

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

Syksy 2018

Salla Vuolamo

**ANALYYSIMENETELMIEN
KEHITTÄMINEN
INJEKTOITAVALLE
HYDROGEEELILLE
BIOFARMASEUTTISEN
MALLIAINEEN ANNOSTELUUN**

Salla Vuolamo

ANALYYSIMENETELMIEN KEHITTÄMINEN INJEKTOITAVALLE HYDROGEELILLE BIOFARMASEUTTISEN MALLIAINEEN ANNOSTELUUN

Biofarmaseuttiset lääkevalmisteet ovat bioteknologian avulla tuotettuja biologisia lääkeaineita, joiden käyttö lääkevalmisteina on yleistynyt. Synteettiset ja bioyhteesopivat biomateriaalit ovat merkittävässä ja kasvavassa asemassa biofarmaseuttisten proteiinien ja muiden lääkeaineiden kontrolloidussa annostelussa. Yleisesti käytetystä silikahydrogeelistä voidaan kehittää annostelijoita, jotka vapauttavat lääkeaineen tasaisesti halutulla nopeudella ennalta määritetyn ajanjakson ajan. Kontrolloidulla lääkeannostelulla voidaan vaikuttaa hoidon turvallisuuteen ja luotettavuuteen samalla vähentäen lääkehävikkiä sekä sivuvaikutuksia.

Opinnäytetyössä tutkittiin biofarmaseuttisille lääkeaineille mallina toimivan proteiinin (GFP, *Green fluorescent protein*) kontrolloitua vapautumista injektoitavasta silikahydrogeelistä dissoluutiotesteissä. Tarkoituksena oli kehittää luotettava kvantitatiivinen eli määrällinen analyysimenetelmä silikahydrogeelistä vapautuneen GFP:n mittaukseen. Työssä vertailtiin kolmea eri menetelmää (Bradford, Micro BCA ja fluorometria), sekä kehitettiin toimivaa ja luotettavaa käänteisfaasinestekromatografimenetelmää (RP-HPLC) GFP:n määrittämiseen. Lisäksi pohdittiin HPLC:n käyttöönoton mahdollisuutta dissoluutionäytteiden kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen eli laadulliseen analysointiin.

Tulosten perusteella GFP:n kvantitatiivisia analyysimenetelmiä pitää kehittää edelleen. Silikahydrogeelin liukoisuustuotteen todettiin häiritsevän mittaussignaaleja kaikilla käytetyillä menetelmillä, mutta häiriön riippuvuutta konsentraatioista pitää vielä tutkia. Silikan liukenemistulokset osoittivat, että valmistettujen hydrogeelien rakenteellisessa homogeenisuudessa oli merkittäviä eroja.

Kehitetty HPLC-menetelmä vapautuneen GFP:n määrittämiseen vaatii vielä lisää tutkimustyötä, jotta se soveltuisi dissoluutiotestin kvantitatiiviseksi ja kvalitatiiviseksi analyysimenetelmäksi. Opinnäytetyön tulokset osoittivat, ettei dissoluutiotestinäytteiden proteiinkonsentraatio ole riittävä käytetyllä HPLC-menetelmällä analysoitavaksi.

ASIASANAT:

dissoluutio, fluorometria, GFP, käänteisfaasinestekromatografia (RP-HPLC), lääkeaineannostelu, silikahydrogeeli, spektroskopia

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2018 | Pages 82

Mika Jokinen, Principal Lecturer, Turku University of Applied Sciences

Salla Vuolamo

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR RELEASE OF BIOPHARMACEUTICALS FROM INJECTABLE HYDROGEL

Biopharmaceuticals, usually proteins, are medical drugs produced by using biotechnology. These drugs have gradually gained medical acceptance and popularity in the pharmaceutical industry. The use of synthetic and the biocompatible biomaterials has increased significantly as carrier materials in drug-controlled release for biopharmaceutical proteins and other drugs. For example, silica hydrogel combined with the drug can be used as a drug delivery system by delivering the drug controlledly in a predictable and characterizable manner. Controlled drug delivery has a positive impact on the safety and reliability of medical treatment while also reducing drug waste and side effects.

This thesis studied the release of encapsulated *Green Fluorescent Protein* from injectable silica hydrogel in dissolution tests. GFP was used as a model molecule for the biopharmaceutical drug. The purpose of the thesis was to develop a reliable quantitative method for released GFP determination. Three different quantitative methods (Bradford, Micro BCA, and fluorometry) were compared. In addition, a reliable and functional reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for GFP was developed. Also, the potential of HPLC in the quantitative and qualitative analysis of dissolution samples was studied in this thesis.

Based on the results, the quantitative analysis methods for released GFP determination need to be developed further. The solubility product of silica-hydrogel was detected to interfere with the measured signals in each tested method, but further studies are required to understand the relationship between the interference and the concentrations. The results for the dissolved silica proved that there were significant differences between the structural homogeneities of the hydrogels used.

The HPLC method for the release of GFP developed in this thesis requires more research so as to be suitable for use as the quantitative and qualitative analytical method of the dissolution test. The results indicated that the protein concentration of the dissolution samples was not sufficient to be analyzed by the developed HPLC method.

KEYWORDS:

dissolution, drug delivery, fluorometry, GFP, reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), silica hydrogel, spectroscopy

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	9
1 JOHDANTO	11
2 BIOMATERIAALIT JA LÄÄKEANNOSTELU	13
2.1 Biomateriaalit lääkeannostelussa	13
2.1.1 Biohajoava SiO ₂ -hydrogeeli	15
2.2 Kontrolloitu lääkeannostelu	16
2.2.1 Neulainjektointi	17
2.3 Lääkeaineen kontrolloitu vapautuminen polymeeripohjaisesta biomateriaalista	18
2.3.1 <i>In sink</i> -olosuhteet	19
3 BIOFARMASEUTTISET PROTEIINIT JA GFP	21
3.1 Vihreä fluoresoiva proteiini (GFP)	22
4 SOOLI-GEELIPROSESSOITU SiO₂	24
5 ANALYYSIMENETELMÄT JA -LAITTEET	27
5.1 UV/Vis -spektroskopia	27
5.1.1 Reaktiivisen silikaatin määrittäminen spektrofotometrisesti (UV/Vis)	28
5.1.2 Shimadzu UV-1800 -spektrofotometri (UV/Vis)	29
5.1.3 NanoDrop ND-1000 -spektrofotometri (UV/Vis)	29
5.1.4 Hidex Sense -spektrofotometri	30
5.2 Bradford-proteiinimääritys	31
5.3 Micro BCA -proteiinimääritys	31
5.4 Fluoresenssispektroskopia ja aikaerotteinen fluorometria	32
5.5 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	34
5.5.1 Käänteisfaasinestekromatografia UV/Vis -detektorilla	37
6 MATERIAALIEN VALMISTUS JA DISSOLUUTIOANALYYSIT	39
6.1 GFP:tä sisältävän injektoitavan hydrogeelin valmistus	39
6.1.1 Silikasoolin valmistus	39
6.1.2 Etanolin haihdutus soolista	42
6.1.3 Geelin valmistus ja GFP:n kapselointi	43
6.2 Dissoluutiotestin suoritus injektoitavalle GFP-silikahydrogeelille ja näytteenotto	44

6.2.1 <i>In sink</i> -rajan testaus ja optimointi	45
6.3 Silikahydrogeelin liukenemisnopeuden tutkiminen	46
6.3.1 Silikanäytteiden esikäsittely	46
6.4 Vapautuneen GFP:n proteiinipitoisuuden määrittäminen	47
6.4.1 GFP:n määrittäminen Bradford-analyysillä	47
6.4.2 GFP:n määrittäminen Micro BCA -analyysillä	47
6.4.3 GFP:n määrittäminen fluorometrisesti	48
6.5 GFP:n ja SiO ₂ :n häiriöttestaus analyysimenetelmille	48
6.6 TRIS-puskurin häiriöttestaus analyysimenetelmille	49
7 RP-HPLC-UV/VIS –MENETELMÄN KEHITYS GFP:N MÄÄRITYKSEEN	50
7.1 Spektrofotometrinen mittaus NanoDrop:lla (UV/Vis)	50
7.2 HPLC-laitteisto ja -kolonnin valinta	51
7.3 HPLC-ajoliuosten valinta ja valmistus	51
7.4 HPLC-menetelmän kehitys	51
8 TULOKSET JA POHDINTA	53
8.1 <i>In sink</i> -rajan tutkiminen ja dissoluutiotestin optimointi	53
8.2 GFP:n ja SiO ₂ :n häiriöttestaus	55
8.3 Tris-puskurin häiriöttestaus	58
8.4 Silikahydrogeelin liukenemisnopeus	58
8.5 GFP:n teoreettinen vapautumisnopeus	63
8.6 GFP:n vapautumisnopeuden määrittäminen eri analyysimenetelmillä	65
8.6.1 Analyysimenetelmien tulosten vertailu	67
8.7 Tris-puskurin häiriöttestaus NanoDrop:lle (UV/Vis) ja RP-HPLC-UV/Vis:lle	69
8.8 GFP-liuosten määrittäminen NanoDrop:lla (UV/Vis)	70
8.9 RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän kehitys GFP:n määrittämiseksi	71
8.9.1 RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän käyttöönotto dissoluutiotestissä	75
9 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	76
LÄHTEET	79

LIITTEET

- Liite 1. Sooli-geeli –laskuri
- Liite 2. Silikahydrogeelin valmistukseen ja dissoluutiotestiin liittyvät laskut
- Liite 3. Silikahydrogeelin todellisen R-arvon laskeminen
- Liite 4. Tris(hydroksimetyyli)aminometaanipuskuriliuoksen eli Tris -puskurin valmistus
- Liite 5. Reaktiivisen silikaatin määrittäminen spektrofotometrisesti
- Liite 6. Piin standardisuora
- Liite 7. Bradford-proteiinimääritys GFP-proteiiniliuokselle
- Liite 8. BSA-standardisuora (Bradford)
- Liite 9. Micro BCA-proteiinimääritys GFP-proteiiniliuokselle
- Liite 10. BSA-standardisuora (Micro BCA)
- Liite 11. GFP:n standardisuora fluoresenssimittaukseen
- Liite 12. Tris-puskurin aiheuttamat absorbanssitaustat eri analyysimenetelmillä mitattuna
- Liite 13. Liuenneen silikan mittaustulokset
- Liite 14. Esimerkki silikapitoisuuden laskemisesta näytteessä
- Liite 15. Esimerkki silikan liukenemisnopeuden ja geelin kokonaisliukenemisajan laskemisesta
- Liite 16. GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden laskeminen
- Liite 17. GFP:n vapautusmittaustulokset eri analyysimenetelmillä
- Liite 18. Esimerkki GFP:n mittaustulosten laskemisesta
- Liite 19. GFP-liuosten kromatogrammitulokset (RP-HPLC-UV/Vis)
- Liite 20. RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän työohje GFP-proteiiniliuoksen määrittämiseen

KAAVAT

Kaava 1 Lambert-Beerin lain yhtälö	28
Kaava 2 Standardisuoran yhtälö silikaattiyhdisteen pitoisuuden laskemiseen	28
Kaava 3 Kapasiteettitekijää kuvaava yhtälö	35

KUVAT

Kuva 1 GFP-proteiinin kolmiulotteinen sylinterimäinen rakenne (kuvan alkuperäislähde: Tsien 1998)	23
Kuva 2 Shimadzu UV-1800 -spektrofotometri (kuvan alkuperäislähde: American laboratory trading 2018)	29
Kuva 3 NanoDrop® ND-1000 -spektrofotometri (kuvan alkuperäislähde: The Genomics Core Facility)	30
Kuva 4 Hidex Sense -spektrofotometri (kuvan alkuperäislähde: Hidex 2015)	30
Kuva 5 Bikinkoniinihapon ja pelkistyneen kupari-ionin välinen reaktio, jossa syntyy violetin värinen kompleksi (kuvan alkuperäislähde: Thermo Scientific)	32
Kuva 6 Lähtöaineen komponenttien erottelu neljänä ajan hetkenä. Vasemmalla kuvataan lähtötilannetta, jossa näytteen komponentit ovat vielä sekoittuneena. Oikealla	

näytteen sisältämät komponentit (A, B ja C) ovat erottuneet toisistaan ominaisuuksiensa perusteella. (kuvan alkuperäislähde: Laine 2009)	35
Kuva 7 Kromatogrammiesimerkki. Poikkiakselina on aika ja pystyakselina detektorin vaste. Kuvassa A-, B- ja C-yhdisteet ovat eluoituneet stationäärifaasista eri aikoina. A-yhdiste on eluoitunut nopeimmin, joten sen retentioaika (t_R) on pienin. B- ja C -yhdisteet ovat eluoituneet hitaammin, minkä vuoksi niiden piikkien leveys (W) on suurempi. Kuollut aika (t_0) kuvastaa liikkuvan faasin saapumista detektorille. (Kuvan alkuperäislähde: Laine 2009)	36
Kuva 8 Soolin valmistuksessa käytetty virtauseste	40
Kuva 9 Soolin valmistuksessa käytetty virtauseste 600 ml:n dekantterilasissa	40
Kuva 10 Soolin valmistuksen koejärjestely ja laitteisto	41
Kuva 11 Etanolin (EtOH) konsentraation laskemiseksi suoritetun haihuttamisen koejärjestely	42
Kuva 12 Esimerkkikuva ~R100-GFP-silikaahydrogeelistä petrifilmillä suljetussa 1 ml:n lääkeruiskussa	43
Kuva 13 Esimerkkikuva dissoluutiotesteissä käytetystä injektioiläakeruiskusta	45

KUVIOT

Kuvio 1 Hydrogeelin verkostomainen rakenne (muokattu: Sundström 2016)	14
Kuvio 2 Aineen liukeneminen in sink- ja ei -in sink -olosuhteissa (muokattu: Vartija 2017)	20
Kuvio 3 Fluoresenssi-ilmiön vaiheet	33
Kuvio 4 Aikaerotteisen fluoresenssimittauksen periaate (muokattu: Vartija 2017)	34
Kuvio 5 Korkean erotuskyvyn nestekromatografian laitteiston kaaviokuva	37
Kuvio 6 Esimerkkikuva eksotermisen reaktion etenemisestä R80-soolin valmistuksessa	41
Kuvio 7 Testin geeliruiskujen ryhmittely samasta soolierästä (~R80)	44
Kuvio 8 <i>In sink</i> -rajan optimointi ~R100-silikaahydrogeelille	55
Kuvio 9 Silikan häiriöttestaus Micro BCA -analyysissä	56
Kuvio 10 Silikan häiriöttestaus GFP:n fluoresenssimittauksessa (keskiarvo)	57
Kuvio 11 ~R100-silikaahydrogeelin liukenemisnopeus (ruiskut 1 ja 2)	60
Kuvio 12 Silikaahydrogeelin liukenemisnopeuden lineaarisuuden tutkiminen geeliruiskun 1 Falconeille	62
Kuvio 13 Silikaahydrogeelin liukenemisnopeuden lineaarisuuden tutkiminen geeliruiskun 2 Falconeille	62
Kuvio 14 GFP-proteiinin teoreettinen vapautumisnopeus	65
Kuvio 15 GFP-proteiinin vapautumismittaustulokset kumulatiivisena ajan funktiona fluoresenssimittauksessa	66
Kuvio 16 GFP-proteiinin vapautumismittaustulokset kumulatiivisena ajan funktiona Bradford-mittauksessa	66
Kuvio 17 GFP-proteiinin vapautumismittaustulokset kumulatiivisena ajan funktiona Micro BCA -mittauksessa	67
Kuvio 18 GFP-proteiinin vapautumistulosten vertailu eri menetelmillä. Teoreettisen GFP:n vapautumista kuvastaa ruiskun 2 geelien keskiarvoon perustuvan vapautumisen arvio	68
Kuvio 19 Kaupallisen GFP-liuoksen absorbanssitulokset laajan spektrin mittauksessa (NanoDrop, UV/Vis)	70
Kuvio 20 Itsetuotetun GFP-liuoksen laimennosten absorbanssitulokset laajan spektrin mittauksessa (NanoDrop, UV/Vis)	71

Kuvio 21 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, vasen ja oikea kuva: pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, vasen kuva: pitoisuus ~100 µg/ml ja oikea kuva: pitoisuus ~200 µg/ml) kromatogrammitulokset	73
Kuvio 22 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, vasen ja oikea kuva: pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, vasen kuva: pitoisuus ~300 µg/ml ja oikea kuva ~400 µg/ml) kromatogrammitulokset	74
Kuvio 23 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, vasen ja oikea kuva: pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, vasen kuva: pitoisuus ~500 µg/ml ja oikea kuva ~1000 µg/ml) kromatogrammitulokset	74

TAULUKOT

Taulukko 1 Artikkelin (Hentz & Mosley 2016) HPLC-menetelmän ajo-olosuhteet GFP:n ajoon	52
Taulukko 2 HPLC:n ajo-olosuhteet	52
Taulukko 3 Keskiarvoihin perustuvat silikan häiriöttestaustulokset albumiinistandardin (BSA) Micro BCA -analyysissä	56
Taulukko 4 Keskiarvoihin perustuvat silikan häiriöttestaustulokset GFP:n fluoresenssimittauksessa	57
Taulukko 5 Ruiskun 1 (Falconin A) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset	59
Taulukko 6 Ruiskun 1 (Falconin B) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset	59
Taulukko 7 Ruiskun 2 (Falconin C) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset	59
Taulukko 8 Ruiskun 2 (Falconin D) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset	60
Taulukko 9 Ruiskujen 1 ja 2 silikahydrogeelin keskiarvoihin perustuvat liukenemisnopeudet ja hydrogeelin kokonaisliukenemisajat	61
Taulukko 10 Silikan liukenemisnopeuden keskiarvoon (ruisku 2) perustuvan GFP-proteiinin teoreettinen vapautuminen	64
Taulukko 11 Silikan liukenemisnopeuden keskiarvoon perustuvan vapautuneen GFP-proteiinin pitoisuus teoriassa	64

