokset kolmessa eri kapillaarissa. Taulukkoon on kirjattu elektro-osmoottiset liikkuvuudet ennen ja jälkeen hapetuksen. Analyysiolosuhteet:  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ ,  $L_{tot} = 38,5\text{ cm}$  ja  $L_{det} = 30,0\text{ cm}$ . DMSO 0,14 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL:n konsentraatio proteiinikonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,1\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). Aallonpituus 214 nm. LDL-päällystämässä: seisotusaika 15 min ja BGE -huuhtelu 15 min paineella 940 mbar. Hapetuksessa käytettiin  $5\text{ }\mu\text{M CuSO}_4$ :a, ja hapetusaikana oli 12 h.

Aine	$t_{eo}$ [min]		
Muuttuja	Elektro-osmoottinen liikkuvuus $\mu_{eo}$ [ $\cdot 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$ ]	keskiarvo	RSD %
<b>Lipidien poiston jälkeen</b>	2,63	3,66	0,92
	2,81	3,43	0,63
	2,46	3,92	1,98
<b>Hapettamisen jälkeen</b>	3,10	3,11	0,21
	2,82	3,42	0,33
	2,43	3,97	1,62

## 10.5 Hapettuminen eri lämpötiloissa

Hapettaminen suoritettiin joko LDL-päällystyksen tai lipidien poiston jälkeen. LDL-päällystyksen jälkeen suoritetuissa hapetuksissa lämpötilana oli  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja lipidien poiston jälkeen tehdyissä hapetuksissa käytettiin  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilaa. Alhaisemmassa lämpötilassa mittaukset oli teknisesti helpommat toteuttaa ja lisäksi monet aiemmat tutkimukset on tehty käyttäen lämpötilaa  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>2,3</sup> Voidaan myös olettaa aiempien tutkimusten pohjalta, että hapettumisprosessi tapahtuu nopeammin fysiologisessa, korkeammassa  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilassa. Varsinaista vertailua näiden lämpötilojen välillä ei voida tässä työssä tehdä, koska alhaisemmassa lämpötilassa suoritettiin aina lipidien poisto ennen hapettamista.



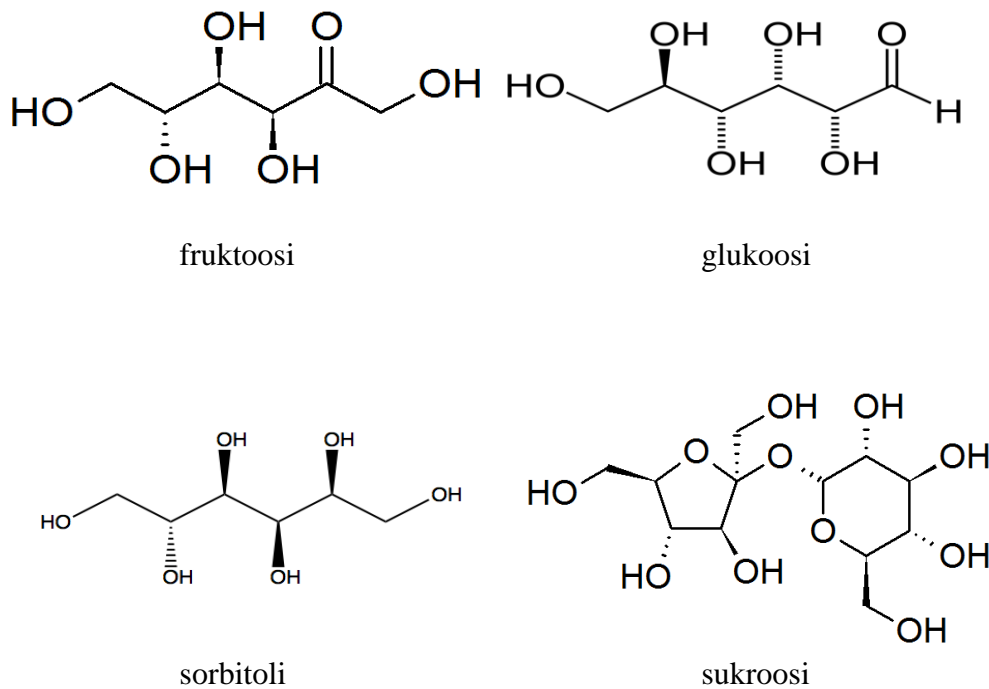
## 10.6 EDTA:n vaikutus

Hapetusprosessi kapillaarissa saatiin keskeytettyä 1 mM EDTA –huuhtelun avulla. EDTA:n toiminta perustuu sen kompleksoivaan vaikutukseen. EDTA kompleksoi kapillaarin sisällä olleet kupari-ionit ja näin hapetusprosessi keskeytyi kuparin poistuttua kapillaarista. Jokaisen kapillaarin osalta suoritettiin hapetuksen jälkeen 15 min EDTA- ja 5 min fosfaattipuskurihuuhtelu, jonka jälkeen voitiin injektoida seuraava DMSO/steroidi-näyte kapillaariin. EDTA-liuoksen konsentraatiota ei optimoitu tässä työssä, vaan käytettiin aiemmin samanlaisissa kokeissa käytettyä ja hyväksi havaittua 1 mM konsentraatiota.<sup>67</sup>

## 10.7 LDL-partikkelien sokerikäsittely

Yhtenä merkittävänä osana tässä työssä oli käsitellä LDL-partikkeleita erityyppisillä sokereilla. Yhden sokerin, glukoosin, osalta sokerikäsittelyt suoritettiin sekä koeputkessa että kapillaarin sisällä. Kokeissa käytettiin neljää eri sokeria ja ne olivat: glukoosi, fruktoosi, sorbitoli ja sukroosi. Koeputkessa suoritettuna ja kapillaarissa suoritettuna käsittelyn tärkein ero on se, että kapillaarissa käsittely tehtiin LDL-päällistyksen jälkeen. Kapillaarin sisällä käsittely tehtiin ainoastaan glukoosilla sillä saatujen hyvien tulosten vuoksi. Käytettyjen neljän sokerin rakenteet on esitetty kuvassa 31.

Sokerikäsittely tehtiin, koska haluttiin tutkia miten se vaikuttaa LDL-partikkeliin ja erityisesti apoB-100:n pintaan. Olettamuksena oli, että sokerit saattaisivat suojata apolipoproteiini B-100:n positiivisesti varautuneita ryhmiä ja näin ollen vähentää LDL-partikkelin kokonaisvarauksen muutosta. Lisäksi verrattiin sokereiden vaikutuksia LDL-partikkeleihin keskenään, sillä esimerkiksi sukroosi ja glukoosi poikkeavat merkittävästi toisistaan rakenteeltaan kuten kuvasta 31 nähdään. Oletuksena oli, että mono- ja disakkaridi sekä sokerialkoholi käyttäytyvät eri tavalla eli toisin sanoen suojaavat joko paremmin tai huonommin apo-B100:n pintaa.



**Kuva 31.** Työssä käytettyjen sokereiden rakennekaavat.<sup>61</sup>

## 10.8 Sokerikäsitelyn optimointi

Työn alussa tutkittiin eri sokereilla käsitellyn LDL:n stabiilisuutta kapillaarin päällystämässä. Lisäksi optimoitiin päällystyksessä käytettävien seisotusajan ja huuhteluajan pituudet. Sokerikäsitellyt LDL-partikkelit saatiin ultrasentrifugoinnin avulla, kuten kappaleessa 9.2.3 on kuvattu. Tarkoituksena oli määrittää stabiilein LDL-sokeri kapillaarin päällystämistä varten. Stabiileinta sokeria käytettiin myöhemmin lipidien poiston jälkeen LDL-päällysteen suojaamiseen.