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Absorbanssi	Spektrofotometrisesti mitatun materiaalin absorboiman valon määrä (A)
Absorptio	Aineen tai energian sitoutuminen, jossa elektroni tai elektronit voivat virittäytyä korkeammille energiatasoille (Edu.fi)
ACN	Asetonitrili (CH_3CN)
API	<i>Active pharmaceutical ingredient</i> , aktiivinen lääkeaine
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i> , bikinkoniinihappomääritys
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , naudan seerumin albumiini
CBB	<i>Coomassie brilliant blue</i> , värireagenssi
Diffuusio	Ilmiö, jossa molekyylit pyrkivät siirtymään väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan tasoittaen esiintyneet pitoisuuserot (Solunetti 2006)
Eluentti	HPLC:n ajoliuos
Emissio	Energian lähettäminen eli emittoiminen sähkömagneettisena säteilynä atomin viritystilan purkautuessa (Edu.fi)
Fluoresenssi	Ilmiö, jossa aineen molekyylit ensin absorboivat valoa tietyllä aallonpituudella ja lyhyen aikavälin jälkeen lähettävät näkyvää valoa (Tieteen termipankki 2017)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , vihreää fluoresoiva proteiini
HCl	Suolahappo
Heterogeeninen seos	Vähintään kahden eri faasissa olevien aineiden seos.
Homogeeninen seos	Vähintään kahden aineen muodostama yhdistelmä, jossa aineiden komponenttien välillä ei ole erotettavissa selkeää faasirajaa.
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografia
<i>In sink</i>	Dissoluutiotesteissä ylläpidettävä olosuhde, jossa aine liukee nopeuden hidastumatta
<i>In vitro</i>	”Lasissa” eli elävän organismin ulkopuolella tehty tutkimus
<i>In vivo</i>	Elävässä organismissa tehty tutkimus
Kvalitatiivinen	Laadullinen

Kvantitatiivinen	Määrällinen
Kromatografia	Yhdisteiden erottamiseen, puhdistamiseen sekä tunnistamiseen ja kvantitatiiviseen analysointiin käytettävä erotusmenetelmä
Kromatogrammi	Kromatografinen kuvaaja, joka näyttää graafisesti tutkittavan yhdisteen komponenttien aiheuttaman detektorin vasteen eluutioajan funktiona (Anttila 2010)
Milli-Q-vesi	Ultrapuhdas vesi, I-luokka (H ₂ O)
NaCl	Natriumkloridi
NaOH	Natriumhydroksidi
R-arvo	Veden ja TEOS:n ainemäärien suhde
RCF	<i>Relative centrifugal force</i> , G-voima
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
Retentio	Kromatografiassa yhdisteen pidäytyminen stationäärifaasiin
RP	<i>Reverse phase</i> , käänteisfaasi
RPM	<i>Revolutions per minute</i> , kierrosta minuutissa
RT	<i>Room temperature</i> , huoneenlämpö (n. 20 – 25 °C)
Pii	Maakuoren toiseksi yleisin alkuaine (Si)
Polymeeri	Vähintään 50 monomeereistä (perusyksiköistä) koostuva yleensä orgaaninen molekyyliyhdiste
Poolisuus	Elektronien varausjakauman epätasaisuus molekyyllissä
Silika	Piidioksidi (SiO ₂)
TFA	Trifluoretikkahappo (C ₂ HF ₃ O ₂)
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
TRIS	Tris(hydroksyylimetyyli)aminometaani (C ₄ H ₁₁ NO ₃)
UV	Ultravioletti
Vis	<i>Visible</i> , näkyvä valo

1 JOHDANTO

Biofarmaseuttiset lääkevalmisteet ovat yleistyneet ja vakiinnuttaneet asemansa perinteisten pienmolekyylisten lääkevalmisteiden rinnalla. Biofarmaseuttiset lääkevalmisteet ovat bioteknologian avulla tuotettuja biologisia lääkeaineita. Ne ovat yleensä proteiineja, jotka muistuttavat rakenteellisesti ihmisen elimistön luonnollisia komponentteja. Biofarmaseuttisten proteiinien käytöllä on saatu joissakin tapauksissa parempia tuloksia sairauksien parantamisessa oireiden hoitamisen lisäksi perinteisiin lääkevalmisteisiin verrattuna.

Synteettiset ja bioyhteensopivat biomateriaalit, erityisesti polymeeripohjaiset kantajamateriaalit, ovat tärkeässä ja kasvavassa asemassa biofarmaseuttisten proteiinien ja muiden lääkeaineiden kontrolloidussa annostelussa. Lääkeaineen vaikutus on yleensä riippuvainen sen pitoisuudesta kohdekudoksessa tai veressä, jolloin vaikuttavan aineen konsentraatiota täytyy ylläpitää toistuvilla lääkeannoksilla. Liian alhaiset pitoisuudet eivät riitä terapeuttiseen vaikutukseen ja liian suuret saattavat olla haitallisia elimistössä. Perinteisessä lääkeannostelussa pitoisuus vaihtelee aluksi korkeasta vähentyen nopeasti matalaan tasoon. Kantajamateriaalista, esim. silikahydrogeelistä voidaan kehittää annostelijoita, jotka vapauttavat lääkeaineen kontrolloidusti ja tasaisesti tunnetulla nopeudella ennalta määritetyn ajanjakson ajan. Tällä tavalla parannetaan hoidon turvallisuutta ja luotettavuutta ja samalla vähennetään lääkehävikkiä sekä sivuvaikutuksia.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin biofarmaseuttisille lääkeaineille mallina toimivan GFP-proteiinin (eng. *Green fluorescent protein*) kontrolloitua vapautumista injektoidavasta silikahydrogeelistä *in sink*-olosuhteissa liutus- eli dissoluutiotesteissä. GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden, fysiologisia olosuhteita simuloivassa puskurissa, määrittää silikahydrogeelin liukenemisnopeus. Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää luotettavin kvantitatiivinen eli määrällinen analyysimenetelmä silikahydrogeelistä vapautuneen GFP-proteiinin mittaukseen. Työssä vertailtiin kolmea eri menetelmää (Bradford, Micro BCA ja fluorometria), sekä kehitettiin toimivaa ja luotettavaa käänteisfaasineskromatografimenetelmää (RP-HPLC) GFP:n määrittämiseen. Lisäksi pohdittiin HPLC:n käyttöönoton mahdollisuutta dissoluutionäytteiden kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen eli laadulliseen analysointiin. Aiemmissä dissoluutiotesteihin liittyvissä tutkimuksissa on käytetty analyysimenetelminä vain Bradfordia ja fluorometriaa.

Opinnäytetyö suoritettiin Turun ammattikorkeakoulussa, osana Biomateriaalit ja diagnostiikka -tutkimusryhmää, yhteistyössä Åbo Akademin teknisen polymeerikemian laboratorion kanssa. Tutkimusryhmän päätavoitteena on kehittää erilaisia biomateriaaleja sekä tuottaa ja stabiloida biologisia aineita rokotteisiin, diagnostiikkaan ja terapeuttisiin tarkoituksiin.

2 BIOMATERIAALIT JA LÄÄKEANNOSTELU

Biomateriaaleilla tarkoitetaan synteettisiä tai luontoperäisiä eli biologista alkuperää olevia materiaaleja, joista valmistettuja tuotteita käytetään lääketieteellisissä, terapeuttisissa, diagnostisissa ja muissa biotekniikan sovellutuksissa. Käytettävät materiaalit eivät saa häiritä tai haitata elävän organismin toimintaa, ja niiden on oltava bioyhteensopivia, sillä ne ovat kontaktissa kudoksen, veren tai kudoksen kanssa. Biomateriaaleista valmistettujen tuotteiden, mm. implanttien tai proteesien, tarkoituksena on vahvistaa, korjata tai korvata kudosta, elimiä tai kehon toimintaa, joka on menetetty jonkin sairauden, trauman tai tapaturman takia. Lisäksi biomateriaaleja voidaan käyttää esimerkiksi solujen, lääkeaineiden tai muiden biologisesti aktiivisten aineiden annostelussa. (Bandyopadhyay 2013) (Törmälä et al. 2003)

Biomateriaalit jaetaan kemiallisen koostumuksensa perusteella synteettisiin ja biologista alkuperää oleviin materiaaleihin. Synteettiset materiaalit ovat yleensä metalleja, keraameja, polymeerejä tai komposiitteja eli yhdistelmä-materiaaleja. Luontoperäisinä materiaaleina käytetään usein ihmisestä tai eläimestä peräisin olevia luuta, rustoa, sidekudosta sekä proteiineja ja polysakkarideja tai niistä valmistettuja materiaaleja. (Törmälä et al. 2003) (Valvira 2015)

2.1 Biomateriaalit lääkeannostelussa

Synteettiset biomateriaalit ovat tärkeässä ja kasvavassa asemassa aktiivisaineiden (API, *active pharmaceutical ingredient*) kontrolloidussa annostelussa, jossa hyödynnetään yleisesti polymeeripohjaisia kantajamateriaaleja (Bandyopadhyay 2013) (Törmälä et al. 2003). Useimmissa jo käytössä tai kehitteillä olevissa annostelumenetelmissä erilaiset biomolekyylit ja lääkeaineet voidaan kapseloida tai yhdistää polymeerisen kantajamateriaalin nanorakenteisiin, josta aineet vapautuvat kontrolloidulla tavalla elimistössä. Kapselointi kantajamateriaaliin voi toimia lisäksi suojakerroksena aktiivisille lääkeaineille (Lownman 2004).

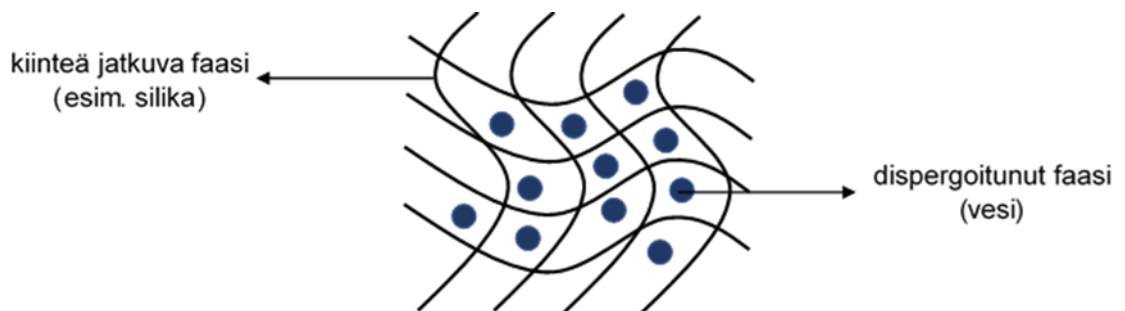
Lääkeannostelussa käytettäville polymeereille voidaan asettaa seuraavat vaatimukset: Polymeerin tulee olla

- kudosityhteensopiva

- veren kanssa yhteensopiva
- ei-toksinen
- ei-karsinogeeninen
- steriloitava
- kemiallisesti inertti (eli reaktiokyvytön elimistön muiden aineiden kanssa)
- stabiili tai hallitusti biohajoava
- fysikaalisilta ja mekaanisilta ominaisuuksiltaan riittävä
- tiheydeltään ja painoltaan sopiva
- hinnaltaan massatuotantoon soveltuva (Törmälä et al. 2003).

Lääkeannostelussa yksi tärkeimmästä käytettävästä annostelum muodosta (eng. *dosage form*) on hydrogeelit (Lownman 2004). Hydrogeelillä tarkoitetaan kahden faasin homogeenista eli tasakoosteista seosta, jossa ympäröivä faasi, eli dispersioväliaine (ts. jatkuva faasi), on kiinteä ja dispergoitu faasi on neste. Hydro-sana viittaa veteen, joka on geelissä dispergoituneena faasina. (Jokinen et al. 2013)

Hydrogeeli koostuu polymeerisidoksista, jotka ovat rakentuneet kolmiulotteisiksi verkostoiksi veden kanssa (katso kuvio 1). Hydrofiilisen (vesihakuisen) rakenteensa vuoksi geeli voi sisältää jopa 95 % vettä omaan painoonsa verrattuna menettämättä stabiilia rakennettaan. (Törmälä et al. 2003)



Kuvio 1 Hydrogeelin verkostomainen rakenne (muokattu: Sundström 2016)

Hydrogeeleillä on monia ominaisuuksia, jotka tekevät niistä bioyhteensopivia materiaaleja. Tärkeimpiä näistä ovat geelin korkea vesipitoisuus, materiaalin hajoaminen ja paisuminen sekä sen mekaaniset ominaisuudet. (Hawkins 2012) Koska hydrogeeli koostuu suurimmaksi osaksi vedestä, materiaali muistuttaa läheisesti luonnollisen kudoksen pehmeää rakennetta. Lisäksi erityisesti orgaanisista polymeereistä valmistettujen geelien

kumimainen ja pehmeä rakenne minimoi mekaanisen ja kitkattoman ärsytyksen ihmiskehossa, aiheuttamatta kipua tai vaurioita limakalvoille tai verisuonten sisäpuolelle. Korkean vesipitoisuuden vuoksi hydrogeelin pintaa voidaan kutsua superhydrofiiliseksi (veden liukenevaksi) diffuusiopinnaksi, jonka tiedetään olevan biologisesti yhteensopiva ihmiskehon kudosten ja veren kanssa. Lisäksi hydrogeelien on todettu simuloivan luonnon biologisten solujen ja kudosten hydrodynaamisia (nestevirtauksisia) ominaisuuksia. (Park et al. 2011)

Luonnonpolymeereistä koostuvat hydrogeelit hajoavat tavallisesti entsyymaattisesti, jolloin hydrogeelin rakenne pilkkoutuu entsyymien avulla halutussa ympäristössä. Erityisesti lääkeannostelussa käytetyt synteettiset hydrogeelit (esim. silikahydrogeelit) on kehitetty hajoamaan *in vivo* hydrolyysin vaikutuksesta omiksi lähtöaineikseen, mikä tekee tästä materiaalista biohajoavan. (Hawkins 2012) Tilanteissa, joissa kapseloitu lääkeaine vapautuu hydrogeelin hajoamisen kontrolloimana, on tärkeää tuntea geelin hajoamisnopeus, sillä se määrittää ja säätelee lääkeaineen vapautumisnopeuden elimistössä (Rich & Ahola 2002). Lisäksi hajonnut hydrogeeli poistuu kehosta luonnollisten elintoimintojen kautta häiritsemättä kehon muita toimintoja (Törmälä 2003).

Mekaanisiin ominaisuuksiin liittyen, varsinkin orgaanista polymeeriä sisältävälle hydrogeelille on ominaista lisäksi paisuminen, joka vaikuttaa sen koostumukseen ja rakenteen polymeeriverkostojen tiheyteen ja huokoisuuteen. Paisumisella tarkoitetaan hydrogeelin polymeeriverkkojen venyvyyttä, esimerkiksi veden vaikutuksesta. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää lääkeaineen tai solun kapseloinnissa materiaaliin. (Park et al. 2011) (Neradko 2014) (Lownman 2004)

2.1.1 Biohajoava SiO₂ -hydrogeeli

Silikahydrogeeli (SiO₂, piidioksidi) on sooli-geelitekniikalla valmistettu epäorgaaninen, biohajoava ja -yhteensopiva sekä myrkytön silikapohjainen materiaali. Prosessissa koloidaalinen sooli muuttuu geeliksi, jonka koostumus on yleensä valmistusprosessista riippuen 30 – 99 % vettä. Hydrogeelissä jatkuvana faasina toimii silika ja dispergoituneena faasina veden ja etanolin (EtOH) seos, jossa etanolipitoisuus vaihtelee geelin valmistusreseptistä riippuen. (Jokinen et al. 2013) Veden lisäksi silikageelin nanoluokan huokoinen rakenne sisältää vaihtelevan määrän hydroksyyliiryhmiä (-OH), joiden määrään voidaan vaikuttaa valmistusprosessin parametreja vaihtelemalla. Nämä OH-ryhmät vaikuttavat silikamateriaalin biohajoavuuteen, sillä mitä enemmän hydrogeeli sisältää kyseisiä

ryhmiä, sitä nopeampaa hajoaminen on. Materiaalin tunnetun hajoavuusnopeuden säätämisen jälkeen silikahydrogeeliä voidaan käyttää esim. biologisesti aktiivisten lääkeaineiden hallitussa annostelussa kapselointimateriaalina. Silikan muotoa voidaan muokata laajasti halutun laiseksi, ja se hajoaa kehon nesteisiin hydrolysoitumalla ja liukenemalla kudoksen vesifaasiin ja sitä simuloiviin vesipohjaisiin liuoksiin (37 °C ja pH 7,4). Silikahydrogeeliin kapseloitu lääkeaine vapautuu pääasiallisesti eroosiomekanismin välityksellä ja mahdollisesti osittain diffuusiolla. (Jokinen et al. 2013) (DelSiTech Oy) Kontrolloidun lääkeannostelun vapautumismekanismeja on käsitelty myöhemmin lisää luvussa 2.3. Sooli-geelitekniikalla valmistetun amorfisen silikan liukoisuus kehon nesteitä jäljittelyyn liuoksiin on n. 130 – 150 µg/ml (Jokinen et al. 2013). Silikan sooli-geelivalmistusprosessi on esitelty tarkemmin luvussa 4.