Taulukossa 15 (s. 82-83) on esitetty sokerikäsiteltyjen LDL-partikkelien avulla tehtyjen päällysteiden ominaisuudet, kuten EOF-liikkuvuus. Yhdisteinä analyyseissä käytettiin DMSO:ta EOF -liikkuvuuden määrittämiseen sekä kolmea steroidia retentiotehtäjäiden määrittämiseen. Taulukkoon on koottu eri seisotus- ja huuhteluajoilla suoritettuja analyysejä sekä näistä lasketut RSD % -arvot. Kaikki taulukon 15 analyysejä suoritettiin 37 °C:n lämpötilassa. Taulukossa on myös hapetuksesta saadut arvot. Kaikissa taulukon 12 hapetuksissa käytettiin 5 µM  $CuSO_4$  -liuosta hapetusajan ollessa 5 h.

Taulukossa 15 on värjätty sarakkeet, jotka osoittautuivat pysyvimmiksi LDL-päällystysolosuhteiksi. Esimerkiksi LDL-glukoosilla ja 15 min seisotus –ja odotusajalla (15/15) valmistettu kapillaarin LDL -päällyste on selvästi stabiilimpi kuin esimerkiksi 30 min ajoilla (30/30) valmistettu. Suhteellinen keskihajonta LDL-glukoosipäällysteelle (15/15) 6 ajon aikana on vain 0,09 %. Myös LDL-fruktoosi osoittautui varsin stabiiliksi päällysteeksi (RSD = 0,04 %), mutta steroidien RSD % -arvot ovat hieman suuremmat kuin LDL-glukoosin tapauksessa. Taulukossa 15 on kirjattu myös käsittelemättömillä LDL-partikkeleilla päällystettyjen kapillaarien tulokset samoissa olosuhteissa. Mielenkiintoinen huomio on tässä tapauksessa seisotus –ja odotusajan paras yhdistelmä, joka poikkeaa sokerikäsiteltyjen partikkelien vastaavista. Käsittelemättömälle LDL:lle parhaaksi näissä mittauksissa osoittautui 30 min odotusaika sekä 60 min huuhtelu-aika (30/60). Myös sorbitolilla käsiteltyjen LDL-partikkelien osalta löytyi samankaltaista yhtäläisyyttä pidempikestoisen kapillaarin käsittelyn paremmuudesta.

Kuitenkaan nämä 60/30 tai 30/60 ajoilla tehdyt analyysit eivät tuottaneet uusittaessa yhtä hyviä tuloksia, niin kuin sorbitolin osalta taulukosta 15 nähdään. Sukroosilla käsiteltyjen LDL-partikkelin osalta ei päästy yhtä hyviin tuloksiin kuin muilla sokereilla. Tämä voisi johtua muun muassa sukroosin disakkaridi –rakenteesta. Suuri koko ja 8 hydroksyylyiryhmää aiheuttavat sokerin vahvan hydrofiilisyyden. LDL-partikkelit koostuvat pääasiassa hydrofobisista molekyyleistä, joten vuorovaikutukset sukroosin ja LDL-partikkelien välillä ovat luultavasti heikommat kuin esimerkiksi glukoosin tai fruktoosin tapauksessa.

Taulukosta 15 nähdään myös se, että steroidien retentiotekijät eivät merkittävästi muutu hapetuksessa, mutta RSD % -arvot pienenevät merkittävästi. Lisäksi nähdään, että elektro-osmoottinen liikkuvuus kasvaa hapetusreaktion jälkeen. Tämä aiheutuu luultavasti kasvaneesta negatiivisesta varauksesta LDL-partikkelissa. Käsittelemättömän LDL:n tapauksessa retentiotekijät kasvavat hapetuksen jälkeen. Tämä johtuu luultavasti apo B-100 –partikkelin hydrofobisten alueiden hajoamisesta ja uudelleensijoittumisesta LDL-partikkelin pinnalle. Tämä aiheutuu puolestaan apoB-100 partikkelista irtoavien fragmenttien takia ja johtaa LDL-partikkelin pinnan osittaiseen irtoamiseen. LDL-partikkelin ytimessä olevat lipidit pääsevät näin kosketuksiin LDL-partikkelin pinnan kanssa ja kasvattavat partikkelin hydrofobisuutta.<sup>67</sup> Tämä johtaa hydrofobisten vuorovaikutusten kasvuun steroidien ja LDL-päällysteen välillä, joka nähdään kasvavina retentiotekijöinä.

Koska alussa olettamuksena oli, että sokerit suojaisivat LDL-partikkelissa olevan apo-B100 -partikkelin positiivisesti varautuneita alueita, voidaan todeta, ettei varauksen suhteen tapahdu merkittävää muutosta sokerilla käsittelemättömien tai käsiteltyjen partikkelien välillä LDL-päällystyksen hapetuksessa. Toisaalta sokerikäsitteily näyttäisi vaikuttavan LDL-partikkelin hydrofobiseen luonteeseen estämällä hieman hydrofobisten LDL-partikkelin ytimessä sijaitsevien lipidien pääsyä partikkelin pintaan. Kuitenkaan näiden mittausten perusteella ei voida sanoa mitään lopullista totuutta sokereiden vaikutuksesta LDL-partikkeliin. Voidaan todeta, että sokerikäsitteily hieman vaimentaa LDL-partikkelissa tapahtuvia hydrofobisuuden muutoksia hapetuksessa ja lisäksi, että sokerikäsitteily parantaa LDL-päällystyksen stabiilisuutta erityisesti LDL-glukoosin osalta. Liitteessä 4 on esitetty esimerkit elektroferogrammeista, jotka saatiin steroidien erotuksesta yhden LDL-glukoosilla päällystetyn kapillaarin osalta.

**Taulukko 15.** Sokerikäsiteltyjen LDL-partikkeleiden päällystykset ja hapetukset. Analyysiolosuhteet:  $T = +37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ ,  $L_{tot} = 38,5\text{ cm}$  ja  $L_{det} = 30,0\text{ cm}$ . DMSO 0,17 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. Steroidien konsentraatio näytteessä noin 8,3  $\mu\text{g/ml}$ . Diodirividetektor, aallonpituudet 214 nm ja 245 nm. Hapetus: 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , aika 5 h.

Näyte	Seisotusaika [min]	Huuhtelu-aika [min]	$\mu_{eo}$ ( $10^{-4}\text{cm}^2/\text{Vs}$ )	RSD (%) n = 6	Retentiotekijä $k^*$		
					testosteroni	$\beta$ -estradioli	progesteroni
LDL-glukoosi	15	15	3,10	0,09	0,08 (0,6)	0,22 (0,7)	0,73 (0,7)
	30	30	2,98	0,67	0,05 (1,4)	0,19 (1,4)	0,68 (0,9)
Hapetus 5h			3,88	0,52	0,09 (0,1)	0,27 (0,2)	0,78 (0,5)
	30	60	3,13	0,81	0,05 (1,3)	0,19 (1,2)	0,66 (1,0)
Hapetus 5h			3,60	0,91	0,08 (0,3)	0,24 (0,3)	0,76 (0,6)
	60	10	2,80	1,60	0,03 (2,1)	0,19 (2,2)	0,82 (2,1)
	60	30	2,91	0,87	0,04 (1,9)	0,20 (1,9)	0,76 (2,0)
	60	60	2,93	0,84	-	-	-
LDL-fruktoosi	15	15	3,10	0,04	0,08 (0,9)	0,23 (0,9)	0,74 (1,0)
			3,51	0,86	0,07 (0,2)	0,26 (0,2)	0,79 (0,2)
	30	60	3,15	0,78	0,04 (1,3)	0,17 (1,3)	0,63 (0,5)
	30	60	3,09	0,22	0,06 (1,6)	0,22 (1,6)	0,82 (1,5)
Hapetus 5h			4,02	0,49	0,11 (0,3)	0,32 (0,5)	1,04 (0,8)
	60	10	3,23	1,20	0,15 (0,6)	0,00 (0,6)	0,69 (0,2)
	60	30	2,83	0,53	0,08 (1,6)	0,24 (1,7)	0,76 (1,7)
	60	60	2,94	1,36	0,04 (1,7)	0,19 (1,8)	0,71 (1,9)

Taulukko 15 jatkuu..