Aktiivisia ja biologisia lääkeaineita kapseloitaessa tulee huomioida silikahydrogeelin muodostumisprosessissa tapahtuvat jatkuvat faasien kondensaatioreaktiot ja huokosrakenteen muutokset. Nämä aiheuttavat geelissä kutistumista, millä saattaa olla vaikutusta kapseloidun aineen aktiivisuuteen. Kyseiset muutostapahtumat tulee lisäksi huomioida geelin säilytyksessä, sillä reaktiot voivat jatkua sen aikanakin (geelin ikääntyminen). Kutistumisesta aiheutuva biologisten lääkeaineiden deaktivoitumista voidaan vähentää käyttämällä valmistusprosessissa erillisiä suoja-aineita, kuten esim. sokereita. (Jokinen et al. 2013)

2.2 Kontrolloitu lääkeannostelu

Aktiivinen lääkeaine (API) kuljetetaan ihmiskehoon eri menetelmien ja annostelumuotojen avulla. API:n annostelumenetelminä käytetään tavallisesti kielen alle laitettavia, suun, silmän, nenän tai korvan kautta annosteltavia tai ihon alle laitettavia menetelmiä. Lisäksi lääkeannostelumuoto voi olla kaasumainen, jauhemainen, nestemäinen, kiinteä, puolikiinteä geelimäinen tai emulsio. Kyseisillä eri menetelmillä ja annostelumuodoilla voidaan vaikuttaa lääkeaineen vapautumiseen ja lääkkeen aiheuttamaan vasteeseen elimistössä. Käytettävä menetelmä ja annostelumuoto valitaan lääkeaineen asettamien vaatimusten ja ominaisuuksien mukaisesti. Erityisesti on huomioitava terapeuttiset ja fysiokemialliset ominaisuudet. (Popescu 2011) (Rich & Ahola 2002)

Lääkeaineen vaikutus on yleensä riippuvainen sen pitoisuudesta kohdekudoksessa tai veressä, minkä vuoksi tarvittavan lääkepitoisuuden ylläpitämiseksi annostelu täytyy suorittaa toistuvasti. Perinteisessä lääkeannostelussa pitoisuus vaihtelee aluksi korkeasta

vähentyen nopeasti matalaan tasoon. Liian alhaiset lääkeainekonsentraatiot eivät riitä aikaansaamaan terapeutista vaikutusta, ja liian suuret konsentraatiot lisäävät lääkeaineen mahdollisia haittavaikutuksia elimistössä. (Rich & Ahola 2002)

Kontrolloidussa lääkeannostelussa lääkeaineen pitoisuus lääkittävässä kohteessa pyritään pitämään tasaisena, ilman konsentraation minimirajan alittamista ja toksisen ylärajan saavuttamista. Tällä parannetaan muun muassa hoidon turvallisuutta ja luotettavuutta, sekä tehostetaan lääkeaineen vaikutusta pidentämällä sen terapeutista vastetta kohdistetussa kudoksessa, elimessä tai sen osassa samalla vähentäen lääkehävikkiä. Lääkitys voidaan kohdistaa elimistössä esimerkiksi kiinnittämällä tai kapseloimalla lääkeaine biohajoaviin tai kemiallisesti stabiileihin polymeeripartikkeleihin ja implantoimalla tai injektoimalla se haluttuun kohteeseen. Lääkeaineen vapautuminen polymeeristä tapahtuu erilaisten mekanismien kautta tunnetulla nopeudella ennalta määritetyn ajanjakson ajan. (Rich & Ahola 2002) Lääkeaineen annostelumekanismit on esitelty myöhemmin luvussa 2.3 Lääkeaineen kontrolloitu vapautuminen polymeeripohjaisesta biomateriaalista.

2.2.1 Neulainjektointi

Injektointi on yksi kontrolloidun lääkeaineen annostelumenetelmistä. Neulainjektoinnilla tarkoitetaan lääkeaineen ruiskuttamista lääkeneulan avulla kohdealueeseen tai esimerkiksi verenkiertoon. Kyseisen annostelumenetelmän avulla lääkeaine voidaan myös saada kohdistettua suoraan lääkittävään alueeseen, jossa terapeutiset vaikutukset käynnistyvät heti injektoinnin jälkeen. Tyypillisimmät injektio menetelmät ovat ihonsisäiset ja -alaiset, lihaksensisäiset sekä laskimoon annettavat injektiot. (Kim et al. 2017) (Jin et al. 2015) Injektio menetelmän valinta perustuu muun muassa annettavan lääkeaineen määrään, vapautumisnopeuteen kantajamateriaalista, viskositeettiin, kudosaärsyttävyyteen ja lääkeainetyyppiin, sekä hoidettavan potilaan henkilökohtaisiin ominaisuuksiin. (Tauriainen & Wetterstrand 2012).

Opinnäytetyössä silikahydrogeeliin kapseloidun mallilääkeaineen vapautumistutkimuksessa on käytetty annostelumenetelmänä ohutinjektioneulaa (25G x 1), joka soveltuu ihonalaiseen ja lihaksensisäiseen injektioon.

2.3 Lääkeaineen kontrolloitu vapautuminen polymeeripohjaisesta biomateriaalista

Lääkeaineen kontrolloitu vapautuminen tapahtuu tavallisesti synteettisesti valmistetun polymeerikalvon läpi varastokapselista (kapselityyppinen terapeuttinen järjestelmä), tai vapautuva lääkeaine on joko liuenneena tai dispergoituneena polymeeriin (matriisityyppinen terapeuttinen järjestelmä). Yleisin vapautumismekanismi terapeuttisissa järjestelmissä on diffuusio, jossa kapseloitu pienmolekyylinen lääkeaine kulkeutuu polymeerikalvon läpi konsentraatioeron suuntaisesti suuremmasta pitoisuudesta pienempään. (Rich & Ahola 2002) Kyseinen membraaniannostelu mahdollistaa tasaisen ja pitkäaikaisen lääkeainepitoisuuden elimistössä, ilman äkkinäistä vapautumista (eng. *burst-effect*). Kun lääkeaine saostetaan polymeerikantajamateriaaliin, saavutetaan niin sanotun ensimmäisen kertaluvun mukainen, vähitellen hidastuva vapautuminen. Tasaisessa (nollannen kertaluvun) annostelutekniikassa lääkeaine on yhdistetty pinnaltaan hitaasti liukenevaan tai hajoavaan homogeeniseen (tasakoosteiseen) polymeeriin, joka biohajoaa tavallisesti eroosiomekanismin välityksellä kehon nesteisiin. Lisäksi lääke voidaan sitoa polymeeriketjuun, josta lääkeaine vapautuu kiinnittävän sidoksen auetessa esimerkiksi kohdealueen ympäristön pH:n tai lämpötilan muutoksen mukaan. (Rich & Ahola 2002) (Seppälä et al. 2004)

Lääkeaineelle haluttu annostelunopeus ja lääkeainepitoisuus elimistössä voidaan saavuttaa sopivalla polymeeri-lääkeaine-valmistetyyppi –yhdistelmällä, jossa on huomioitava mm.

polymeerin osalta vaikuttavat tekijät:

- koostumus
- kiteisyys
- huokoisuus
- moolimassa
- hajoamisnopeus
- hajoamismekanismi

lääkeaineen osalta vaikuttavat tekijät:

- lääkeainetyyppi
- molekyylin koko (pienmolekyylinen vai proteiini)
- lääkkeen määrä valmisteessa

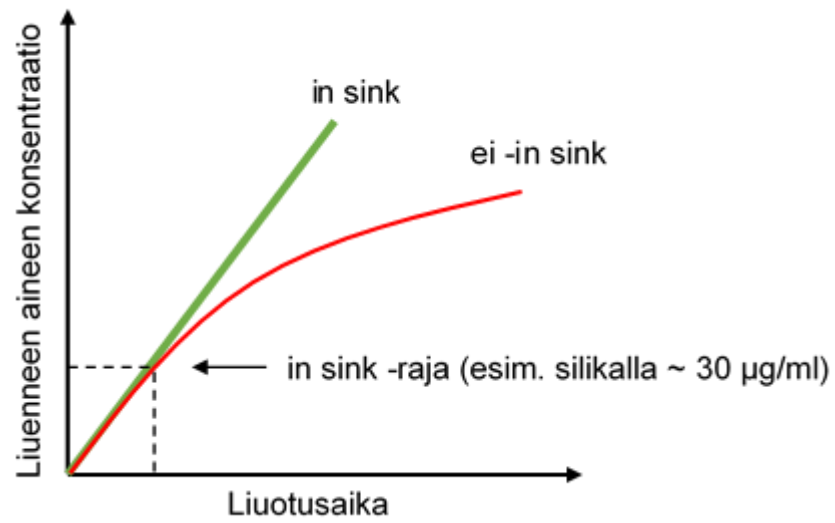
- lääkkeen liukoisuus polymeeriin

valmistetyyppi ominaisuuksineen:

- valmistetyyppi (kapseli- tai matriisityyppi)
- geometria ja dimensiot (Seppälä et al. 2004).

2.3.1 *In sink* -olosuhteet

Opinnäytetyössä tutkitaan mallilääkeaineen vapautumista dissoluutio- eli liuotustestillä polymeeripohjaisesta biomateriaalista ihmiskehoa simuloivassa puskurissa. Kyseisessä testissä biomateriaalin liukenemisnopeus (eng. *dissolution rate* eli aineen liunut määrä ajan funktiona, m-%) määrittää mallilääkeaineen vapautumisnopeuden ajan funktiona. Dissoluutiotestissä ylläpidetään niin sanottuja *in sink* -olosuhteita, jossa liukenevan aineen konsentraatio pysyy liuottavassa aineessa koko ajan alle 15 – 20 % liukenevan aineen liukoisuudesta (eng. *solubility* eli aineen maksimikonsentraatio määritellyissä olosuhteissa). Mikäli konsentraatio ylittää *in sink* -tason rajan, tutkittavan aineen liukenemisnopeus hidastuu asteittain konsentraation lähestyessä liukenevan aineen saturaatio- eli kylläisyysrajaa. Kuvio 2 havainnollistaa *in sink* - ja ei -*in sink* -olosuhteissa liukenevaa ainetta, jossa y-akseli kuvastaa liukenevan aineen konsentraation kasvua kumulatiivisena ja x-akseli liuotusaikaa. Liukenevan aineen konsentraatiota ja liukenemisnopeutta voidaan hallita dissoluutiotestin aikana vaihtamalla liuottavaa nestettä. Kuvion 2 vihreä käyrä saadaan, kun neste vaihdetaan viimeistään liukenevan aineen konsentraation saavuttaessa aineelle ominaisen *in sink* -rajan. Tällöin biomateriaali liukenee 100-prosenttisesti. Mikäli nestettä ei vaihdeta, 100-prosenttista liukenemistä ei saavuteta lainkaan tai se saavutetaan hitaammin kuin *in sink* -olosuhteissa (katso kuvion 2 punainen käyrä, ei-kumulatiivisena). Jos aineita liuotettaessa ei ylläpidetä *in sink* -olosuhteita, liukenemisnopeuden tulokset siis vääristyvät merkittävästi (Vartija 2017).



Kuvio 2 Aineen liukeneminen in sink- ja ei-in sink -olosuhteissa (muokattu: Vartija 2017)

Opinnäytetyössä käytetyn silikahydrogeelin *in sink*-raja kehon nesteitä simuloivassa vesipohjaisessa liuoksessa on $\sim 30 \mu\text{g/ml}$. *In sink*-olosuhteita ylläpidetään dissoluutiotes-
tissä liuottavan aineen eli käytettävän puskurin vaihdolla. (Jokinen et al. 2013)

3 BIOFARMASEUTTISET PROTEIINIT JA GFP

Biofarmaseuttisilla aineilla tarkoitetaan bioteknologian avulla tuotettuja biologisia lääkevalmisteita, joita käytetään terapeutiseen hoitoon ja *in vivo* -diagnostiikkaan. Suurin osa biofarmaseuttisista aineista on proteiineja ja nukleiinihappoja (DNA ja RNA). Terapeuttiin proteiineihin kuuluu mm. kasvu- ja veritekijät (verikomponentit), sytokiinit (solujen välisen viestinnän välittäjäaineet), hormonit, terapeutiset entsyymit, fuusioproteiinit (yhdistelmäproteiinit) sekä monoklonaliset vasta-aineet, jotka tuotetaan yleensä rekombinaatio- eli yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla. (Walsh & Murphy 1999) (Schmidt 2013) Biologisten lääkevalmisteiden, erityisesti biofarmaseuttisten proteiinien, käyttö ja kehitys on tärkeää, sillä nämä myrkyttömiksi, turvallisiksi ja spesifisiksi luokitellut valmisteet ovat yleistyneet ja vakiinnuttaneet viime vuosikymmenen aikana asemansa pienmolekyylisten lääkevalmisteiden rinnalla (Veromaa 2003) (Schmidt 2013).

Perinteisiin pienmolekyylisiin lääkevalmisteisiin verrattuna biofarmaseuttiset proteiinit muistuttavat rakenteellisesti ihmisen elimistön luonnollisia komponentteja, minkä vuoksi kyseisillä proteiineilla on paremmat mahdollisuudet parantaa sairauksia kuin pienmolekyylisillä lääkkeillä, eikä pelkästään hoitaa oireita. Lisäksi bioteknisesti tuotettujen proteiinien käytössä on huomattu olevan vähemmän haittavaikutuksia spesifisyytensä vuoksi: proteiineilla voidaan hoitaa tunnettua ongelmaa elimistön tietyssä järjestelmässä tavantomaisten pienmolekyylilääkkeiden vaikuttaessa useisiin eri järjestelmäkokonaisuuksiin. Biofarmaseuttisten aineiden käyttö tehostaa myös yksittäisten sairauksien hoitoja, sillä niissä hyödynnetään solufuusio- ja DNA-rekombinaatio-tekniikoiden avulla kehitettyjä uusia hoitomuotoja. (Thermal Product Solutions 2018)

Biofarmaseuttisten proteiinien erilaiset tehtävät terapeutteisessa tarkoituksessa on esitelty alla. Biologinen lääkeaineproteiini voi esim.

- korvata epänormaalin tai puutteellisesti toimivan proteiinin
- tehostaa jo olemassa olevan proteiinin toimintaa
- toimia uudessa toiminnossa tai tarkoituksessa
- vaikuttaa ja muuttaa molekyylin tai organismin toimintaan
- kuljettaa toisia proteiineja tai tuotteita (Vartija 2017).

Vaikka biofarmaseuttisten proteiinien käyttö lääkevalmisteina on jatkuvassa kasvussa, niiden tuottoon ja käyttöön liittyy vielä paljon haasteita. Ongelmina on mm. proteiinien

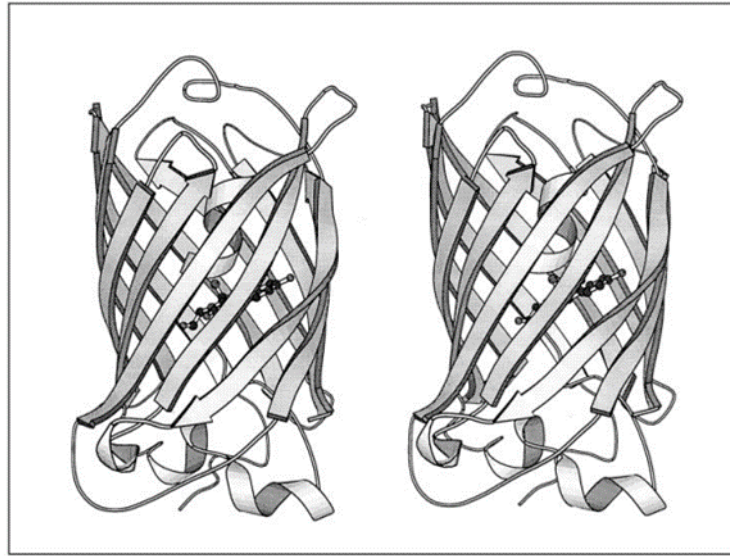
taipumus muodostaa immuunivasteita, toiminnan ja aktiivisuuden riippuvuus rakenteellisista ominaisuuksista (kolmiulotteinen rakenne) ja lisäksi ne hajoavat fysikaalisesti tai kemiallisesti pienmolekyylisiä lääkkeitä helpommin. Proteiinien monimutkaiset valmistusprosessit tuovat omat haasteensa näiden terapeuttisten aineiden käyttöön. (Mahler & Jiskoot 2012) Haasteiden ratkaisemiseksi biofarmaseuttisten proteiinien tutkimukseen ja kehittämiseen tarvitaan vielä paljon uutta tietoa. Näissä tutkimuksissa voidaan hyödyntää mallimolekyylejä, kuten esimerkiksi vihreää fluoresoivaa proteiinia (GFP), joka esitellään seuraavaksi.

3.1 Vihreä fluoresoiva proteiini (GFP)

Alun perin meduusasta eristetty *Green fluorescent protein* (GFP) on suosittu erityisesti solu- ja kasvi biologian sekä lääkekehityksen tutkimuksissa. Vihreää väriä fluoresoivan ominaisuutensa vuoksi proteiinia käytetään yleisesti merkkiaineena ja fuusioproteiinin osana, sillä liittämällä GFP toiseen proteiiniin, soluun tai geeniin, se voidaan paikantaa ilman leimausmenetelmiä. Merkkiaineominaisuutta voidaan hyödyntää mm. geenien toiminnan ja toimintapaikan tutkimisessa biofarmaseuttisten proteiinien tuotannossa. Lisäksi GFP:tä käytetään soluun siirrettynä solun toiminnan muutoksien tutkimuksissa. Lääkeannostelun kehityksessä proteiinia voidaan hyödyntää esimerkiksi mallilääkeaineena ilmentämään terapeuttisen valmisteen vapautumista elimistössä. (Vartija 2017) (Tsien 1998) GFP:tä on nykyään geenimuokattu DNA-rekombinaatio-tekniikan avulla erilaisiksi variaatioiksi eli muunnelmiksi sen käyttökohteen ja -tarpeen mukaisesti (Hentz & Mosley 2016).

GFP-proteiini absorboi (vastaanottaa valoa) ja emittoi (lähettää valoa) eri aallonpituuksilla variaatiostaan riippuen (fluoresenssi-ilmiöön liittyvät absorptio ja emissio on esitelty tarkemmin luvussa 5.4 Fluoresenssispektroskopia ja aikaerotteinen fluorometria). Villityyppinen (eng. *wild type GFP*) eli geneettisesti muokkaamaton GFP-proteiini absorboi 393 nm:n ja emittoi vihreää väriä 509 nm:n aallonpituudella. (Tsien 1998)

GFP on pienimolekyylinen, n. 27 000 g/mol:n kokoinen proteiini, joka on rakenteeltaan kolmiulotteinen ja sylinterimäinen (katso kuva 1). (Campbell & Choy 2001) Hydrofobisia osia sisältävän rakenteen suojassa sijaitsee molekyylin vihreää väriä aiheuttava osa, kromofori (Tsien 1998).



Kuva 1 GFP-proteiinin kolmiulotteinen sylinterimäinen rakenne (kuvan alkuperäislähde: Tsien 1998)

Fluoresoivan ominaisuutensa lisäksi GFP kestää tiiviin rakenteensa ansiosta enemmän proteiinien denaturointia aiheuttavia pH- ja lämpötila-arvoja. Lisäksi GFP-proteiini on stabiili 6 – 10 pH:n alueella, minkä vuoksi sitä voidaan käyttää pH-indikaattorina esimerkiksi solututkimuksissa. (Campbell & Choy 2001)

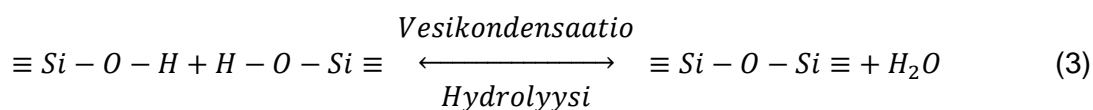
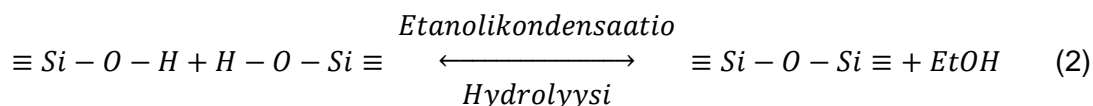
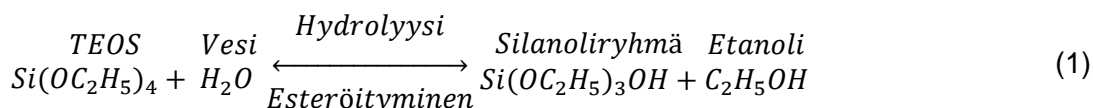
4 SOOLI-GEELIPROSESSOITU SiO₂

Opinnäytetyössä käytetty injektoitava silikahydrogeeli on valmistettu sooli-geelimenetelmällä, jossa lopputuote ja prosessi muistuttavat läheisesti luonnossa tapahtuvaa silikan muodostumista. Prosessin aikana tasakoosteinen sooli (kolloidaalinen suspensio) muuntuu kiinteäksi emulsioksi, geeliksi. Menetelmä on laajasti käytössä etenkin biokeeraamisten materiaalien, kuten amorfisen silikan (SiO₂), valmistuksessa. (Jokinen et al. 2013)

Amorfisen silikan sooli-geeliprosessissa muodostuu hydrolyysi- ja kondensaatioreaktioiden vaikutuksesta ensin kolloidaalinen suspensio, jossa jatkuvana faasina toimii nestemäinen vesi ja dispergoituneena faasina kiinteät silikapartikkelit. Soolin muodostumisen jälkeen kondensaatioreaktioiden jatkuttua ja silikananopartikkelien aggregoituessa suspensio muuntuu vähitellen geeliksi, jossa jatkuvana faasina toimii silikaverkosto ja dispergoituneena faasina nestemäinen vesi ja etanoli. (Jokinen et al. 2013)

Silikan lähtöaineina käytetään tavallisesti alkoksiedeja, alkyylialkoksiedeja, aminoalkoksiedeja tai epäorgaanisia silikaatteja, jotka reagoivat helposti veden kanssa. Opinnäytetyön lähtöaineena käytettiin piialkoksideihin kuuluvaa TEOS:a (tetraetyyliortosilikaatti), sillä sen sivutuotteena muodostuu yleensä haittava etanolia (EtOH). Mikäli sivutuotteen oletetaan aiheuttavan haittaa, sen määrää voidaan pienentää haihduttamalla prosessin eri vaiheissa (katso esimerkki luku 6.1.2) (Jokinen et al. 2013) (Jokinen et al. 2008)

Soolin valmistuksessa TEOS ja vesi reagoivat keskenään suolahapon (HCl) katalysoimana hydrolyysireaktiossa (katso reaktioyhtälö 1), jossa lähtöaineen etoksiryhmä (-OC₂H₅) korvautuu hydroksyyli ryhmällä (-OH). Reaktiossa sivutuotteena syntyy etanolia. Hydrolyysireaktiota seuraa kondensaatioreaktiot (katso reaktioyhtälöt 2 etanolikondensaatioreaktio ja 3 vesikondensaatioreaktio), jossa syntyneet silanoliryhmät muodostavat siloksaanisidoksia (Si – O – Si) ja samalla vapautuu etanolia tai vettä. TEOS:n ja veden kokonaisreaktiossa syntyy silikaa eli piidioksidia ja etanolia (katso reaktioyhtälö 4). (Brinker et al. 1990) (Jokinen et al. 2013)



Kondensaatioreaktioiden jälkeen silikapartikkelit aggregoituvat ja aggregaatit kasvavat ja liittyvät toisiinsa verkostoksi. Silikahydrogeeli muodostuu, kun verkosto on laajentunut kauttaaltaan veden ja etanolin seokseen. (Brinker et al. 1990) (Iler 1979) Kuten aikaisemmin jo luvussa 2.1.1 mainittiin, kondensoituminen jatkuu vielä geelin muodostumisenkin jälkeen muuttaen silikageelin ominaisuuksia (mm. huokoisuutta ja liukenemisnopeutta).

Geelin muodostuminen tapahtuu happamissa silikasooleissa itsenäisesti. Geelityminen voidaan lisäksi tehdä nopeuttamalla tai pakottamalla prosessia. Happamien soolien geelilytymistä voidaan nopeuttaa lisäämällä suolaa tai emästä (esim. NaOH). Soolin pH:n nostamista lähelle neutraaleja olosuhteita (pH 5 – 7) voidaan hyödyntää erityisesti kapseloidessa biologisesti aktiivisia lääkkeitä, jotka ovat usein herkkiä happamille ympäristöille. (Jokinen et al. 2013) (Brinker et al. 1990) Reaktioiden nopeuteen voidaan lisäksi vaikuttaa muuttamalla geelautuvan soolin olosuhteita esimerkiksi haihduttamalla, lisäämällä nesteitä tai muuttamalla lämpötilaa prosessin aikana (Jokinen et al. 2013).

Emäksisistä silikasooleista valmistettujen stabiilien soolien silikapartikkelien koko ja määrä voivat kasvaa vain tiettyyn pisteeseen asti, ja partikkelit eivät aggregoidu tai aggregoitumista tapahtuu vain vähän. Tämän vuoksi stabiilit soolit eivät muodostu itsenäisesti geeliksi, mutta ne voidaan pakottaa geelitymään lisäämällä esimerkiksi suolaa,

toista soolia, liuotinta ja/tai nestettä ja/tai säätämällä soolin pH:ta. Pakotetusti muuttuneen geelin rakenne eroaa kuitenkin selkeästi happamista sooleista valmistettujen geelien rakenteesta, sillä partikkelien koko on huomattavasti suurempi. (Jokinen et al. 2013)

5 ANALYYSIMENETELMÄT JA -LAITTEET

Opinnäytetyön käytännön osuudessa tutkittiin biofarmaseuttisen lääkeaineen mallimolekyylinä toimivan GFP-proteiinin vapautumista silikahydrogeelistä fysiologisia olosuhteita simuloivassa puskurissa. Liuennutta kantajamateriaalia eli silikaa ja vapautunutta GFP:tä analysoitiin konsentraatiomittauksilla. Pitoisuusmäärityksissä käytettiin kvantitatiivisia eli määrällisiä ja värireagenssiin perustuvia (kolorimetrisiä) spektrofotometriä analyysimenetelmiä. Vapautuneen GFP:n pitoisuus määritettiin myös fluoresenssimittauksella spektrofotometrisesti. GFP:n konsentraatiomittaukseen käytettäviä analyysimenetelmiä vertailtiin toisiinsa, ja tarkoituksena oli löytää luotettavin menetelmä proteiinin määrittämiseen.

Opinnäytetyössä kehitettiin lisäksi käänteisfaasinestekromatografia -menetelmää mallimolekyylin (GFP:n) kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen (laadulliseen) analyysiin, ja tulosten perusteella pohdittiin kyseisen menetelmän käyttöönoton mahdollisuutta GFP-proteiinin vapautumismittauksiin. Menetelmän kehitystä varten tutkittiin ensin GFP:n antamia signaaleja eri ultravioletti- ja näkyvän valon aallonpituuksilla NanoDrop -spektrofotometrillä.

Käytetyt analyysimenetelmät ja -laitteet on esitelty lyhyesti seuraavissa luvuissa (luvut 5.1 – 5.5).

5.1 UV/Vis -spektroskopia

UV/Vis -spektroskopia on yksinkertainen ja nopea kvantitatiivinen mittausmenetelmä, jolla mitataan pitoisuuksia sekä määritetään tunnetun tuotteen puhtautta. UV/Vis -spektrofotometrin toiminta perustuu aineen molekyylien kykyyn absorboida valoa eri aallonpituuksilla. Tutkittavan aineen molekyylien absorboidessa sille ominaista tietyn aallonpituuden säteilyä, elektronit virittyvät eli siirtyvät korkeammalle energiatasolle. Menetelmässä hyödynnetään sähkömagneettisen spektrin ultravioletin (UV, 190 – 360 nm) ja näkyvän valon (Vis, *visible*, 380 – 750 nm) aallonpituuksia. Spektrofotometri mittaa tutkittavaan aineeseen absorboituvaa säteilyn määrää ja ilmoittaa tuloksen näytteeseen tulevan ja sen läpi kulkeneen säteilyn voimakkuuden suhteena eli transmittanssina. Mikäli tutkittava aine ei itse absorboi, saadaan se vastaanottamaan säteilyä käsittelemällä sitä jonkin värireagenssin kanssa. Aineen pitoisuus saadaan selville spektrofotometrin

mittaustuloksen ja valmistetun referenssiaineen standardisuoran yhtälöstä. (Lampiselkä et al. 2016) (Mahler & Jiskoot 2012)

UV/Vis -spektrofotometrinen mittausta perustuu Lambert-Beerin lakiin, joka on esitelty kaavassa 1.

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

Kaava 1 Lambert-Beerin lain yhtälö

, jossa I_0 on näytteeseen tulevan ja I sen läpi kulkeneen valon intensiteetti, ε molaarinen absorptiokerroin ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c näytteessä olevan valoa absorboivan aineen konsentraatio, l valon kulkema matka (cm) ja A on mitattu absorbanssi (absorbanssi yksikkö Abs). (Mahler & Jiskoot 2012) (Sälliluoma 2014)

5.1.1 Reaktiivisen silikaatin määrittäminen spektrofotometrisesti (UV/Vis)

Silikaattiyhdisteen, esimerkiksi piihapon pitoisuus voidaan määrittää käyttämällä kolorimetristä UV/Vis -spektroskopia mittausta menetelmää. Menetelmä soveltuu molybdaattireaktiivisen silikaatin määrittämiseen näytteestä, joka sisältää pitoisuudeltaan 0,1 – 1,2 mg/l silikaattia. Mittaus perustuu piihapon ja molybdaatin väliseen reaktioon, jossa ensin syntyy happamissa olosuhteissa (pH 1,1 – 1,3) väriltään keltainen kompleksiyhdiste ($H_4[SiMo_{12}O_{40}]$), joka sitten pelkistetään sulfiitin ja 1-amino-2-hydrokso-4-naftaleenisulfonihapon avulla molybdeeninsiniseksi kompleksiksi. Syntynyt pelkistystuote absorboi voimakkaimmin aallonpituudella 815 nm, jossa spektrofotometrinen mittausta suoritetaan. Tutkittavan silikaatin pitoisuus lasketaan saadun absorbanssituloksen ja valmistetun referenssiaineen, piidioksidin tai piin (Si), standardisuoran yhtälön perusteella, katso kaava 2.

$$Abs = k \cdot SiO_2 (mg/l) + b$$

Kaava 2 Standardisuoran yhtälö silikaattiyhdisteen pitoisuuden laskemiseen

, jossa Abs on mitattu absorbanssi, k on standardisuoran kulmakerroin ja b kalibrointisuoran leikkauspiste. (ASTM International) (American Public Health Association 1999) (Turku AMK)

5.1.2 Shimadzu UV-1800 -spektrofotometri (UV/Vis)

Shimadzu UV-1800 on spektrofotometri (katso kuva 2), jota käytettiin opinnäytetyössä reaktiivisen silikaatin (liuenneen silikan) ja vapautuneen GFP:n konsentraatiomäärittämiseen (Micro BCA, esitely kappaleessa 5.3). Kyseinen spektrofotometri hyödyntää ultraviolettia ja näkyvän valon aallonpituuksia (190 – 1100 nm) ja sillä pystytään mittaamaan näytteestä jopa 1 – 8 aallonpituutta samanaikaisesti. Opinnäytetyön mittaukset suoritettiin kyvetteissä ja läpivirtauskyvetissä laitteiston biomittaustilaa (eng. *biomethod mode*) käyttäen, joka soveltuu erityisesti proteiinien ja DNA:n kvantitatiivisiin analyyseihin sekä perinteiseen UV-absorbanssimittaukseen. (Shimadzu)



Kuva 2 Shimadzu UV-1800 -spektrofotometri (kuvan alkuperäislähde: American laboratory trading 2018)

5.1.3 NanoDrop ND-1000 -spektrofotometri (UV/Vis)

Opinnäytetyössä käytetty NanoDrop® ND-1000 on spektrofotometri (katso kuva 3), joka mittaa tutkittavan näytteen tarkasti ja uusittavasti sähkömagneettisen spektrin aallonpituuksilla (220 – 750 nm). Laite hyödyntää patentoitua tekniikkaa, jossa näyte pidetään paikallaan pintajännityksen avulla. Tekniikan ansiosta mittaus suoritetaan ilman spektrofotometrille tavanomaisia kyvettejä, ja laitteen puhdistus tapahtuu vain muutamissa sekunneissa. Lisäksi NanoDropilla voidaan mitata erittäin konsentroituja näytteitä ilman laimennosta (n. 50 kertaa korkeampia konsentraatioita kuin kyvetispektrofotometrillä) pienessä näytetilavuudessa (1,0 µl). NanoDrop-spektrofotometri soveltuu erityisesti muun muassa Bradford- ja BCA-proteiinianalyyysiin, laajennetun spektrin mittaamiseen ja fluoresoivien proteiinien kvalifiointiin sekä yleiseen UV/Vis-spektrofotometrimittaukseen. (NanoDrop Technologies 2007)



Kuva 3 NanoDrop® ND-1000 -spektrofotometri (kuvan alkuperäislähde: The Genomics Core Facility)

5.1.4 Hidex Sense -spektrofotometri

Hidex Sense (katso kuva 4) on monikäyttöinen tietokoneeseen yhdistetty spektrofotometri, jossa näytteen mittaus suoritetaan kuoppalevylukijalla. Spektrofotometriä voidaan käyttää laajasti erilaisiin kvantitatiivisiin proteiinimäärytyksiin sekä entsyymien aktiivisuus- ja fotometriisiin analyyseihin. Hidex Sensen herkkyysalue on 220 – 1000 nm, jossa mittaukset suoritetaan toistettavasti, tarkasti ja nopeasti. Lisää tarkkuutta analyyseihin tuo laitteiston kuoppalevylukijan erilaiset lisäominaisuudet, joiden avulla voi säätää esimerkiksi mittaustilaa ja -valon tulokulmaa sekä kuoppalevyn ravisteluominaisuuksia. Lisäksi spektrofotometrillä voidaan mitata näytteestä samanaikaisesti jopa 10 eri aallonpituutta alle sekunnissa. (Hidex 2015)



Kuva 4 Hidex Sense -spektrofotometri (kuvan alkuperäislähde: Hidex 2015)

Opinnäytetyössä Hidex Sense -spektrofotometriä käytettiin GFP-proteiinin konsentraatiomäärityksissä (Bradford-proteiini- ja fluoresenssimääritys), joiden periaatteet esitellään myöhemmin tässä luvussa.

5.2 Bradford-proteiinimääritys

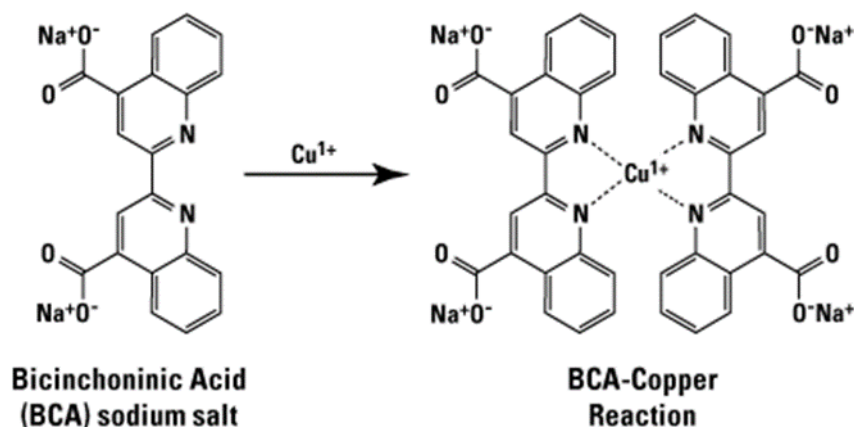
Bradford on spektrofotometrinen proteiinimääritysmenetelmä, joka perustuu *Coomassie brilliant blue* (CBB) -väriaineen ja proteiinien väliseen sitoutumiseen (Bradford 1976) (Thermo Scientific). Hapan *Coomassie brilliant blue* G-250 (CBBG) -reagenssi sitoutuu proteiinien emäksisiin ja aromaattisiin aminohappoihin aiheuttaen väriaineen absorptiomaksimin siirtymisen 465 nm:stä 595 nm:iin. Sitoutumiseen vaikuttaa lisäksi heikot Van der Waalsin voimat (dispersiovoimat molekyylien välillä) sekä hydrofobiset vuorovaikutukset. Spektrofotometrisessä mittauksessa mitataan absorption muutos 595 nm:ssä. Väriaineen sitoutuminen huoneenlämmössä tapahtuu vain kahdessa minuutissa, jolloin proteiinia sisältävän näytteen väri muuttuu punaruskeasta kirkkaan siniseksi. Väriaine pysyy näytteessä stabiilina tunnin ajan. (Bradford 1976) (Thermo Scientific 2013) (Thermo Scientific) (Thermo Scientific cat. no. 20278) Analyysi on kolorimetrinen, eli proteiinikonsentraation kasvaessa näytteen sininen väri tummenee (Redmile-Gordon et al. 2013). Menetelmässä tutkittavan näytteen proteiinipitoisuus määritetään standardikuvaajalta käyttämällä tunnetun proteiinin (referenssiproteiinin), kuten BSA:a (*Bovine serum albumin*) eli naudan seerumin albumiinia (Janson 2011).