Näyte	Seisotusaika [min]	Huuhteluaika [min]	$\mu_{eo}$ ( $10^{-4} \text{cm}^2/\text{Vs}$ )	RSD (%) n = 6	Retentiotekijä $k^*$		
					testosteroni	$\beta$ -estradioli	progesteroni
LDL-sorbitoli	15	15	3,23	0,60	0,00 (0,1)	0,03 (0,1)	0,11 (0,1)
Hapetus 5h			3,63	0,24	0,02 (0,1)	0,05 (0,1)	0,17 (0,2)
	30	30	3,15	2,17	0,02 (1,8)	0,15 (1,8)	0,57 (1,7)
	30	60	3,13	1,60	0,01 (1,3)	0,17 (1,4)	0,66 (1,4)
	30	60	3,20	3,00	0,01 (0,8)	0,14 (0,9)	0,60 (0,4)
	60	30	2,93	0,46	0,04 (2,6)	0,19 (2,7)	0,72 (2,6)
	60	30	2,93	1,09	0,04 (1,4)	0,15 (1,4)	0,51 (1,2)
Hapetus 5h			3,58	0,62	0,06 (0,3)	0,19 (0,3)	0,58 (0,3)
	60	60	3,13	1,59	0,05 (0,7)	0,18 (0,7)	0,64 (0,6)
	60	60	2,87	2,22	-	-	-
LDL-sukroosi	15	15	2,63	1,57	0,17 (1,1)	0,02 (1,2)	0,65 (1,5)
Hapetus 5h			3,38	0,32	0,27 (0,2)	0,10 (0,1)	0,86 (0,1)
	15	15	2,72	0,62	0,05 (2,0)	0,19 (2,1)	0,66 (2,0)
Hapetus 5h			3,24	0,55	0,06 (0,4)	0,21 (0,4)	0,67 (0,6)
	30	30	2,95	0,67	0,04 (1,7)	0,17 (1,7)	0,62 (1,8)
Hapetus 5h			3,58	0,54	0,07 (0,1)	0,21 (0,1)	0,68 (0,1)
Luon. LDL	15	15	3,13	0,48	0,07 (0,9)	0,22 (0,9)	0,72 (0,9)
Hapetus 5h			3,59	0,34	0,09 (0,0)	0,29 (0,1)	0,85 (0,9)
	30	10	2,77	1,68	0,03 (2,0)	0,17 (2,0)	0,71 (2,0)
	30	30	2,96	1,15	0,04 (1,3)	0,17 (1,3)	0,65 (1,2)
	30	60	3,10	0,20	0,06 (1,3)	0,22 (1,3)	0,72 (1,3)
	60	10	3,02	0,90	0,05 (1,4)	0,21 (1,6)	0,70 (2,9)
	60	30	2,97	0,65	0,05 (1,5)	0,19 (1,4)	0,67 (1,3)
	60	60	2,97	0,69	0,04 (2,5)	0,19 (2,5)	0,72 (2,2)

## 10.9 Lipidien poiston jälkeinen sokerikäsittely

Tässä työssä tehtiin sokerikäsittely LDL-partikkeleille myös kapillaarissa lipidien poiston jälkeen. Sokerina käytettiin glukoosia, koska se osoittautui stabiileimmaksi neljästä tutkitusta sokerista, niin kuin edellä on jo esitetty. Kapillaari päällystettiin ensin tavallisesti käyttämällä käsittelemättömiä LDL-partikkeleita sekä 15 min seisotus- ja huuhteluaikaa. Lipidien poiston jälkeen kapillaariin injektoidiin 20 % (w/w) glukoosin vesiliuosta 15 tai 40 min ajan 50 mbar paineella. Lisäksi tehtiin kaksi käsittelyä siten, että 40 min injektoinnin jälkeen jätettiin kapillaari yön yli sokerin näyteastioihin.

Sokerikäsittelyn päätyttyä suoritettiin hapetusreaktio käyttämällä 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ :a ja hapetusaikana viittä tuntia. Lämpötilana oli 25 °C.

Taulukossa 16 on taulukoituna steroidien retentiotekijöiden muutokset RSD % -arvoineen päällystykseen, lipidien poiston, glukoosikäsittelyn sekä hapetuksen jälkeen. Taulukon 16 perusteella glukoosikäsittely ei aiheuta merkittäviä muutoksia steroidien retentiotekijöissä. Vastaavasti kuin koeputkessa sokereilla käsiteltyjen LDL-partikkelien tapauksessa taulukossa 15, on myös kapillaarissa tehtävällä glukoosikäsittelyllä päällystettä stabiloiva vaikutus, joka näkyy pienentyneinä RSD % -arvoina.

Taulukossa 17 on esitetty täysin samoissa olosuhteissa, mutta pidemmällä glukoosikäsittelyllä tehdyt kokeet kahden kapillaarin osalta. Kuten taulukosta 17 nähdään, pidempikestoinen käsittely ei myöskään näyttäisi vaikuttavan kovinkaan merkittävästi LDL/apoB-100 -päällysteen hydrofobisuuteen. Näin ollen retentiotekijät pysyvät hyvin lähellä lipidien poiston sekä hapetuksen jälkeen saatuja arvoja.

Liitteessä 5 on esitetty LDL-päällystyksestä, lipidien poistosta, sokerikäsittelystä sekä hapetuksesta saadut elektroferogrammit yhden ajon osalta. Niin kuin liitteen 5 elektroferogrammeista käy ilmi, lipidien poiston ja glukoosikäsittelyn jälkeen ajettujen näytteiden eroavaisuus on hyvin pieni. Toisaalta voidaan todeta, että piikkien muodot liitteissä 4 ja 5 esitetyissä elektroferogrammeissa eivät ole kovin symmetrisiä. Liitteen 5 elektroferogrammeissa DMSO ja steroidit ovat samassa näytteessä, kun liitteen 4 tapauksessa DMSO ja steroidit ajettiin eri näyteastiasta. Luultavasti DMSO:n ja steroidien välillä on vuorovaikutuksia, jotka vaikuttavat piikkien muotoon merkittävästi. Yhdisteet kuitenkin erottuvat selvästi toisistaan, vaikka intensiteetit aallonpituudella 245 nm ovatkin melko alhaisia.

**Taulukko 16.** Steroidien retentiotekijöiden muutokset päällystyksen, lipidien poiston, glukoosikäsittelyn sekä hapetuksen jälkeen. Päällystys: seisotus –ja huuhtelu aika 15 min 940 mbar. Lipidien poisto: 0,1 mM Nonidet P-40 –liuos. Glukoosi –käsittely: injektointi 15 min 50 mbar paineella, 15 min seisotusaika ja 15 min BGE –huuhtelu 940 mbar paineella. Muut olosuhteet:  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ ,  $L_{tot} = 38,5\text{ cm}$  ja  $L_{det} = 30,0\text{ cm}$ . DMSO 0,14 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. Steroidien konsentraatio näytteessä noin 7,1  $\mu\text{g/ml}$ . Diodirividetectori, aallonpituudet 214 nm ja 245 nm. Injektointeja 6 kpl jokaisen päällysteen käsittelyn jälkeen.