Mittausmenetelmänä Bradford on yleisesti käytetty sen herkkyyden, nopeuden, yksinkertaisuuden ja edullisuuden vuoksi. Mikrokuoppalevymittakaavassa mittaus on lineaarinen laajalla pitoisuusalueella 100 – 1500 µg/ml, ja opinnäytetyössä käytetyssä mikromikrokuoppalevymittakaavassa lineaarinen mittausalue on 1 – 25 µg/ml. (Thermo Scientific) (Thermo Scientific cat. no. 20278)

5.3 Micro BCA -proteiinimääritys

BCA (*bicinchoninic acid*, bikinkoniinihappo) on kolorimetrinen kokonaisproteiinin määrittäminen menetelmä. Opinnäytetyössä käytetty kaupallinen Micro BCA™ proteiinimäärityskitti (Thermo Scientific™, Product No. 23225) perustuu bikinkoniinihapon ja kupari-ionin välisen reaktion muodostaman värikompleksin absorbanssin määrittämiseen. Ensimmäi-

sen vaiheen biureettireaktiossa proteiini pelkistää alkaalisessa (emäksisessä) liuoksessa kahdenarvoisen kuparin (Cu^{2+}) yhdenarvoiseksi (Cu^+). Pelkistynyt kupari-ioni reagoi seuraavaksi kahden bikinkoniinihappomolekyylin kanssa, jotka muodostavat reaktiossa menetelmälle ominaisen violetin värisen kompleksin (katso kuva 5). Tämä vesiliukoinen kompleksi absorboi voimakkaimmin aallonpituudella 562 nm, jossa spektrofotometrinen mittaus suoritetaan. Micro BCA mahdollistaa kokonaisproteiinikonsentraation määrittämisen, koska syntyneen kompleksin absorbanssin ja näytteen proteiinipitoisuus ovat lineaarisessa suhteessa toisiinsa pitoisuusalueella 0,5 – 20 $\mu\text{g/ml}$. Jotta tuntemattoman proteiininäytteen pitoisuus saadaan selville, valmistetaan referenssiproteiinin, kuten BSA:n standardisuora. (Smith et al. 1985)



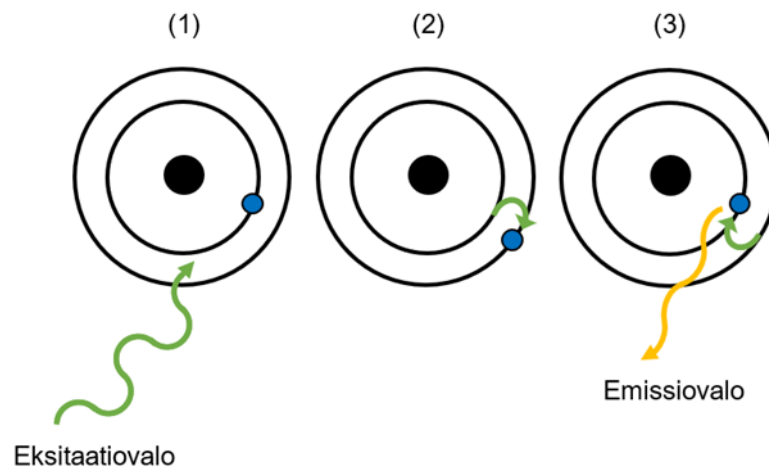
Kuva 5 Bikinkoniinihapon ja pelkistyneen kupari-ionin välinen reaktio, jossa syntyy violetin värinen kompleksi (kuvan alkuperäislähde: Thermo Scientific)

Micro BCA-proteiinimääritys on mittausmenetelmänä herkkä ja se soveltuu laajasti eri proteiinien konsentraatioiden määrittämiseen. Lisäksi BCA on kohtalaisen nopea analyysi, mutta esimerkiksi Bradfordiin verrattuna hidas, sillä BCA-menetelmä vaatii tavallisesti 30 – 120 min inkubointiajan 37 – 60 °C:ssa. (6). (Smith et al. 1985) (Thermo Scientific 2015)

5.4 Fluoresenssispektroskopia ja aikaerotteinen fluorometria

Fluoresenssi on ilmiö, jota hyödynnetään fluoresenssispektroskopia-mittauksessa. Ilmiössä aineen molekyylit ensin absorboivat valoa tietyllä aallonpituudella ja lyhyen aikavälin jälkeen emittoivat eli lähettävät näkyvää valoa. Molekyylin absorboidessa sähkömag-

neettisen säteilyn hiukkasen, eli fotonin (katso kuvio 3, vaihe 1), elektronit virittyvät (eksitoituvat) siirtyessään korkeaenergisemmälle tasolle (vaihe 2). Syntynyt viritystilä purkautuu elektronien siirtyessä takaisin omalle elektronikuorelleen (vaihe 3), jolloin aineen molekyylit emittoivat matalaenergisemmän fotonin, ja tällöin lähetetyllä valolla on suurempi aallonpituus. (Lakowicz 2006) (Tieteen termipankki 2017) Stokesin lain mukaan emissiovalon aallonpituus on lähes aina eksitaatioaallonpituutta suurempi eli matalaenergisempi. Tämä johtuu energian menettämisestä sisäisten värähtelyiden ja törmäilyjen vuoksi, elektronin siirtyessä korkeaenergisemmältä kuorelta matalaenergisemmälle kuorelle. Aikaa, jona fotonin emissio voidaan havaita, kutsutaan fluoresenssin eliniäksi. (Valeur & Berberan-Santos 2013)

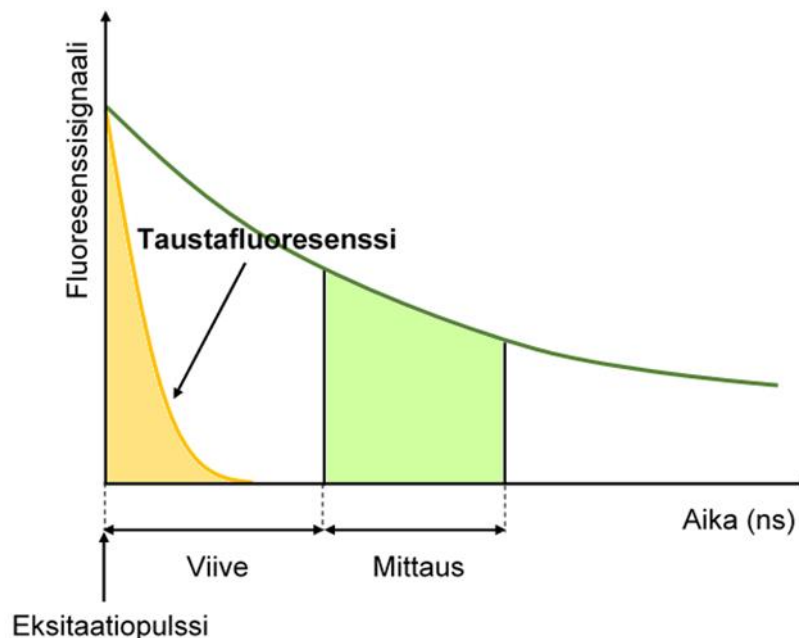


Kuvio 3 Fluoresenssi-ilmiön vaiheet

Fluoresenssispektroskopinen mittaus on herkkä, yksinkertainen sekä nopea ja se soveltuu fluoresoivien näytteen kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen määrittämiseen. Fluorometri tuottaa halutun valon aallonpituuden, jolla se eksitoi (herättää) elektroneja. Tutkittavan näytteen molekyylit lähettävät lyhyen aikavälin jälkeen emissiovalon aallonpituutta, joka mitataan laitteen detektorilla. (Turner Designs)

Monet biologiset yhdisteet ja proteiinit ovat luonnostaan fluoresoivia, kuten esimerkiksi GFP-proteiini, joka sisältää tehokkaasti valoa emittoivia fluoroforeja. Mikäli näyte ei sisällä luonnostaan fluoroforeja, ne voidaan lisätä fluoresenssin aikaansaamiseksi. (Valeur & Berberan-Santos 2013) Fluoroforit saattavat kuitenkin häiritä varsinaista mittausta aiheuttamalla taustafluoresenssia. Taustafluoresenssista voi päästä eroon käyttämällä aikaerotteista fluorometriä (TRF, *time-resolved fluorescence*). Aikaerotteisessa fluore-

senssimäärityksessä emission mittausta suoritetaan tietyn ajanjaksona reaktion virittävän eksitaatiovalopulssin jälkeen (katso kuvio 4). Pulssista seuraa viive, jonka aikana taustafluoresenssi laskee, eikä enää häiritse mittausta.

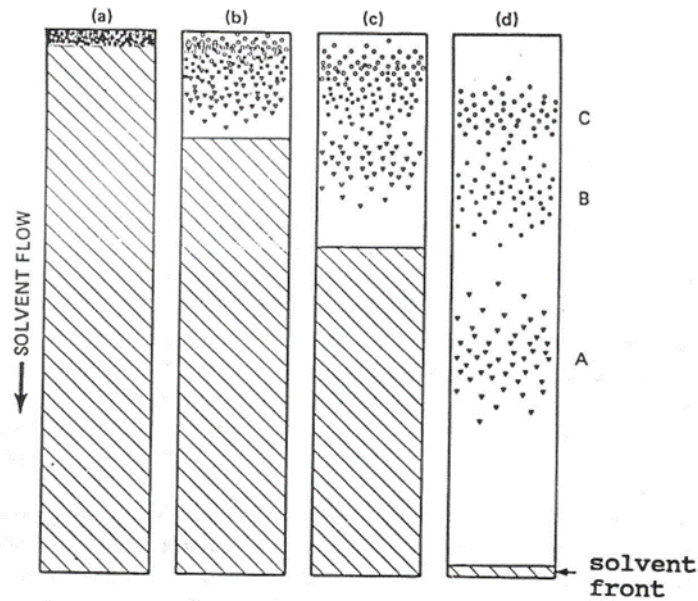


Kuvio 4 Aikaerotteisen fluoresenssimittauksen periaate (muokattu: Vartiija 2017)

5.5 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Kromatografialla tarkoitetaan yhdisteiden erottamiseen, puhdistamiseen sekä tunnistamiseen ja kvantitatiiviseen analysointiin käytettävää erotusmenetelmää. Menetelmän avulla seoksen yhdisteet saadaan eroteltua komponentteihinsa niiden fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien perusteella. (Weston & Brown 1997) Erottelu perustuu komponenttien jakautumiseen kahden faasin, liikkumattoman eli stationäärifaasin ja liikkuvan faasin (engl. *mobile phase*), välille. Liikkuva faasi (neste tai kaasu) virtaa stationäärisen faasin läpi, kuljettaen tutkittavan näyteseoksen komponentit mukanaan. Komponentit, jotka vuorovaikuttavat voimakkaammin liikkumattoman faasin kanssa, siirtyvät hitaammin faasin läpi kuin komponentit, joilla on heikompi vuorovaikutus stationäärifaasiin. Komponenttien erottelua faasien välillä havainnollisesta kuvassa 6. Erottuneet yhdisteet havaitaan lopuksi detektorilla kromatogrammeina, joiden avulla määritetään esimerkiksi tutkittavan näytteen pitoisuus. (Weston & Brown 1997) (Hitachi High-Technologies) (Harris 2007) Kromatogrammi (katso kuva 7) kuvaa graafisesti tutkittavan yhdisteen

komponenttien aiheuttaman detektorin vasteen eluutioajan eli syötetyn liikkuvan faasin aja funktiona (Anttila 2010).



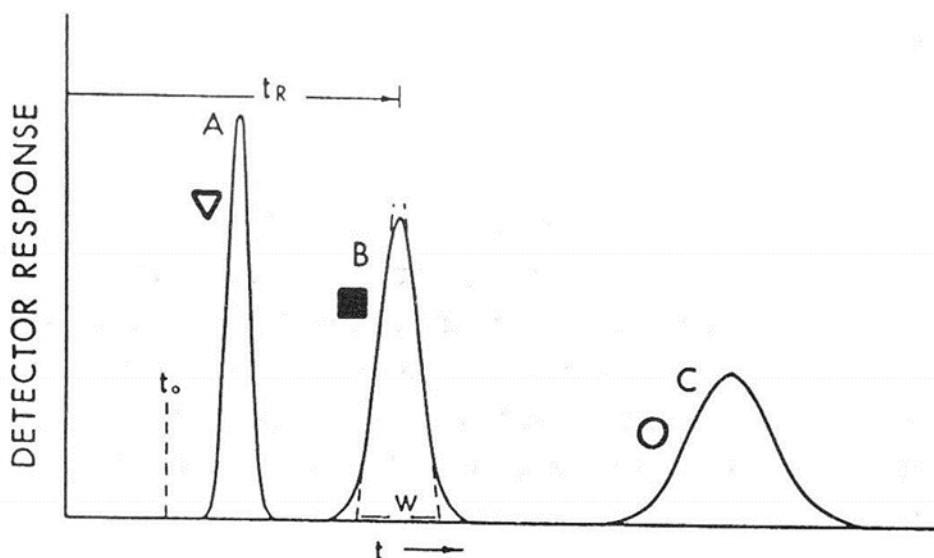
Kuva 6 Lähtöaineen komponenttien erottelu neljänä ajan hetkenä. Vasemmalla kuvataan lähtötilannetta, jossa näytteen komponentit ovat vielä sekoittuneena. Oikealla näytteen sisältämät komponentit (A, B ja C) ovat erottuneet toisistaan ominaisuuksiensa perusteella. (kuvan alkuperäislähde: Laine 2009)

Tutkittavan näytteseoksen yhdisteiden vuorovaikutusta ja jakautumista liikkuvan ja stationäärifaasin välillä kuvataan kapasiteettitekijällä k' .

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Kaava 3 Kapasiteettitekijää kuvaava yhtälö

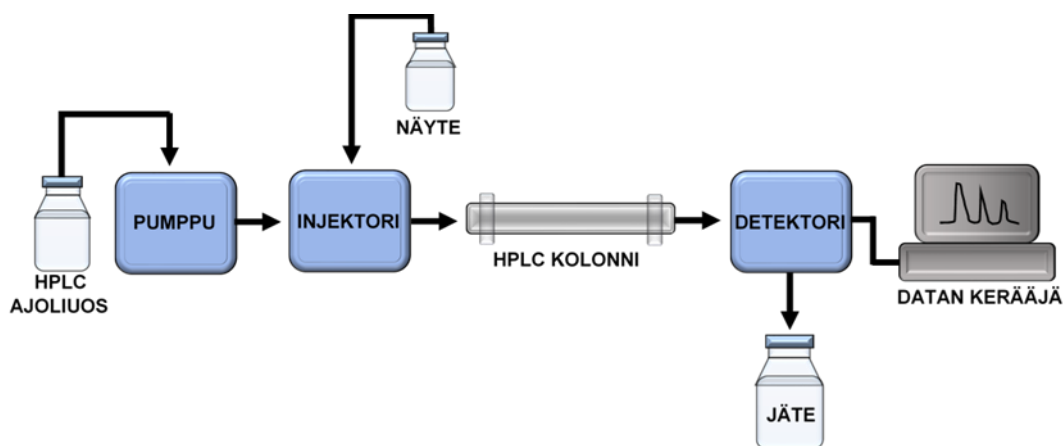
, jossa t_R on yhdisteen retentioaika eli aika, joka kuluu yhdisteen eluoituessa näyteinjektorilta stationäärifaasin läpi detektorille, ja t_0 on kuollut aika eli aika, jonka kuluessa liikkuva faasi ja sen mukana virtaavat yhdisteet, jotka eivät vuorovaikuta stationäärifaasin kanssa, eluoituvat liikkumattomasta faasista läpi. Mitä suurempi kapasiteettitekijä yhdisteellä on, sitä kauemmin se vuorovaikuttaa stationäärifaasin kanssa. (Laine 2009)



Kuva 7 Kromatogrammiesimerkki. Poikkiakselina on aika ja pystyakselina detektorin vaste. Kuvassa A-, B- ja C-yhdisteet ovat eluotuneet stationäärifaasista eri aikoina. A-yhdiste on eluotunut nopeimmin, joten sen retentioaika (t_R) on pieni. B- ja C -yhdisteet ovat eluotuneet hitaammin, minkä vuoksi niiden piikkien leveys (W) on suurempi. Kuollut aika (t_0) kuvastaa liikkuvan faasin saapumista detektorille. (Kuvan alkuperäislähde: Laine 2009)

Kromatografiassa stationäärifaasina voidaan käyttää erilaisia adsorbenttimateriaaleja (materiaali, jonka pinnalle kertyy helposti toisia aineita), kuten nestemäisiä, huokoisia papereita, silikageelejä tai kiinteitä partikkeleita pakattuna kolonniin. Kromatografiset menetelmät jaetaan liikkuvan faasin perusteella neste- (LC, *liquid chromatography*) ja kaasukromatografiaan (GC, *gas chromatography*). (Weston & Brown 1997)

Nestekromatografiassa liikkuvana faasina on nimensä mukaisesti neste (ajoliuos eli eluentti), ja stationäärifaasina on usein kolonniin pakattu kiinteä faasi tai kiinteän pinnalle immobilisoitu neste. Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) ajoliuos ja siihen liuennut näyte syötetään mekaanisesti tiheään pakatun kolonnin läpi 10 – 400 baarin paineella ja suurella virtausnopeudella (0,1 – 5 ml/min). (Weston & Brown 1997) (Harris 2007) (Coskun 2016) HPLC-laitteisto koostuu pumpusta, injektorista, kolonnista sekä detektorista ja datan kerääjästä (katso kuvio 5) (Weston & Brown 1997). Laitteiston ohjaus tapahtuu yleensä tietokoneen avulla. Menetelmänä HPLC nopea ja se soveltuu erityisesti tutkittavan aineen kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin sekä puhdistukseen. (Coskun 2016)



Kuvio 5 Korkean erotuskyvyn nestekromatografian laitteiston kaaviokuva

5.5.1 Käänteisfaasinessekromatografia UV/Vis -detektorilla

HPLC-kromatografit voidaan jakaa niiden stationääri faasin mukaan eri tyyppisiin kromatografisiin: normaalifaasinessekromatografiaan (NP-HPLC, *normal phase HPLC*), käänteisfaasinessekromatografiaan (RP-HPLC, *reverse phase HPLC*), kokoekskluusionestekromatografiaan eli geelisuodatusnessekromatografiaan (SEC-HPLC, *size-exclusion HPLC*) ja ioninvaihtonestekromatografiaan (IEC-HPLC, *ion-exchange HPLC*). (Weston & Brown 1997)

Opinnäytetyössä on käytetty käänteisfaasinessekromatografiaa, johon on kytketty UV/Vis -detektori (RP-HPLC-UV/Vis, *reversed phase HPLC with UV/Vis detector*). Käänteisfaasikromatografiassa erottuminen perustuu tutkittavan yhdisteen vuorovaikutukseen hydrofobiseen (poolittomaan) kolonniin. Menetelmässä tutkittava näyte on usein myös hydrofobinen tai vähemmän polaarinen, ja ajoliuos poolinen. Kromatografisessa menetelmässä poolittomat yhdisteet retentoituvat eli jäävät kolonniin tai tulevat hitaasti kolonnin läpi ajoliuoksen mukana. Yhdisteen pooliset komponentit kulkeutuvat suoraan kolonnin läpi. Näytteen retentio (eli "pidättyvyys") kolonnissa kasvaa, kun ajoliuoksen poolisuutta kasvatetaan. (Harris 2007) Käänteisfaasi-HPLC:n ajoliuoksena käytetään tavallisesti veden (poolinen) ja jonkin vesiliukoisen orgaanisen liuottimen, kuten metanolin (CH_3OH) tai asetonitriliin (CH_3CN), seosta. Yleisimmin käytetyt kolonnit koostuvat mikrohuokoisista silikapohjaisista faaseista, joihin on sidottu hiilivetyketju (esim. $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ tai $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$). (Beckett & Stenlake 1988) (Harris 2007)

Näytteen komponenttien erottamista voidaan tehostaa muun muassa ajoliuoksen happamuudella, lämpötilan säätelyllä, virtausnopeudella ja gradienttiajolla sekä näytteen injektioilavuudella. Gradientilla tarkoitetaan ajoliuoksen koostumuksen muuttamista ajon aikana esimerkiksi poolisemmaksi, jolloin näytteen retentio kasvaa. (Beckett & Stenlake 1988)

Näytteen erotetut yhdisteet ja komponentit tunnistetaan detektorilla. Opinnäytetyössä HPLC-laitteiston detektorina on käytetty UV/Vis:iä, jolla tunnistetaan absorbanssin avulla tutkittavan aineen eri komponentit. UV/Vis-detektori toimii ultraviolettivaloa apunaan käyttäen säädetyllä valoalueella. UV/Vis -spektroskopia on esitelty aiemmin luvussa 5.1.

6 MATERIAALIEN VALMISTUS JA DISSOLUUTIOANALYYSIT

Opinnäytetyössä suoritettiin dissoluutiotestejä GFP-proteiinin vapautumistutkimuksiin sooli-geelimenetelmällä valmistetusta silikahydrogeelistä. Dissoluutiotestit optimoitiin niin, että silikan liukeneminen tapahtui 7 h ajan *in sink* -olosuhteissa tasaisesti eli lineaarisesti. Testien näytteistä määritettiin silikan liukenemisnopeus ja GFP:n vapautumisnopeus ajan funktiona eri analyysimenetelmillä (menetelmät on esitelty aikaisemmin luvussa 5). Menetelmille suoritettiin lisäksi häiriömittauksia käytettävästä puskurista ja silikamateriaalista.

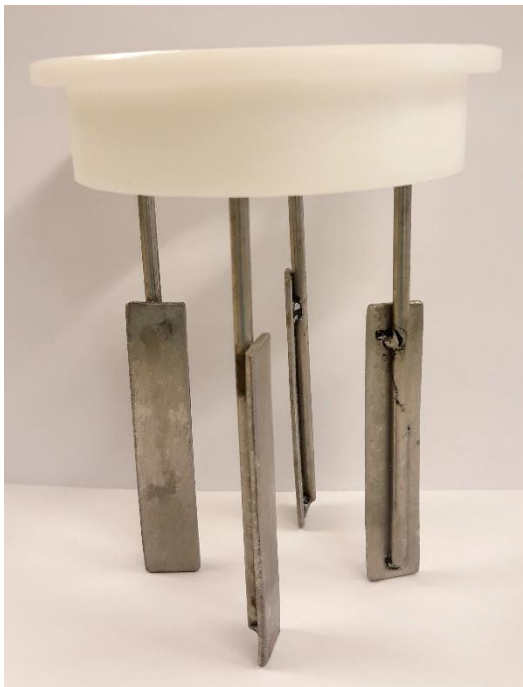
6.1 GFP:tä sisältävän injektoitavan hydrogeelin valmistus

Silikahydrogeelin valmistus aloitettiin valitsemalla sopiva TEOS:n ja veden moolisuhde (ainemäärien suhde) eli R-arvo. R-arvon valinta määritettiin sooli-geeli –laskurin avulla (katso liite 1) sekä testaamalla eriarvoisten geelien stabiilisuutta ja injektoitavuutta 25G -ohutneulasta silmämääräisesti opinnäytetyötä edeltävässä ammattiharjoittelussa osana tutkimusryhmää. Testien ja teknisesti helpon valmistuksen perusteella opinnäytetyössä päätettiin valmistaa injektioon soveltuva R100,6-geeli R80-soolistä (katso laskut liitteestä 2). Silikahydrogeeliin kapseloitavan GFP-proteiinin määrä määritettiin niin, että lisätyn GFP:n massan osuus oli 5 % silikan kokonaismassasta geelissä. Sooli-geeliprosessissa GFP-liuos toimi osana neutralointiliuosta, jonka tarkoituksena oli säätää sooli lopulliseen R-arvoonsa ennen geelin muodostumista.

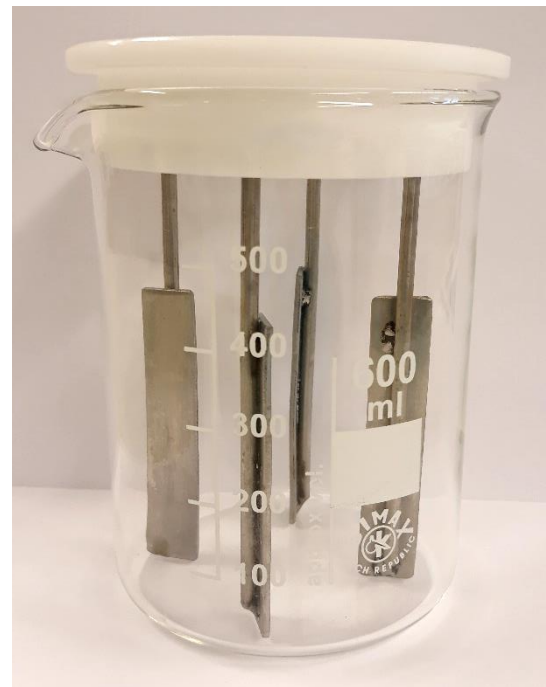
6.1.1 Silikasoolin valmistus

Geeli valmistettiin kaksivaiheisella sooli-geeliprosessilla, jossa ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin R80-sooli. Soolin valmistuksessa eli hydrolyysissä lähtöaineina käytettiin tetraetyyliortosilikaattia (TEOS) (98 %, Sigma Aldrich) ja vettä (18,2 M Ω) (Millipore Milli-Q-puhdistuslaitteisto). TEOS:n ja veden hydrolyysireaktiota katalysoitiin suolahapolla (HCl) (1,0 M, WVR Chemicals), jonka pitoisuus lopullisessa soolissa oli 0,01 M.

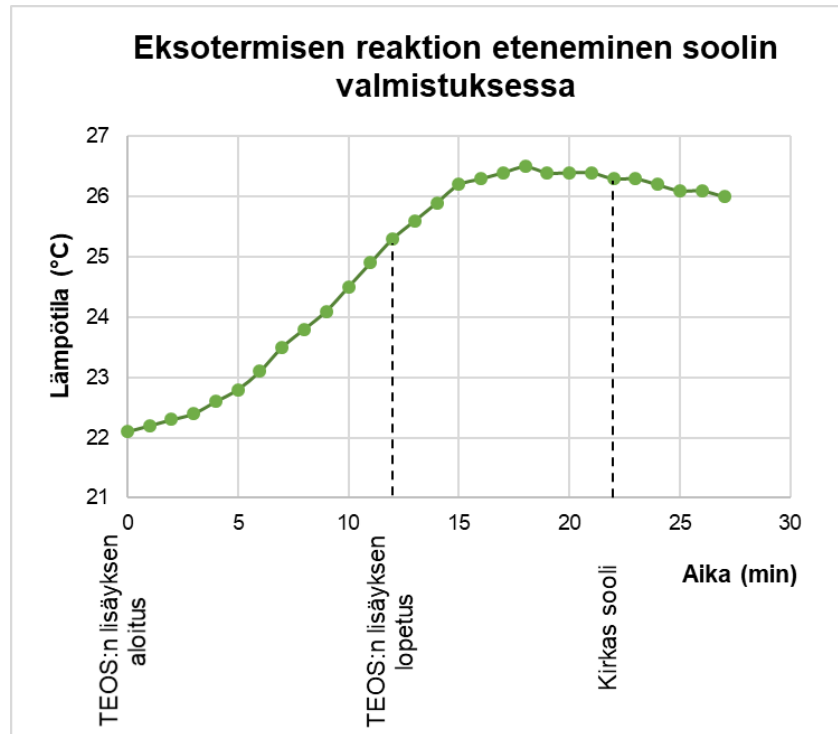
R80-soolia valmistettiin 100 ml 600 ml:n foliolla suljetussa dekanterilasissa, jossa vesi ja suolahappo sekoitettiin ensin magneettisekoittajan avulla keskenään. Suolahapon tarkoitus oli laskea prosessissa liuoksen pH lähelle silikan isoelektristä pistettä (pH 2), jossa lähtöaineiden hydrolyysireaktio on optimaalisinta ja geelautuminen hidasta. TEOS:n lisäys vesi-suolahappo-liuokseen suoritettiin pumpun (Watson Marlow) avulla tipoitain nopeudella n. 1 ml/min jatkuvalla sekoituksella. Seoksen sekoitusta tehostettiin käyttämällä virtausesteitä (katso kuvat 8 ja 9), ja tätä jatkettiin kunnes eri faaseja ei enää havaittu, ja sooli oli kirkas. Soolin muodostumista seurattiin eksotermisen eli lämpöä vapauttavan reaktion aiheuttavan lämpötilamuutosten (katso esimerkki kuvio 6) sekä silmin havaittavan faasimuutoksen avulla (soolin kirkastuminen). Soolin valmistuksen koejärjestely on esitelty kuvassa 10.



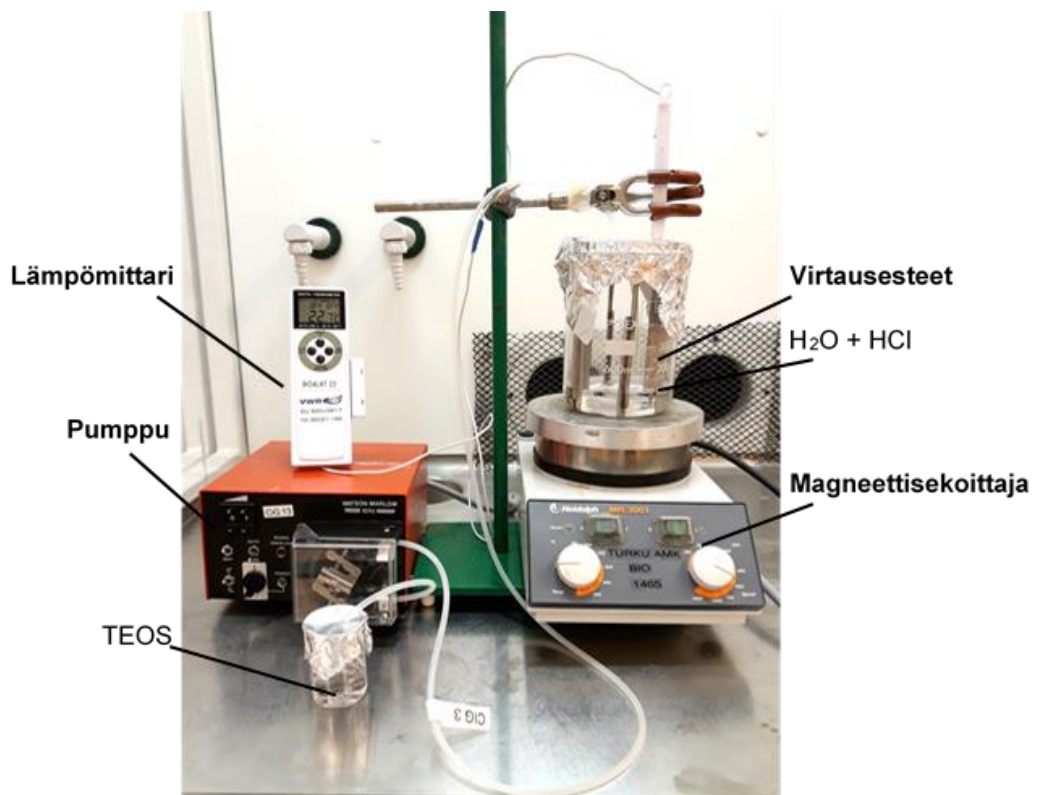
Kuva 8 Soolin valmistuksessa käytetty virtauseste



Kuva 9 Soolin valmistuksessa käytetty virtauseste 600 ml:n dekanterilasissa



Kuvio 6 Esimerkkikuvio eksotermisen reaktion etenemisestä R80-soolin valmistuksessa

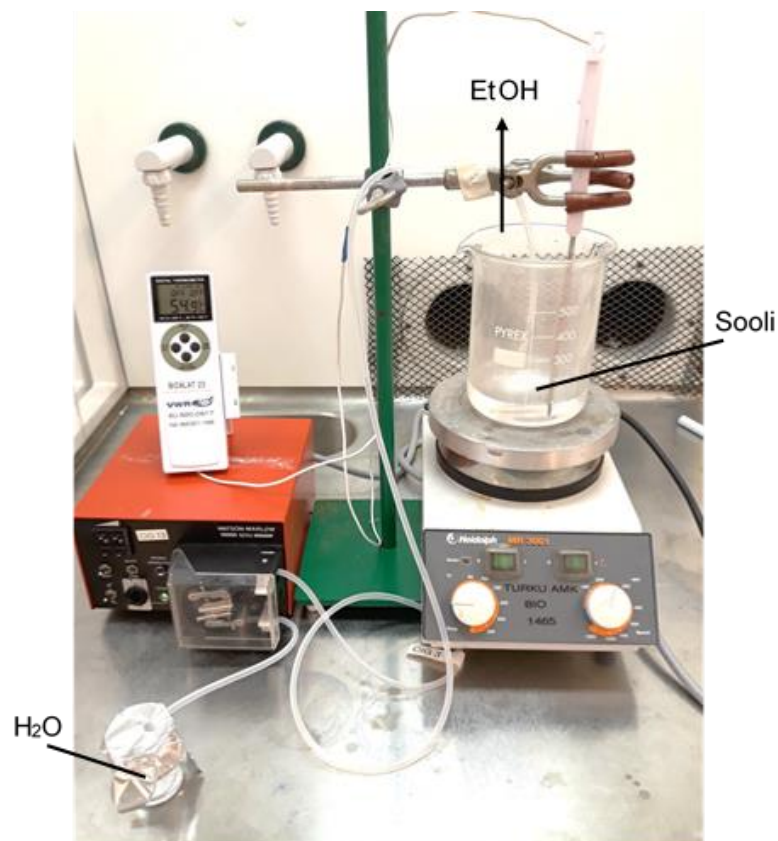


Kuva 10 Soolin valmistuksen koejärjestely ja laitteisto

Soolin valmistuksessa käytetyt tarkat reagenssilavuudet on esitelty liitteessä 1.

6.1.2 Etanolin haihdutus soolista

Hydrolyysireaktiossa syntyvän etanolin suhteellista pitoisuutta pienennettiin soolista haihduttamalla (katso kuva 11 koejärjestelyistä). Haihdutus suoritettiin, koska sillä uskottiin olevan vaikutusta GFP:n vapautumiseen sekä proteiinin aktiivisuuden säilymiseen. Haihdutusprosessissa soolia lämmitettiin 60 °C:seen lämmitettävän magneettisekoittajan (Heidolph) avulla, ja haihtuvan etanoli-vesiseoksen tilalle lisättiin tipoitain (n. 1 ml/min) 20 ml:aa vettä, eli noin kaksinkertainen määrä haihtuneeseen seokseen verrattuna. Soolia lämmitettiin, kunnes haihtuneen seoksen syrjäyttävä vesi oli lisätty, jonka jälkeen suspensio jäähdytettiin nopeasti jäissä ja säilytettiin + 4 °C:ssa. Sooli punnittiin ennen ja jälkeen haihdutusprosessin, jotta geelin lopullinen R-arvo saatiin määritettyä tarkasti (katso liite 3 laskuista).



Kuva 11 Etanolin (EtOH) konsentraation laskemiseksi suoritettun haihduttamisen koejärjestely

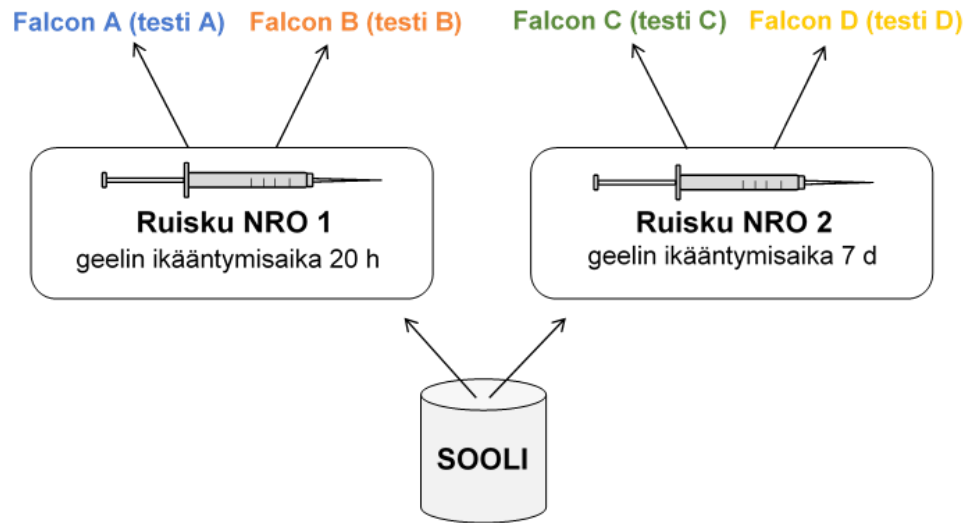
6.1.3 Geelin valmistus ja GFP:n kapselointi

Sooli-geeliprosessin toisessa vaiheessa geeli muodostettiin nostamalla soolin pH ensin arvoon 5 – 6 natriumhydroksidin avulla (NaOH) (0,25 M, Merck). Happamuuden muutosta tarkasteltiin pH-mittarin (Orion) avulla. Emäsluos (400 µl) lisättiin varovasti tiipoittain sekoituksessa olevaan sooliin. Natriumhydroksidin tarkoituksena oli nopeuttaa soolin geelitymistä nopeuttamalla kondensaatioreaktioita ja silikapartikkelien aggregoitumista. pH:n annettiin tasoittua haluttuun arvoon, ja tämän jälkeen lisättiin tarvittava vesimäärä (498 µl) ja GFP-liuos (920 µl), joilla sooli säädettiin lopulliseen R-arvoonsa ennen geelautumista. Geelin lopulliseksi happamuudeksi saatiin pH 6.5 – 7, mikä on optimaalinen käytetylle GFP-proteiinille ja kyseisellä pH-alueella geelin muodostuminen tapahtuu nopeimmin. NaOH-lisäyksen jälkeen geelautuminen nopeutui huomattavasti, minkä vuoksi GFP tuli sekoittaa nopeasti sooliin, jotta proteiini kapseloitui homogeenisesti.