Yhdiste	$\beta$ -Estradioli		Testosteroni		Progesteroni		$t_{eo}$ [min]		
	Retentiotekijä (k)	RSD %	Retentiotekijä (k)	RSD %	Retentiotekijä (k)	RSD %	1.	6.	RSD %
Päällystyksen jälkeen	0,273	2,506	0,093	2,204	<b>0,772</b>	2,416	4,216	3,984	2,079
Lipidien poiston jälkeen	0,064	1,017	0,026	0,936	<b>0,125</b>	1,046	3,510	3,426	0,872
<b>Glukoosi -käsittelyn jälkeen</b>	0,062	0,478	0,026	0,481	<b>0,116</b>	0,466	3,391	3,353	0,442
Hapetuksen jälkeen	0,059	0,297	0,024	0,258	<b>0,112</b>	0,499	3,373	3,353	0,228
Päällystyksen jälkeen	0,290	4,332	0,097	4,090	<b>0,833</b>	4,157	4,296	3,856	3,929
Lipidien poiston jälkeen	0,066	0,778	0,026	0,732	<b>0,106</b>	0,975	3,431	3,364	0,714
<b>Glukoosi -käsittelyn jälkeen</b>	0,063	0,456	0,025	0,381	<b>0,100</b>	0,510	3,357	3,327	0,345
Hapetuksen jälkeen	0,064	0,240	0,023	0,199	<b>0,089</b>	0,396	3,362	3,346	0,166
Päällystyksen jälkeen	0,267	1,992	0,090	2,179	<b>0,755</b>	1,965	3,903	4,055	2,245
Lipidien poiston jälkeen	0,055	0,688	0,022	0,743	<b>0,087</b>	0,961	3,438	3,404	0,696
<b>Glukoosi -käsittelyn jälkeen</b>	0,054	1,590	0,022	1,532	<b>0,084</b>	1,514	3,427	3,309	1,514
Hapetuksen jälkeen	0,052	0,163	0,021	0,126	<b>0,078</b>	0,192	3,306	3,291	0,212

**Taulukko 17.** Steroidien retentiotekijöiden muutokset päällystyksen, lipidien poiston, glukoosikäsittelyn sekä hapetuksen jälkeen. Olosuhteet kuin taulukossa 11, paitsi glukoosi –käsittelyssä injektointi 40 min 50 mbar paineella.

Yhdiste	$\beta$ -Estradioli		Testosteroni		Progesteroni		$t_{eo}$ [min]		
	Retentiotekijä (k)	RSD %	Retentiotekijä (k)	RSD %	Retentiotekijä (k)	RSD %	1.	6.	RSD %
Päällystyksen jälkeen	0,291	2,896	0,098	2,670	<b>0,799</b>	2,581	4,423	4,138	2,468
Lipidien poiston jälkeen	0,047	2,411	0,023	2,197	<b>0,097</b>	2,450	3,533	3,348	2,164
<b>Glukoosi -käsittelyn jälkeen</b>	0,049	0,684	0,022	0,654	<b>0,093</b>	1,094	3,349	3,332	0,607
Hapetuksen jälkeen	0,047	0,935	0,028	0,446	<b>0,107</b>	0,389	3,384	3,403	0,316
Päällystyksen jälkeen	0,287	4,471	0,096	4,261	<b>0,824</b>	4,794	4,195	3,764	4,114
Lipidien poiston jälkeen	0,066	2,978	0,025	3,011	<b>0,107</b>	3,112	3,574	3,317	2,970
<b>Glukoosi -käsittelyn jälkeen</b>	0,062	2,685	0,024	2,703	<b>0,102</b>	2,714	3,323	3,479	2,669
Hapetuksen jälkeen	0,059	1,302	0,022	1,284	<b>0,096</b>	1,264	3,269	3,254	1,255

## 11 Yhteenveto

Mittaustekniikoiden kehittyminen tuo mukanaan paljon mahdollisuuksia. Biologisten molekyylien analytiikka on haastavaa, koska niiden aktiivisuus ja ominaisuudet usein muuttuvat niitä käsiteltäessä. Näistä mainittakoon mm. entsyymien aktiivisuus, joka saattaa kadota ja proteiinin denaturoituminen. Biosensorien kehittämisen tavoitteena on saada luotettavaa tietoa biologisista prosesseista ja hyödyntää tätä tietoa ihmisten hyvinvoinnin parantamiseksi. Biosensorien kehittämisen tavoitteena on valmistaa edullinen, kestävä ja luotettava biosensori esimerkiksi lääketieteelliseen käyttöön.

Kirjallisessa osassa käsiteltiin kvartsikidemikrovaaran sovelluksia biosensorina. Tulokset olivat hyvin lupaavia. QCM-biosensorilla eroteltiin R/S –enantiomeerit, määritettiin vasta-aine-antigeeniparin vuorovaikutuksia, valmistettiin kloramfenikolin määrittämiseen sopiva SAM-pinta, kvantitoitiin IgE-pitoisuus ihmisen plasmasta ja tutkittiin lääkeaineiden vaikutusta soluihin. QCM-biosensorien ongelmana on niiden huono herkkyys kvantitatiiviseen määrittämiseen. QCM-biosensorit tuottavat kuitenkin tärkeää tietoa biologisista vuorovaikutuksista ja reaktioiden kinetiikasta. Jatkossa QCM-sovellusten kehittämisen pääkohteina on varmasti sensoripintojen herkkyyden parantaminen sekä analyysiajan lyhentäminen. Tavoitteena on myös valmistaa sensoripinta, jota pystytään käyttämään useita kertoja pinnan ominaisuuksien siitä kärsimättä. Biosensoreiden kehittäminen sairauksien havaitsemiseksi ja hoitojen parantamiseksi on myös hyvin tärkeä tutkimusmotiivi.<sup>59</sup>

Kokeellisen osuuden työn tarkoituksena oli tutkia sokerikäsittelyn, hapettumisen, sekä lipidien poiston vaikutusta LDL-päällysteeseen kapillaarielektrokromatografisesti (CEC). Työssä saatiin aikaan hyvin stabiili LDL-päällyste molemmissa tutkituissa lämpötiloissa. Lisäksi lipidien poisto käyttämällä ionitonta pinta-aktiivista ainetta (Nonidet P-40) onnistui hyvin. Suhteelliset keskihajonnat olivat pieniä sekä päällystämässä että hapettamisessa. Sokerikäsittelyt kapillaarissa onnistuivat hyvin lukuun ottamatta yön yli jätettyjä kapillaareja. Nämä kapillaarit tukkeutuivat herkästi ja vaativat siksi pitkää huuhteluaikaa seuraavana päivänä. Hapetusprosessissa havaittiin teorian mukaiset LDL-partikkelien varausten muutokset EOF-liikkuvuuden muutoksina. Tulevaisuudessa olisi tärkeää tutkia yhä tarkemmin apoB-100 –partikkelin luonnetta erityisesti hydrofobisuuden osalta. Lisäksi hyviä tutkimuskohteita voisi olla myös apoB-



100 –päällysteen käsittelyt erityyppisillä yhdisteillä, kuten lipideillä. Uusia menetelmiä tutkia apoB-100 tarvitaan, jotta sen tarkemmasta toiminnasta kolesterolin metaboliassa voidaan päästä selville. Jos apoB-100 käyttäytymiseen LDL-partikkeleissa saadaan lisäselvyyttä, voitaisiin mahdollisesti tulevaisuudessa kehittää lääke, joka hyvin tehokkaasti ennaltaehkäisisi ateroskleroosin syntyä.

## Viiteluettelo

1. Zhang Q., Huang Y., Zhao R., Liu G., Chen Y., *Biosens. Bioelectron.* **24** (2008) 48-54.
2. Pei Z., Saint-Guirons J., Käck C., Ingemarsson B., Aastrup T., *Biosens. Bioelectron* **35** (2012) 200-205.
3. Singhal R., Takashima W., Kaneto K., Samanta S.B., Annapoorni S., Malhotra B.D., *Sens. Actuators B* **86** (2002) 42-48.
4. Hussain M., Wackerlig J., Lieberzeit P.A., *Biosensors* **3** (2013) 89-107.
5. Chaki N.K., Vijayamohan K., *Biosens. Bioelectron.* **17** (2002) 1-12.
6. Subramanian A., Irudayaraj J., Ryan T., *Sens. Actuators B* **114** (2006) 192-198.
7. Marxer C.G., Coen M.C., Bissig H., Greber U.F. ja Schlapbach L., *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 570-577.
8. Curie J., Curie P., *Rendu* **91** (1880) 294-297.
9. Anderson H., *Development of electroacoustic sensors for biomolecular interaction analysis*, väitöskirja, Uppsalan yliopisto (2009).
10. Su X., Wu Y.-J., Knoll W., *Biosens. Bioelectron.* **21** (2005) 719-726.
11. Sauerbrey G., *Z. Phys.* **155** (1959) 206-222.
12. Marx K. A., *Biomacromolecules* **4** (2003) 1099-1120.
13. [www.attana.com](http://www.attana.com) (7.8.2013)
14. Janshoff A., Galla H.-J., Steinem C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 4004-4032.
15. Davis F., Higson S.P.J., *Biosens. Bioelectron.* **21** (2005) 1-20.
16. Reimhult E., Larsson C., Kasemo B., Höök F., *Anal. Chem.* **76** (2004) 7211-7220.
17. Kößlinger C., Uttenthaler E., Drost S., Aberl F., Wolf H., Brink G., Stanglmaier A., Sackmann E., *Sens. Actuators B* **24-25** (1995) 107-112.
18. Frasconi, M., Mazzei F., Ferri T., *Anal Bioanal Chem* **398** (2010) 1545-1564.
19. Rusmini F., Zhong Z., Feijen J., *Biomacromolecules* **8** (2007) 1775-1789.
20. Love J.C., Wolfe D.B., Haasch R., Chabiny M.L., Paul K.E., Whitesides G.M., Nuzzo R.G., *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 2597-2609.
21. Jonkheijm P., Weinrich D., Schröder H., Niemeyer C.M., Waldmann H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 9618-9647.

22. Love J.C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M., *Chem. Rev.* **105** (2005) 1103-1169.
23. Ishida T., Mizutani W., Azebara H., Sato F., Choi N., Akiba U., Fujihira M., Tokumoto H., *Langmuir* **17** (2001) 7459-7463.
24. Yan D., Saunders J.A., Jennings G.K., *Langmuir* **19** (2003) 9290-9296.
25. Carvalho A., Geissler M., Schmid H., Michel B., Delamar E., *Langmuir* **18** (2002) 2406-2412.
26. Mekhalif Z., Laffineur F., Couturier N., Delhalle J., *Langmuir* **19** (2003) 637-645.
27. Li Z., Chang S-C., Williams R-S., *Langmuir* **19** (2003) 6744-6749.
28. Mrksich M., *Acta Biomater* **5** (2009) 832-841.
29. Fleming B.D., Praporski S., Bond A.M., Martin L.L., *Langmuir* **24** (2008) 323-327.
30. Su L., Kelly J.B., Hawkrigde F.M., Rhoten M.C., Baskin S.I., *J. Electroanal. Chem.* **581** (2005) 241-248.
31. de Groot M.T., Evers T.H., Merckx M., Koper M.T.M., *Langmuir* **23** (2007) 729-736.
32. Gray J.J., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** (2004) 110-132.
33. Herrwerth S., Eck W., Reinhardt S., Grunze M., *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 9359-9366.
34. Sullivan T.P., Huck W.T.S., *Eur. J. Org. Chem.* (2003) 17-29.
35. Houseman B.T., Gawalt E.S., Mrksich M., *Langmuir* **19** (2003) 1522-1529.
36. Ducker R.E., Montague M.T., Leggett G.J., *Biointerfaces* **3** (2008) 59-65.
37. Subramanian A., Irudayaraj J., Ryan T., *Biosens. Bioelectron.* **25** (2006) 998-1006.
38. Smith E.A., Thomas W.D., Kiessling L.L., Corn R.M., *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 6140-6148.
39. Lata S., Piehler J., *Anal. Chem.* **77** (2006) 1096-1105.
40. Ludden M.J.W., Li X., Greve J., van Amerongen A., Escalante M., Supramaniam V., Reinhoudt D.N., Huskens J., *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 6964-6973.
41. Ludden M.J.W., Reinhoudt D.N., Huskens J., *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 1122-1134.

42. Ludden M.J.W., Mulder A., Tampé R., Reinhoudt D.N., Huskens J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 4104-4107.
43. Elie-Caille C., Fliniaux O., Pantigny J., Mazière J-C., Bourdillon C., *Langmuir* **21** (2005) 4661-4668.
44. Mun S., Choi S-J., *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 2522-2527.
45. Jung S.H., Son H.Y., Yuk J.S., Jung J.W., Kim K.H., Lee C.H., Hwang H., Ha K.S., *Colloid Surf. B: Biointerf.* **47** (2006) 107-111.
46. Smith C.L., Milea J.S., Hguyen G.H., *Top. Curr. Chem.* **261** (2006) 63-90.
47. Laitinen O.H., Nordlund H.R., Hytönen V.P., Kulomaa M.S., *Trends in Biotechnology* **25** (2007) 269-277.
48. Ogiso M., Matsuoka K., Okada T., Imai T., Itoh M., Imamura T., Haga Y., Hatanaka K., Minoura N., *J. Colloid Interf. Sci.* **393** (2013) 257-263.
49. Ekblad T., Liedberg B., *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **15** (2010) 499-509.
50. Smith R.K., Lewis P.A., Weiss P.S., *Progress in Surf. Sci.* **75** (2004) 1-68.
51. Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier D., *Biotech. Advances* **30** (2012) 489-511.
52. Gooding J.J., Mearns F., Yang W., Liu J., *Electroanalysis* **15** (2003) 81-96.
53. Johnson P.A., Levicky R., *Langmuir* **19** (2003) 10288-10294.
54. Arya S.K., Solanki P.R., Datta M., Malhotra B.D., *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 2810-2817.
55. Kim H., Cho I.H., Park J.H., Kim S., Paek S.H., Noh J., Lee H., *Colloids Surf. A* **313-314** (2008) 541-544.
56. Su X., Zhang J., *Sens. Actuators B* **100** (2004) 309-314.
57. Park I-S., Kim D-K., Adanyi N., Varadi M., Kim N., *Biosens. Bioelectron.* **19** (2004) 667-674.
58. Su W.C., Zhang W.G., Zhang S., Fan J., Yin W., Luo M.L., Ng S.C., *Biosens. Bioelectron.* **25** (2009) 488-492.
59. Marx K.A., Zhou T., Montrone A., McIntosh D., Braunhut S.J., *Anal. Biochem.* **361** (2007) 77-92.
60. Ayela C., Roquet F., Valera L., Granier C., Nicu L., Pugnère M., *Biosens. Bioelectron.* **22** (2007) 3113-3119.
61. Nelson D. L., Cox M. M., *Lehninger – Principles of biochemistry*, 5. p., W.H. Freeman and Company, USA, 2008, s.836-839.
62. Vainikka K., Chen J., Metso J., Jauhiainen M. ja Riekkola M.-L., *Electrophoresis* **28** (2007) 2267-2274.

63. D'Ulivo L., Chen J., Meinander K., Öörni K., Kovanen P. T. ja Riekkola M.-L., *Anal. Biochem.* **383** (2008) 38-43.
64. Ruiz-Jiménez J., Kuldvee R., Chen J., Öörni K., Kovanen P. ja Riekkola M.-L., *Electrophoresis* **28** (2007) 779-788.
65. Pentikäinen M. O., Öörni K., Ala-Korpela M., ja Kovanen P. T., *J Intern Med* **247** (2000) 359-370.
66. Riekkola M.-L., Hyötyläinen T., *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat*, 2. p., Analyttisen kemian laboratorio, Helsinki, 2002, s.220-260.
67. Kuldvee R., D'Ulivo L., Yohannes G., Lindenburg P. W., Laine M., Öörni K., Kovanen P., ja Riekkola M.-L., *Anal. Chem.* **78** (2006) 2665-2671.
68. Albertini R., Moratti R., ja De Luca G., *Curr. Molec. Med.* **2** (2002) 579-592.
69. Hessler J. R., Morel D. W., Lewis L. J., ja Chisolm G. M., *Arterioscl.* **3** (1983) 215-222.
70. Quinn M. T., Parthasarathy S., Fong L., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 5949-5953.
71. Palinski W., Tangirala R. K., Miller E., Young S. G., Witztum J. L., *Arterioscl. Thromb.* **13** (1995) 331-337.

## **Liitteet**

**Liite 1** LDL-päällystyksen ja lipidien poiston jälkeen saadut retentiotekijöiden arvot, taulukko.

**Liite 2** LDL-päällystyksen ja lipidien poiston jälkeen ajettujen elektroferogrammien esimerkit.

**Liite 3** Kahden kapillaarin hapetus 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ :lla 5 h ajan, EOF –liikkuvuudet sekä DMSO:n migraatioaikojen keskiarvo.