Lopullisen pH-säädön jälkeen sooli siirrettiin nopeasti Pasteur-pipetin avulla 1 ml:n lääkeannosteluiskuuihin, jotka suljettiin tiiviisti petrifilmillä avulla (katso kuva 12). Saman soolierän ruiskut jaettiin kahteen eri ryhmään: ruiskun nro 1 geeliä (rinnakkaiset geelitestit Falcon A ja B samasta ruiskusta nro 1) ikäännytettiin 20 h:n ajan ja ruiskun 2 geeliä (rinnakkaiset geelitestit Falcon C ja D samasta ruiskusta nro 2) 7 päivän ajan ennen käyttöä (katso kuvio 7). Ruiskujen 1 ja 2 ikääntyminen suoritettiin huoneenlämmössä (RT) pystyasennossa ruiskusuutin alaspäin.



Kuva 12 Esimerkkikuva ~R100-GFP-silikahydrogeelistä petrifilmillä suljetussa 1 ml:n lääkeruiskussa



Kuvio 7 Testin geeliruiskujen ryhmittely samasta soolierästä (~R80)

In sink -rajan testausta ja optimointia varten opinnäytetyössä valmistettiin myös silika-hydrogeelit ilman GFP-proteiinin kapselointia. GFP-liuoksen tilalla käytettiin vastaava määrä (920 µl) Tris-puskuria (0,05 M, pH 7.4 37 °C:ssa). Kyseisiä geelejä ikäännytetään 20 h (RT) ennen dissoluutiotestien suorittamista.

Geelin valmistuksessa käytetyt tarkat reagenssitilavuudet laskuineen on esitelty liitteessä 2. Lisäksi Tris-puskurin valmistusohje löytyy liitteestä 4.

6.2 Dissoluutiotestin suoritus injektoitavalle GFP-silikahydrogeelille ja näytteenotto

Silikahydrogeelin liukenemista tutkittiin dissoluutiotesteillä liuottamalla ~R100-geeliä Tris-puskuriin, 0,05 M, + 37 °C, pH 7.4, 150 rpm sekoitusnopeudella 7 h ajan. Testit suoritettiin *in vitro* 30 ml:aa Tris-puskuria sisältävissä Falcon-putkissa (Sigma Aldrich, 50 ml), johon injektoidiin 25G x 1 -ohutinjektioneuloilla (Terumo) (katso kuva 13) 100 µl GFP:tä sisältävää silikahydrogeeliä. Dissoluutiotesteissä käytettiin ikääntymisajaltaan erilaisia geelejä (ruisku 1: 20 h; Falcon A ja B ja ruisku 2: 7 d; Falcon C ja D). Ruiskun 1 A- ja B-Falconeiden geelit olivat dissoluutiotesteissä toistensa rinnakkaisgeelejä, sillä testeissä käytettiin saman ruiskun (nro 1) geeliä. Ja vastaavasti ruiskun 2 B- ja C-Falconeiden geelit olivat dissoluutiotesteissä toistensa rinnakkaisgeelejä. Injektoidun geelin määrä punnittiin tarkasti ennen testien aloitusta tulosten käsittelyä varten. Puskurista otettiin näyte tunnin välein silika- ja GFP-määrittelyksiin, sentrifugoimalla Falcon-putkia asetuksilla 20 000 x G, 37 °C, 15 min ajan. *In sink* -olosuhteita ylläpidettiin testeissä

vaihtamalla näytteenoton jälkeen Tris-puskuria uuteen tunnin välein. 30 ml puskuria vaihdettiin uuteen pipetoimalla testiputkista sentrifugoitua puskuria niin, että näytteen ja puskurinvaihdon yhteistilavuudeksi saatiin 12 ml:aa.



Kuva 13 Esimerkkikuva dissoluutiotesteissä käytetystä injektio lääkeruiskusta

6.2.1 *In sink* -rajan testaus ja optimointi

In sink -rajan testaus ja optimointi ~R100-silikageelille suoritettiin käyttäen geelejä, joissa ei ollut GFP:tä, ja jotka olivat ikääntyneet 20 h:n ajan RT-olosuhteissa. Silikan *in sink* -rajan ylityspistettä (30 µg/ml) tutkittiin ensin liuottamalla 300 µl:aa injektioitavaa geeliä 30 ml:ssa 0,05 M Tris -puskuria 7 h:n ajan Falcon-putkissa lämpökaapissa (37 °C) jatkuvassa sekoituksessa. Sekoitusnopeudeksi valittiin 150 rpm, jonka avulla varmistettiin, ettei silikan liukenemisesta synny gradientteja, vaan liuennut silika pysyisi tasaisesti sekoittuneena puskuriin testien aikana.

Puskurista otettiin näytteitä tunnin välein sentrifugoimalla Falcon-putkia eri asetuksilla 10 000 x G, 37 °C, 15 min ja 20 000 x G, 37 °C, 15 min. Näytteenoton jälkeen puskuriin lisättiin näytetilavuutta vastaava määrä eli 1 – 2 ml:aa uutta Tris-puskuria, jotta testitilavuus pysyisi samana testin suorittamisen aikana. Näytteistä määritettiin silikan pitoisuus UV/Vis -spektrofotometrillä ja laskettiin liuenneen silikan määrä ajan funktiona. Näytteiden käsittely ja mittaus on esitelty tarkemmin luvuissa 6.3 ja 6.3.1.

~R100-geelin *in sink* -rajan ylittyminen optimoitiin n. 2 h:n kohdalle. Tämä saavutettiin muuttamalla injektio tilavuutta 100 µl:aan, pitämällä puskurin volyyymi 30 ml:ssa ja vaihtamalla lähes puolet (12 ml) Tris-puskuria testitilavuudesta uuteen tunnin välein. *In sink* -olosuhteiden optimoinnin tarkoituksena oli saavuttaa silikan vapaa liukeneminen dissoluutiotesteissä.

6.3 Silikahydrogeelin liukenemisnopeuden tutkiminen

~R100-geelin *in sink*-olosuhteiden pysyvyyttä (eli silikan pitoisuus puskurissa > 30 µg/ml testin ajan) ja silikan liukenemisnopeutta tutkittiin mittaamalla dissoluutionäytteistä silikan pitoisuus spektrofotometrisesti (Shimadzu) aallonpituudella 815 nm kolorimetrisellä UV/Vis -määrityksellä.

6.3.1 Silikanäytteiden esikäsittely

Kolorimetristä silikamääritystä varten dissoluutionäytteet tuli esikäsitellä ennen varsinaista mittausta. Näytteiden käsittely suoritettiin Turun ammattikorkeakoulun ”Reaktiivisen silikaatin määritys spektrofotometrisesti” -työohjeen mukaisesti (työohje liitteessä 5) käyttäen itse valmistettuja reagenssiliuoksia.

Dissoluutiotestien eri aikapisteidien näytteet laimennettiin suhteessa 1/62,5 100 ml:n mittapulloihin, jotta ne osuisivat määrityksen mitta-alueelle (0,1 – 1,2 mg Si/l). Näytteiden pH:n alentamiseksi halutulle rajalle (pH 1.1 – 1.3) mittapulloihin mitattiin ensin työohjeesta poiketen 2,5 ml 1,0 M:sta suolahappoa, (HCl) ennen näytemäärän (0,8 ml) lisäämistä, jonka jälkeen mittapullot täytettiin merkkiin asti Milli-Q-vedellä (18,2 MΩ). Näytelaimennoksista mitattiin 50 ml, jonka päälle reagenssiliuokset pipetoitiin. Laimennoksiin lisättiin ensin 1,0 ml rikkihappoliuosta (H₂SO₄, 0,5 M) ja sekoitettiin. Seuraavaksi pipetoitiin 2,0 ml ammoniumheptamolybdaattiliuosta, sekoitettiin ja odotettiin 10 min, jonka aikana silikan piihappo ja molybdaatti muodostivat keltaisen kompleksiyhdisteen. Kyseisestä kompleksiyhdisteestä poistettiin määritystä häiritsevät ionit lisäämällä näytelaimennoksiin 2,0 ml oksaalihappoliuosta sekoittaen. Kompleksiyhdiste pelkistettiin molybdeeninsiniseksi 30 – 60 s:n kuluessa lisäämällä 1,0 ml pelkistysreagenssia. Molybdeeninsinisen pelkistystuotteen absorbanssi mitattiin spektrofotometrisesti näytteistä 20 min kuluessa aallonpituudella 815 nm käyttäen läpivirtauskyvettä (Shimadzu). Silikapitoisuus laskettiin tehdyn pii-standardisuoran yhtälön (katso liite 6) ja absorbanssitulosten avulla. Silikamääritystä varten tuli aina valmistaa referenssinolla (eng. *blank*, nollanäyte) Milli-Q-vedestä, joka esikäsiteltiin näytelaimennosten tavoin.

6.4 Vapautuneen GFP:n proteiinipitoisuuden määrittäminen

Dissoluutionäytteistä mitattiin opinnäytetyössä GFP:n vapautumista aikapisteittäin Bradford- ja Micro BCA -kokonaisproteiinianalyysillä. Määritykset ovat spektrofotometriä ja kolorimetriä menetelmiä, joissa absorbanssin mittaaminen suoritetaan eri aallonpituuksilla. Menetelmissä hyödynnettiin kaupallisia määrittämissettejä. Lisäksi vapautuneen GFP:n pitoisuus määritettiin aikapisteittäin fluorometrisesti spektrofotometrillä.

6.4.1 GFP:n määrittäminen Bradford-analyysillä

Opinnäytetyössä GFP:n pitoisuusmäärittämisessä käytettiin kaupallisen Coomassie Bradford -proteiinianalyysikitin (Thermo Scientific™, Product No. 23200) mikro-mikrokuoppalevy protokollaa (eng. *micro microplate protocol*), jonka lineaarinen mittausalue on 1 – 25 µg/ml (katso liite 7, työohje). Määrittämisessä pipetoitiin 150 µl:aa GFP:tä sisältävää laimentamatonta dissoluutionäytettä aikapisteittäin (1 – 7 h) 96-kaivoiseen mikrokuoppalevyyn (Wallac, musta, kirkaspohjainen 96-kuoppalevy), jonka päälle pipetoitiin vastaava määrä (150 µl) CBB-väreagenssia (*Coomassie brilliant blue*). Tehokkaan 30 sekunnin sekoituksen jälkeen proteiininäytteet inkuboitiin huoneenlämmössä (RT) 10 min ajan. Näytteistä mitattiin absorbanssi spektrofotometrisesti aallonpituudella 595 nm (Hidex Sense). GFP-pitoisuus laskettiin albumiini-standardisuoran (BSA) yhtälön (katso liite 8) ja absorbanssituloksen avulla. Jokaisesta näytteestä suoritettiin kolme rinnakkaismäärittäystä ja referenssinollana käytettiin Milli-Q-vettä.

6.4.2 GFP:n määrittäminen Micro BCA -analyysillä

Opinnäytetyön BCA -proteiinimäärittäykset suoritettiin käyttämällä kaupallista Micro BCA™ proteiinimäärittämissettä (Thermo Scientific™, Product No. 23225). Analyysi suoritettiin kitin kyveti-protokollan mukaisesti (lineaarinen mittausalue 0,5 – 20 µg/ml) (katso liite 9, työohje).

GFP:n proteiinimäärittäminen suoritettiin 2,5 ml:n kyveteissä (VWR, *semi-micro*), joihin pipetoitiin 1,0 ml tutkittavaa laimentamatonta dissoluutionäytettä ja 1,0 ml Micro BCA -proteiinimäärittämissetin työliuosta (*working reagent*). Sekoitus suoritettiin pipetinkärjellä imien.

Kyvetit peitettiin sulkijakalvolla (WVR, *sealing film*) ja inkuboitiin lämpökaapissa (Termaks) 60 °C:ssa 1 h ajan. Inkuboinnin jälkeen näytteet jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi (RT) ja mittaus suoritettiin 10 min kuluessa spektrofotometrisesti (Shimadzu) aallonpituudella 562 nm. GFP-pitoisuus laskettiin referenssistandardisuoran (BSA, albumiini) yhtälön (katso liite 10) ja absorbanssituloksen avulla. Jokaisesta dissoluutionäytteestä suoritettiin kolme rinnakkaismäärittystä ja nollanäytteenä käytettiin Milli-Q-vettä.

6.4.3 GFP:n määrittäminen fluorometrisesti

Dissoluutionäytteistä mitattiin lisäksi vapautuneen GFP-proteiinin konsentraatio aikapisteittäin fluorometrisesti (Hidex Sense). Mittauksessa ei käytetty aikaerotteista fluoresenssia, sillä GFP:n fluoresenssin elinikä on liian lyhyt (1.3 – 3.7 ns, riippuen GFP-variantioista) kyseiseen analyysiin (Pepperkok et al. 1999).

Mittauksessa pipetoitiin 250 µl:aa laimentamatonta dissoluutionäytettä rinnakkaisnäytteen eri aikapisteiltä 96-mikrokuoppalevylle (Wallac, musta-tasapohjainen 96-kuoppalevy), ja mitattiin GFP:n fluoresenssi eksitaatioaallonpituudella 485 nm ja emissioaallonpituudella 535 nm. Fluoresenssituloksista ja GFP-standardisuoran yhtälöstä (katso liite 11) laskettiin dissoluutioteisteistä vapautuneen GFP:n pitoisuus ajan funktiona.

6.5 GFP:n ja SiO₂:n häiriötestaus analyysimenetelmille

GFP-proteiinimäärittämismenetelmille suoritettiin häiriötestaukset. Testeissä tutkittiin, häiritseekö silikan läsnäolo Bradford-, Micro BCA- tai fluoresenssimittauksia, lisäämällä standardi- ja GFP-laimennossuoraan tunnettu määrä silikaa. Testien lopullisiksi silikapitoisuuksiksi valittiin 5 µg/ml ja 30 µg/ml, jotka vastasivat dissoluutioteistien silikapitoisuusraja-arvoja sekä *in sink* -rajaa. Tuloksia verrattiin standardisuoran mittaustuloksiin, joissa ei ollut silikaa.

Micro BCA -proteiinianalyysin silika-häiriötestauksessa valmistettiin kolme albumiini-standardisuoran laimennossarjaa, jotka sisälsivät eri määrän silikaa. Ensimmäinen suora sisälsi 0 µg/ml, toinen 5 µg/ml ja kolmas 30 µg/ml silikaa. Standardilaimennokset käsiteltiin dissoluutioteistinäytteiden tavoin (esitely luvussa 6.4.2 GFP:n määrittäminen Micro BCA -analyysillä) ja mittaus suoritettiin spektrofotometrillä (Shimadzu) aallonpituudella 562 nm. Standardisuorien mittaustuloksia verrattiin toisiinsa.

Fluoresenssimittauksen silika-häiriötestausta varten valmistettiin GFP-liuoksesta (pitoisuudeltaan ~15 000 µg/ml:aa) laimennossuora pitoisuuksin 64 µg/ml, 32 µg/ml, 18 µg/ml, 8 µg/ml ja 4 µg/ml. Laimennokset tehtiin Milli-Q-veteen. Testissä valmistettiin lisäksi vastaavat GFP-laimennokset, joiden loppupitoisuuksiin sisältyi 30 µg/ml sekä 5 µg/ml saturoitua silikaa. GFP-laimennossuorat (sis. 0 µg/ml, 5 µg/ml ja 30 µg/ml silikaa) mitattiin 96-kuoppalevyssä (näytämäärä 250 µl) spektrofotometrisesti (Hidex Sense) eksitaatioaallonpituudella 485 nm ja emissioaallonpituudella 535 nm. Saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa.

6.6 TRIS-puskurin häiriötestaus analyysimenetelmille

GFP- ja silika-analyysimenetelmille tehtiin Tris-puskurin häiriötestaus, koska dissoluutio-testin näytteet sisälsivät kyseistä puskuria. Testit suoritettiin Bradford-, Micro BCA-, fluoresenssi- ja silikan määrittämissä menetelmille, mittaamalla Tris-puskurin aiheuttama tausta ja vertaamalla kyseisiä tuloksia Milli-Q-veden (nollanäytteen) taustaan. Häiriötesti tehtiin lisäksi NanoDropille sekä RP-HPLC-UV/Vis:lle.

7 RP-HPLC-UV/VIS –MENETELMÄN KEHITYS GFP:N MÄÄRITYKSEEN

Opinnäytetyössä kehitettiin toimivaa ja luotettavaa HPLC-menetelmää GFP-proteiiniliuoksen analysointiin. Menetelmän tarkoituksena olisi määrittää proteiinin konsentraatio (kvantitatiivinen analyysi) käänteisfaasinestekromatografian UV/Vis -detektorilla sekä proteiinin kvalitatiivisia ominaisuuksia. Opinnäytetyössä tutkittiin ja verrattiin dissoluutiotes- tissä käytetyn itse tuotetun ja -puhdistetun GFP-liuoksen (~15000 µg/ml) ja kaupallisen (standardi) GFP-liuoksen (Merck, 300 µg/µl, lot #2829456, puhtaus >70 %) antamia sig- naaleja eli piikkejä ja retentioaikoja toisiinsa. Lisäksi tutkittiin HPLC:n käyttöönoton mah- dollisuutta dissoluutiotesinäytteiden analyysimenetelmäksi.

Menetelmän kehitys aloitettiin *Development of Stability Indicating Methods for Green Fluorescent Protein by HPLC* -artikkelissa (Hentz & Mosley 2016) olleen menetelmän pohjalta sekä tarkastamalla kaupallisen GFP-liuoksen antamia signaaleja laajennetun spektrin mittauksessa NanoDrop:lla. Testissä tarkasteltiin, onko UV/Vis -detektorilla teo- riassa mahdollista saada signaalia dissoluutionäytteiden laimeille GFP-pitoisuuksille.