**Liite 4** Esimerkit LDL-glukoosi päällystyksen jälkeen ajettujen DMSO:n ja steroidien elektroferogrammeista.

**Liite 5** Esimerkit LDL-päällystyksen, lipidien poiston, glukoosikäsittelyn sekä hapetuksen jälkeen saaduista elektroferogrammeista.

## Liite 1

Taulukon päällystysten ja lipidien poiston analyysiolosuhteet on kuvattu tekstin yhteydessä kappaleessa 5.2 taulukossa 3.

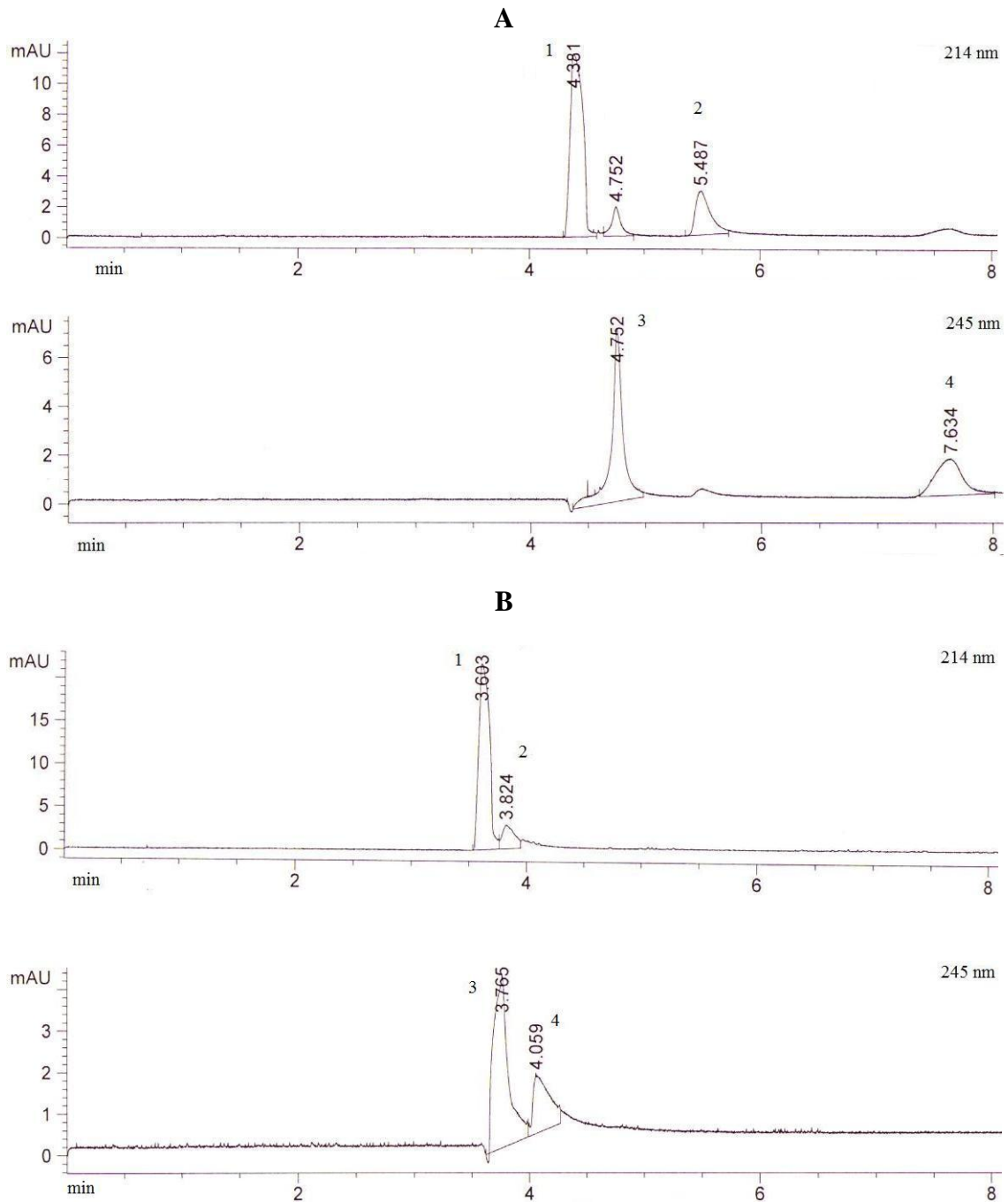
LIITE 1

Yhdiste	$\beta$ -estradioli		testosteroni		progesteroni		DMSO [min]	
	k	RSD %	k	RSD %	k	RSD %	keskiarvo	RSD %
<b>Päällystämisen jälkeen (1)</b>	0,252	0,876	0,085	0,848	<b>0,734</b>	0,765	4,442	0,867
<b>Lipidien poiston jälkeen (2)</b>	0,061	0,978	0,026	0,919	<b>0,109</b>	0,843	3,655	0,923
1	0,258	2,419	0,087	2,169	<b>0,737</b>	2,448	4,106	2,096
2	0,058	0,788	0,024	0,682	<b>0,099</b>	0,919	3,429	0,630
1	0,233	1,831	0,078	1,697	<b>0,653</b>	1,914	4,240	1,610
2	0,053	0,858	0,021	0,792	<b>0,087</b>	1,005	3,605	0,756
1	0,259	3,187	0,086	3,046	<b>0,736</b>	3,329	4,389	2,975
2	0,048	0,698	0,022	0,635	<b>0,085</b>	0,747	3,664	0,597
1	0,284	3,449	0,092	3,147	<b>0,806</b>	3,487	3,996	3,052
2	0,063	0,435	0,023	0,434	<b>0,086</b>	0,577	3,456	0,396
1	0,273	2,506	0,093	2,204	<b>0,772</b>	2,416	4,079	2,079
2	0,064	1,017	0,026	0,936	<b>0,125</b>	1,046	3,461	0,872
1	0,290	4,332	0,097	4,090	<b>0,833</b>	4,157	4,043	3,929
2	0,066	0,778	0,026	0,732	<b>0,106</b>	0,975	3,391	0,714
1	0,267	1,992	0,090	2,179	<b>0,755</b>	1,965	4,044	2,245
2	0,055	0,688	0,022	0,743	<b>0,087</b>	0,961	3,400	0,696
1	0,291	2,896	0,098	2,670	<b>0,799</b>	2,581	4,266	2,468
2	0,047	2,411	0,023	2,197	<b>0,097</b>	2,450	3,437	2,164
1	0,287	4,471	0,096	4,261	<b>0,824</b>	4,794	3,978	4,114
2	0,066	2,978	0,025	3,011	<b>0,107</b>	3,112	3,390	2,970
1	0,257	1,740	0,087	1,557	<b>0,757</b>	1,937	3,962	1,487
2	0,063	0,761	0,026	0,711	<b>0,111</b>	0,915	3,295	0,678
1	0,284	3,984	0,096	3,886	<b>0,816</b>	3,733	3,980	3,743
2	0,066	1,033	0,025	1,028	<b>0,119</b>	1,329	3,808	1,008
1	0,251	1,858	0,083	1,869	<b>0,709</b>	1,815	4,286	1,885
2	0,051	1,466	0,021	1,408	<b>0,079</b>	1,634	3,529	1,366
1	0,294	2,309	0,095	2,089	<b>0,824</b>	2,360	4,123	2,033
2	0,072	0,721	0,026	0,541	<b>0,132</b>	0,714	3,585	0,485

keskiarvo (1)	0,270	0,090	0,768
keskihajonta (1)	0,019	0,006	0,052
RSD % (1)	<b>7,0</b>	<b>6,7</b>	<b>6,8</b>
keskiarvo (2)	0,060	0,024	0,102
keskihajonta (2)	0,008	0,002	0,016
RSD % (2)	<b>12,8</b>	<b>8,2</b>	<b>16,0</b>
<b>n=13</b>			

## LIITE 2

LDL-päällystyksen ja lipidien poiston jälkeen ajettujen elektroferogrammien esimerkit yhden kapillaarin osalta aallonpituuksilla 214 nm ja 245 nm.



**Kuva A:** LDL-päällystyksen jälkeen saatu elektroferogrammi, yhdisteet: 1=DMSO, 2= $\beta$ -Estradioli, 3=Testosteroni, 4=Progesteroni.

**Kuva B:** Lipidien poiston jälkeen saatu elektroferogrammi, yhdisteiden numerointi vastaava kuin kuvassa A.



Analyysiolosuhteet:  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ , DMSO 0,14 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL:n konsentraatio proteiinikonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,1\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). Steroidien pitoisuus näytteessä noin 7,1  $\mu\text{g/ml}$ . Diodirividetektor, aallonpituudet 214 nm ja 245 nm. Päälystämässä: seisotusaika 15 min ja BGE -huuhtelu 15 min paineella 940 mbar. Lipidien poisto: 0,1 mM Nonidet P-40 (tarkemmin kappale 4.4).

### LIITE 3

Alla olevassa taulukossa on esitetty kahden 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ :lla 5 h ajan hapetetun kapillaarin tulokset.

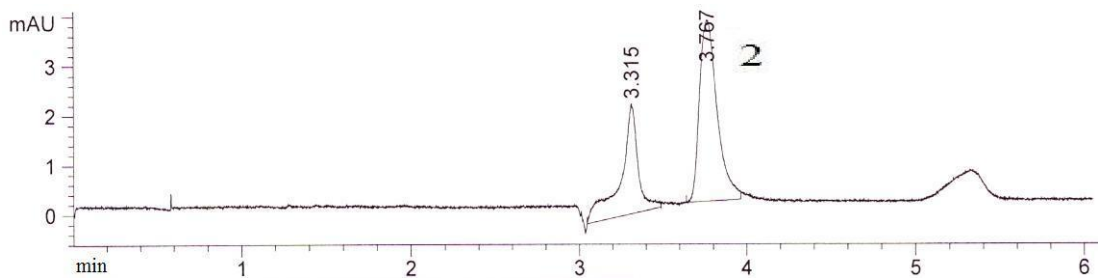
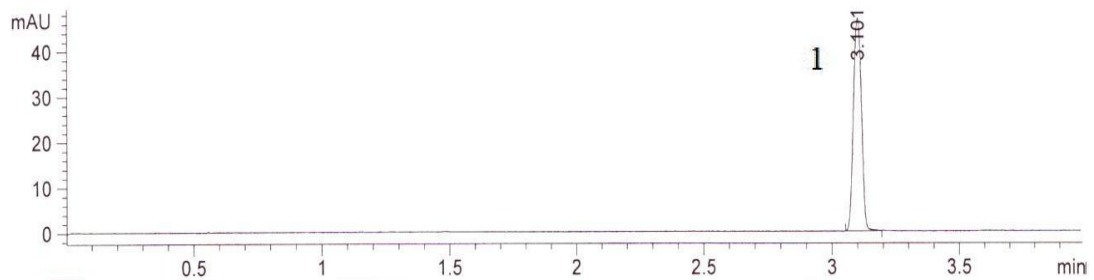
Analyysiolosuhteet:  $T = +25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ ,  $L_{tot} = 38,5\text{ cm}$  ja  $L_{det} = 30,0\text{ cm}$ . DMSO 0,14 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL:n konsentraatio proteiinikonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,1\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). LDL-päällystämässä: seisotusaika 15 min ja BGE -huuhtelu 15 min paineella 940 mbar. Lipidien poisto 0,1 mM Nonidet P-40 -liuos, hapetus 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .

Aine	$t_{eo}$ [min]		
Muuttuja	Elektro-osmoottinen liikkuvuus $\mu_{eo}$	keskiarvo	RSD %
<b>Lipidien poiston jälkeen</b>	2,63	3,66	0,60
	2,67	3,61	0,76
<b>Hapettamisen jälkeen</b>	2,67	3,61	0,69
	2,59	3,71	0,79

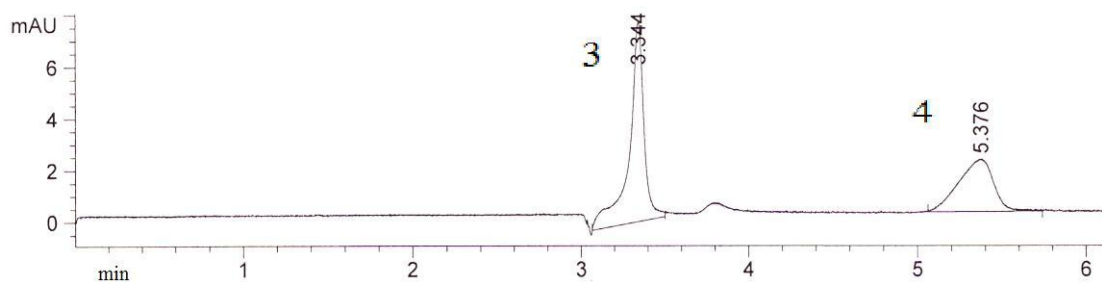
## LIITE 4

LDL-glukoosi päällystyksen jälkeen ajettujen DMSO:n ja steroidien elektroferogrammit. Yhdisteiden nimet: 1=DMSO, 2= $\beta$ -Estradioli, 3=Testosteroni ja 4=progesteroni. Analyysin olosuhteet:  $T = +37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ ,  $L_{tot} = 38,5\text{ cm}$  ja  $L_{det} = 30,0\text{ cm}$ . DMSO 0,17 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL-glukoosin konsentraatio proteiinkonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,015\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). LDL-päällystämisessä: seisotusaika 15 min ja BGE -huuhtelu 15 min paineella 940 mbar. Steroidien konsentraatio näytteessä noin 8,3  $\mu\text{g/ml}$ . Aallonpituudet: 214 nm (DMSO ja  $\beta$ -estradioli) sekä 245 nm (testosteroni ja progesteroni).

$\lambda=214\text{ nm}$



$\lambda=245\text{ nm}$

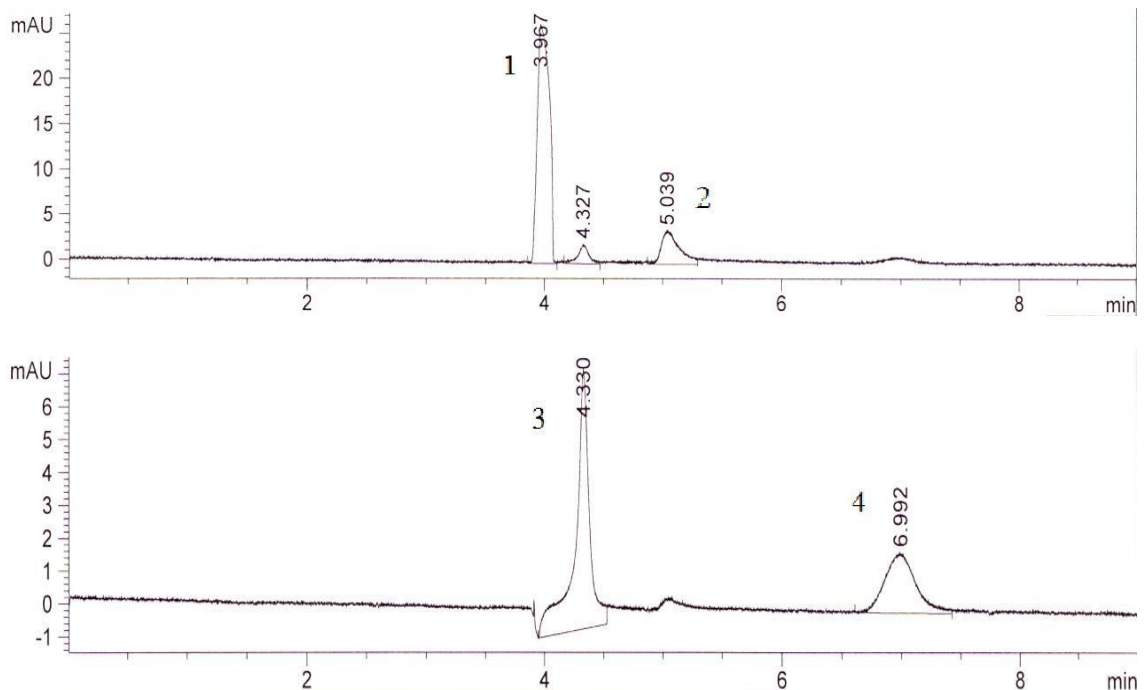


## LIITE 5

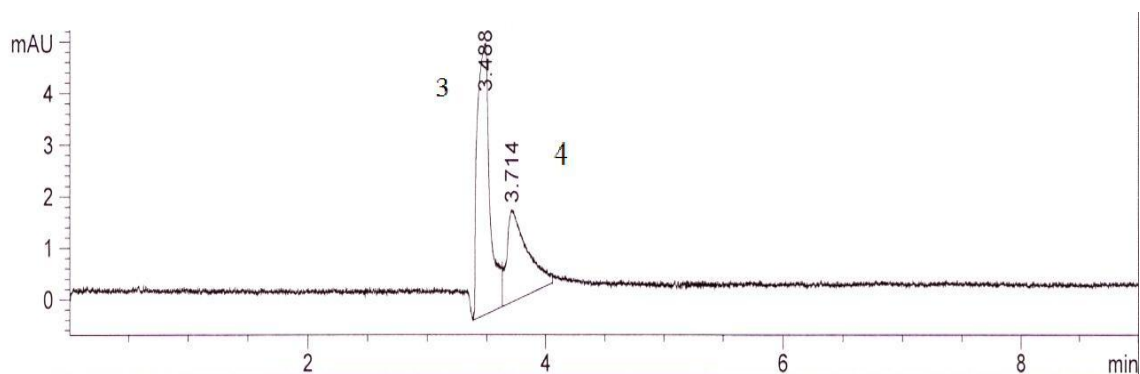
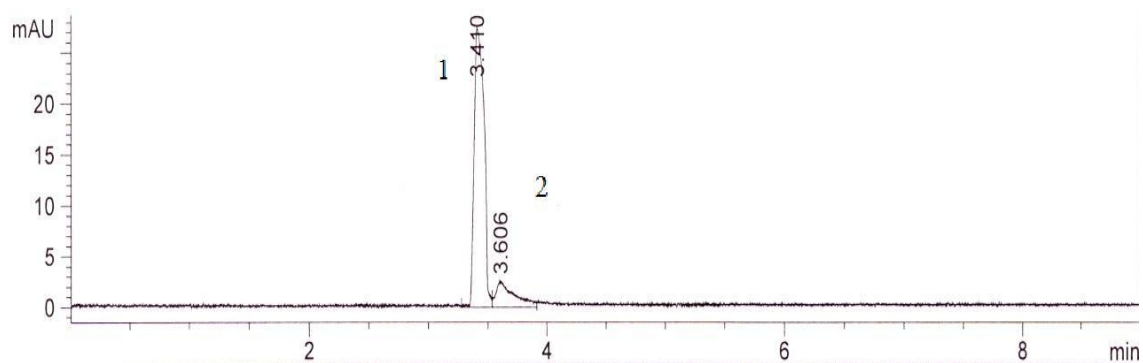
Kuvassa A on esitetty LDL-päällystyksen jälkeen ajetun näytteen elektroferogrammit. Yhdisteet 1 ja 2 on detektoitu käyttämällä aallonpituutta 214 nm ja yhdisteet 3 ja 4 käyttämällä aallonpituutta 245 nm. Kuvassa B on vastaavat piikit lipidien poiston jälkeen. Kuvassa C on esitetty saadut elektroferogrammit 15 min glukosikäsittelyn jälkeen. Kuvassa D on glukosikäsittelyn jälkeen suoritetun hapetuksen jälkeen saadut elektroferogrammit. Yhdisteet: 1=DMSO, 2= $\beta$ -Estradioli, 3=Testosteroni ja 4=progesteroni.

Analyysin olosuhteet:  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $U = +20\text{ kV}$ ,  $L_{tot} = 38,5\text{ cm}$  ja  $L_{det} = 30,0\text{ cm}$ . DMSO 0,14 % (v/v) fosfaattipuskurissa,  $I = 20\text{ mM}$ ,  $pH = 7,4$ . Paineinjektointi, 50 mbar, 2 s. LDL-glukoosin konsentraatio proteiinkonsentraationa ilmoitettuna on  $c_{LDL} = 0,1\text{ mg/ml}$  laimennettuna fosfaattipuskuriin (BGE). LDL-päällystämässä: seisotusaika 15 min ja BGE -huuhtelu 15 min paineella 940 mbar. Steroidien konsentraatio näytteessä noin  $7,1\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Aallonpituudet: 214 nm (DMSO ja  $\beta$ -estradioli) sekä 245 nm (testosteroni ja progesteroni). Lipidien poisto: 0,1 mM Nonidet P-40 -liuos, glukosikäsittely: 15 min 20 % (w/w) glukosihuuhtelu 50 mbar paineella, 15 min seisotusaika ja 15 min BGE huuhtelu. Hapetusreaktio:  $10\text{ }\mu\text{M CuSO}_4$  5 h.

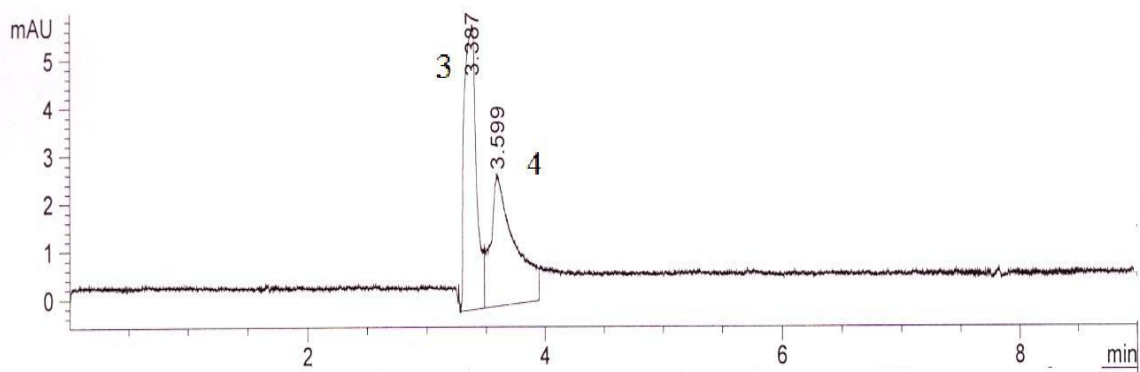
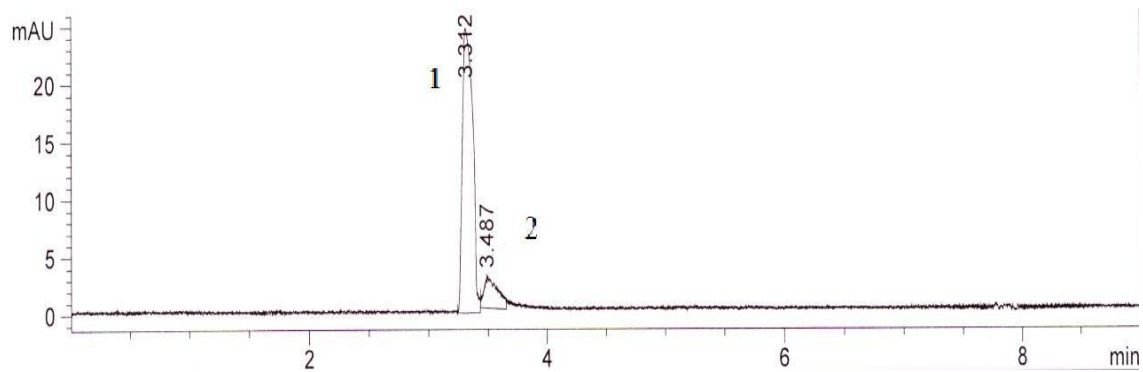
A = LDL-päällysteen jälkeen



B = lipidien poiston jälkeen



C = glukoosikäsittelyn jälkeen



D = hapetuksen jälkeen