7.1 Spektrofotometrinen mittaus NanoDrop:lla (UV/Vis)

NanoDrop -spektrofotometrillä (ND-1000) mitattiin kaupallisesta GFP-proteiiniliuoksesta valmistettuja laimennoksia aallonpituusalueella 220 – 750 nm (UV/Vis). Mittauksella tut- kittiin, millä aallonpituuksilla GFP-laimennos antaa piikkejä, ja mikä on alhaisin pitoisuus saada luotettavia signaaleja. GFP-liuoksesta valmistettiin laimennokset Milli-Q-veteen suhteessa 1/1 (300 µg/ml), 1/5 (60 µg/ml), 1/10 (30 µg/ml) ja 1/20 (15 µg/ml), jotka mi- tattiin NanoDropilla. Mittauksessa käytettiin 1,0 µl:aa näytetilavuutta. Vastaava mittaus suoritettiin itsetuotetulle GFP-liuokselle, josta valmistettiin laimennokset Milli-Q-veteen suhteessa 1/1 (~15000 µg/ml), 1/5 (~3000 µg/ml), 1/10 (~1500 µg/ml), 1/20 (~750 µg/ml), 1/40 (~375 µg/ml). Lisäksi testattiin, antaako Milli-Q-H₂O ja Tris-puskuri taustaa suoritet- tavassa mittauksessa. Mittaustuloksia hyödynnettiin RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän ke- hityksessä.

7.2 HPLC-laitteisto ja -kolonnin valinta

HPLC-menetelmän kehityksen tutkimuksessa käytetty laitteisto (Agilent Technologies, Hewlett Packard 1100 series HPLC system) sisälsi pumpun, kaasunpoistoyksikön, automaatti-injektorin, termostaattiyksikön kolonnille (eli kolonniuunin), käänteisfaasikolonnin ja esikolonnin, sekä detektorin (UV/Vis) ja datan kerääjän. Menetelmään valittiin artikkelin pohjalta (Hentz & Mosley 2016) silikapohjainen ja hydrofobinen C18-kolonne (4,6 mm x 15 cm, Agilent Eclipse XDB-C18, 5 µm), sillä GFP:n rakenne sisältää hydrofobisia osia, jotka retentoituvat käytettävään kolonniin (Hentz & Mosley 2016). Esikolonnia käytettiin suojaamaan varsinaista kolonnia näytteessä olleelta mahdollisilta pöly- tai likapartikkeleilta.

Käytetyn HPLC-laitteiston UV/Vis -detektori oli yhden aallonpituuden detektori, eli se soveltui vain valitun aallonpituuden mittaamiseen.

7.3 HPLC-ajoliuosten valinta ja valmistus

HPLC:n menetelmän kehityksessä käytettiin kolmea eri ajoliuosta: A-, B- ja C-eluenttia. A-liuos koostui Milli-Q-vedestä ja 0,1 % trifluoretikkahaposta (TFA) sekä B-liuos asetoniitrilistä (C₂H₃N) ja 0,1 % trifluoretikkahaposta. C-liuos toimi ajossa kolonnin pesuliuoksena, jonka koostumus oli 50 % ACN:ä ja 50 % Milli-Q-vettä. Liuokset valmistettiin HPLC-laatusista reagensseista ja ajoliuoksista poistettiin määritystä häiritsevät kaasukuplat ultraäänihauteen avulla. Koska menetelmässä käytettiin gradienttijaon soveltuvaa UV/Vis -detektoria, ajoliuokset (A, B ja C) valittiin siten, etteivät ne absorboi valoa käytettävillä aallonpituuksilla (280 nm ja 485 nm).

7.4 HPLC-menetelmän kehitys

Menetelmän kehityksessä tutkittiin aluksi GFP-laimennosten (pitoisuudet: 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml ja 100 µg/ml, valmistettu 15000 µg/ml GFP-liuoksesta) antamia signaaleja artikkelin (Hentz & Mosley 2016) gradienttia käyttäen aallonpituuksilla 280 nm ja 485 nm, 40 °C:ssa. GFP-liuokset laimennettiin Milli-Q-veteen ja suodatettiin 0,45 µm:n ruiskusuodattimella (Acrodisc). Laimennosten tarve oli vähintään 1 ml. Ennen näytteiden ajoa kolonne tuli aina tasapainottaa eluenteilla (esim. suhteessa

A-liuos: 40 %, B-liuos: 30 % ja C-liuos: 30 %) virtausnopeudella 1 ml/min noin 30 min ajan.

Taulukko 1 Artikkelin (Hentz & Mosley 2016) HPLC-menetelmän ajo-olosuhteet GFP:n ajoon

Gradientti	Aika (min)	A-liuos (%)	B-liuos (%)
	0	65	35
	4,0	55	45
	4,25	55	45
	4,3	65	35
	6,0	65	35
Virtausnopeus	1,0 ml/min	Aallonpituudet	280 nm ja 485 nm
Kolonnin lämpötila	40 °C	Injektio-tilavuus	10 µl

Tämän jälkeen testattiin useita erilaisia ajoja muuttaen gradienttiasetuksia (A- ja B-liuosien suhteita), kolonnin lämpötilaa (30 °C ja 40 °C), injektio-tilavuutta (5 µl, 10 µl ja 20 µl) sekä kokonaisajonpituutta (6 – 30 min, eng. *stop time*), jotta GFP:n piikit saatiin mahdollisimman teräviksi ja erotelluiksi. Testiajoissa muutettiin aina yhtä parametria kerralla, jotta selviäisi mitkä parametrimuutokset vaikuttivat tutkittavan näytteen komponenttien erotteluun. Jokaiselle ajolle suoritettiin vähintään kaksi rinnakkaisajoa, jotta testien toistettavuutta pystyttiin seuraamaan. Lisäksi ajojen loppuun lisättiin pesugradientti, jonka tarkoituksena oli huuhdella kolonni mahdollisilta komponenttijäännöksistä (eng. *residual*) (esim. kolonniin jääneiltä GFP-komponenteilta).

Selkeimmät signaalit ja toistettavimmat tulokset saatiin käyttäen alla olevassa taulukossa esiteltyjä parametriasetuksia (katso tauluko 2). Kyseisillä asetuksilla suoritettiin ajo myös kaupalliselle GFP-proteiiniliuokselle (pitoisuus 30 µg/ml), jotta pystyttiin vertailemaan itsetuotetusta GFP-liuoksesta saatuja piikkejä standardiliuoksen piikkeihin.

Taulukko 2 HPLC:n ajo-olosuhteet

Gradientti	Aika (min)	A-liuos (%)	B-liuos (%)	C-liuos (%)
	0	65	35	0
	1,0	55	45	0
	1,4	45	55	0
	2	35	65	0
(Pesu)	10,0	0	0	100
Ajon pituus (min)	30 min			
Virtausnopeus	1,0 ml/min	Aallonpituus	280 nm	
Kolonnin lämpötila	40 °C	Injektio-tilavuus	10 µl	

8 TULOKSET JA POHDINTA

Seuraavaksi esitetään opinnäytetyön keskeisimmät tulokset. Ensimmäisenä esitetään dissoluutiotestin olosuhteiden optimointiin ja analyysimenetelmien häiriömittauksiin liittyviä tuloksia. Näiden jälkeen käsitellään varsinaisia tuloksia, eli silikan liukenemisnopeus- ja GFP-proteiinin vapautumisnopeusmääryksiä eri spektrofotometreillä vertailen saatuja tuloksia toisiinsa. Lopuksi esitetään vielä RP-HPLC-UV/Vis -menetelmän kehitystä ja kyseisen menetelmän käyttöönoton mahdollisuutta GFP-proteiinin pitoisuuden analysointiin dissoluutiotestissä.

8.1 *In sink* -rajan tutkiminen ja dissoluutiotestin optimointi

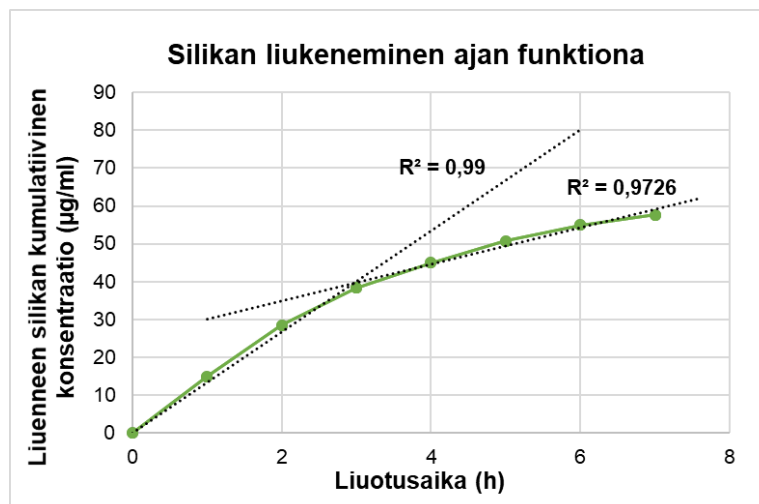
~R100-silikahydrogeelin *in sink* -rajan tutkimisessa havaittiin, että testiastian (Falcon-putken) sentrifugaus asetuksilla 10 000 x G, 37 °C, 15 min ei riittänyt erottelemaan hydrogeeliä Tris-puskurista (painamaan geeli testiastian pohjalle) näytteenottoa varten. Tämä johtui siitä, että käytettävän hydrogeelin tiheys vastasi arviolta läheisesti Milli-Q-veteen valmistetun Tris-puskurin tiheyttä (n. 1 kg/m³). Kyseiset näytteet siis sisälsivät geeliä tai geelin osia, mikä aiheutti häiriötä silikan absorbanssimittauksessa vääristämällä liuenneen silikan pitoisuustuloksia. Näytteiden sentrifugointiin valittiin tämän vuoksi suurempi G-arvo (20 000 x G, 37 °C, 15 min). Kyseistä dissoluutiotestiä varten tulisi tehdä lisää tutkimuksia siitä, soveltuuko valittu sentrifugointi-G-arvo ja -aika opinnäytetyössä käytetylle ~R100-silikahydrogeelille, vai hajottavatko nämä olosuhteet silikageelin rakennetta, jolloin silika liukenee puskuriiin haluttua nopeammin. Lisäksi olisi hyvä tutkia tarkemmin, riittääkö 20 000 x G:n voima todella painamaan tutkittavan geelin testiastian pohjalle, jotta voitaisiin varmistua, ettei silikageelipartikkeleita poistu näytteen mukana tai puskurinvaihdon aikana.

Kuten kappaleessa 6.2.1 mainittiin, ~100-geelin silikan *in sink* -rajan ylittyminen (~30 µg/ml) optimoitiin n. 2 h kohdalle. Jotta testissä saavutettiin silikan vapaa liukeneminen, valittiin geelin injektio-tilavuudeksi 100 µl, Tris-puskurin tilavuudeksi 30 ml ja puskurin vaihto (12 ml kokonaistilavuudesta) uuteen suoritettiin tunnin välein. Kuvio 8 havainnollistaa ~100-silikageelin liukenemisestä tehtyjä mittauksia kumulatiivisena. Teoriassa vapaasti liukenevan silikan kumulatiivisesti lasketun liukenemiskäyrän korrelaatiokerroin (R^2) on 1, eli käyrä on tällöin lineaarinen (katso kuvio 2 s. 18 ja vertaa *in sink*- ja ei-*in*

sink-käyrien muotoja). Todellisuudessa lineaarisuus ei kuitenkaan toteudu biomateriaaleilla täydellisesti, sillä materiaalin liukenemisnopeus hidastuu aina loppuvaiheessa, koska liukenevaa materiaalia on vähän verrattuna alkuvaiheeseen. Silikan liukenemisnopeuden lineaarisuuteen vaikuttaa myös muun muassa materiaalin partikkelikokojakauma ja partikkelimuoto.

Kuvion 8 liukenemiskäyrään piirretyn lineaarisen trendiviivan avulla nähdään, että silikan liukeneminen tapahtuu dissoluutiotestissä lineaarisesti ensimmäisen neljän mittapisteen aikana, mutta kolmen tunnin jälkeen materiaalin liukeneminen hidastuu huomattavasti. Kolmeen ensimmäiseen tuntiin asti silikaa liukenee siis tasaisella nopeudella puskuriin, sillä pisteiden lineaarisen trendiviivan korrelaatiokertoimeksi saadaan $R^2 = 0,99$ (mikä on lähellä suoraviivaisen käyrän arvoa $R^2 = 1$). Silikahydrogeelin liukenemisen hidastuminen alkaa kuitenkin jo aikaisin ja melko voimakkaasti (katso käyrän poikkeavuutta lineaarisesta suorasta), mikä voi johtua esimerkiksi siitä, että materiaalia on jäänyt testiasian seinämiin kiinni tai sitä on poistunut geelipartikkeleina näytteiden mukana tai puskurinvaihdon aikana. Lisäksi syynä voi olla geelipartikkelien kokojakauma. Kuviosta 8 huomataan kuitenkin, että silikan liukeneminen on hidastumisenkin jälkeen tasaista (vertaa neljännessä mittapistestä alkavan piirretyn lineaarisen trendiviivan ja silikan liukenemiskäyrän lineaarisuutta toisiinsa).

Vaikka silikan liukenemiskäyrä ei ole lineaarinen koko testin aikana, voidaan tuloksia käyttää siitä huolimatta, sillä jokainen mittapiste kuviossa on mitattu *in sink*-rajan alapuolella. Tulosten perusteella silikan liukeneminen suoritettussa dissoluutiotestissä tapahtui melko vapaasti kolmeen tuntiin asti, jonka jälkeen liukeneminen hidastui huomattavasti yllämainituista syistä jatkaen tämän jälkeen melko tasaista liukenemistä.



Kuvio 8 *In sink* -rajan optimointi ~R100-silikahydrogeelille

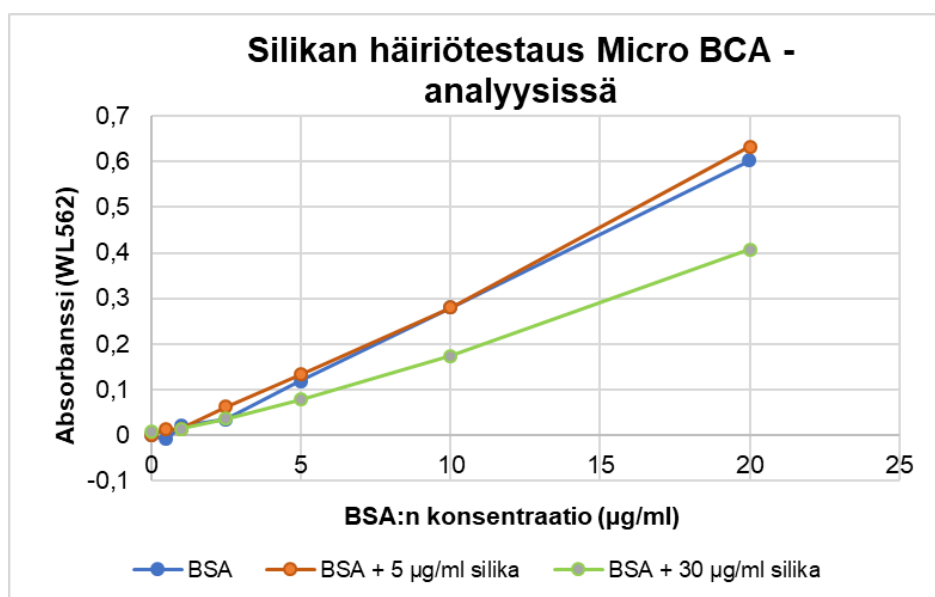
8.2 GFP:n ja SiO₂:n häiriötestaus

Tutkimusryhmän projektiin liittyvän, aiemmin tehdyn opinnäytetyön tutkimuksen mukaan, silika ei häiritse Bradford-analyysiä. Lisäksi kyseisessä opinnäytetyössä on todettu, ettei GFP-proteiini häiritse silikan spektrofotometristä määrittystä. (Vartija 2017) Koska opinnäytetyössä ei selkeästi käy ilmi, missä konsentraatioissa häiriötestit on suoritettu, nämä olisi hyvä toistaa jatkotutkimuksia varten dissoluutiotestin pitoisuusrajoissa ($0 \mu\text{g/ml} < c(\text{SiO}_2) < 30 \mu\text{g/ml}$ ja esim. $0 \mu\text{g/ml} < c(\text{GFP}) < 5 \mu\text{g/ml}$).

Micro BCA -analyysin silika-häiriötestauksessa todettiin, että silika häiritsee kyseistä määrittystä. Taulukossa 3 on esitetty BSA-standardien rinnakkaisnäytteiden keskiarvoihin perustuvat absorbanssitulokset, ja kuvio 9 havainnollistaa silikan aiheuttamaa häiriötä eri pitoisuuksissa. Kuvio 9 nähdään, että SiO₂:n konsentraation ollessa 30 µg/ml mittaustulosten arvot pienenevät huomattavasti, mitä korkeampi albumiinistandardin pitoisuus on. Selkeää häiriötä ei havaittu, kun silikan pitoisuus oli standardisuorassa 5 µg/ml (vertaa kuvion 9 sinistä ja punaista käyrää toisiinsa). Koska dissoluutiotestin näytteet sisälsivät vaihtelevasti ($0 \mu\text{g/ml} < c(\text{SiO}_2) < 30 \mu\text{g/ml}$) aikapisteestä riippuen eri pitoisuuden SiO₂:a, silikan aiheuttamaa häiriötä ei voitu huomioida opinnäytetyön Micro BCA -analyysin GFP-pitoisuuden mittaustuloksissa. Tätä varten tulisi tehdä lisätutkimuksia eri pitoisuuksilla, jotta selviäisi silikan aiheuttaman häiriön suuruus dissoluutiotestin SiO₂-pitoisuuksissa. Koska testit suoritettiin *in sink* -olosuhteissa, silikan pitoisuus oli dissoluutiotestin ajan aikapisteestä riippuen $< 30 \mu\text{g/ml}$.

Taulukko 3 Keskiarvoihin perustuvat silikan häiriötestaustulokset albumiinistandardin (BSA) Micro BCA -analyysissä

SiO ₂ -konsentraatio (µg/ml)	0	5	30
BSA-standardin konsentraatio (µg/ml)	Abs (WL562)	Abs (WL562)	Abs (WL562)
20	0,602	0,633	0,407
10	0,28	0,28	0,174
5	0,119	0,134	0,078
2,5	0,035	0,063	0,037
1	0,021	0,014	0,014
0,5	-0,008	0,013	ei mittaustulosta
0	0	0,001	0,008



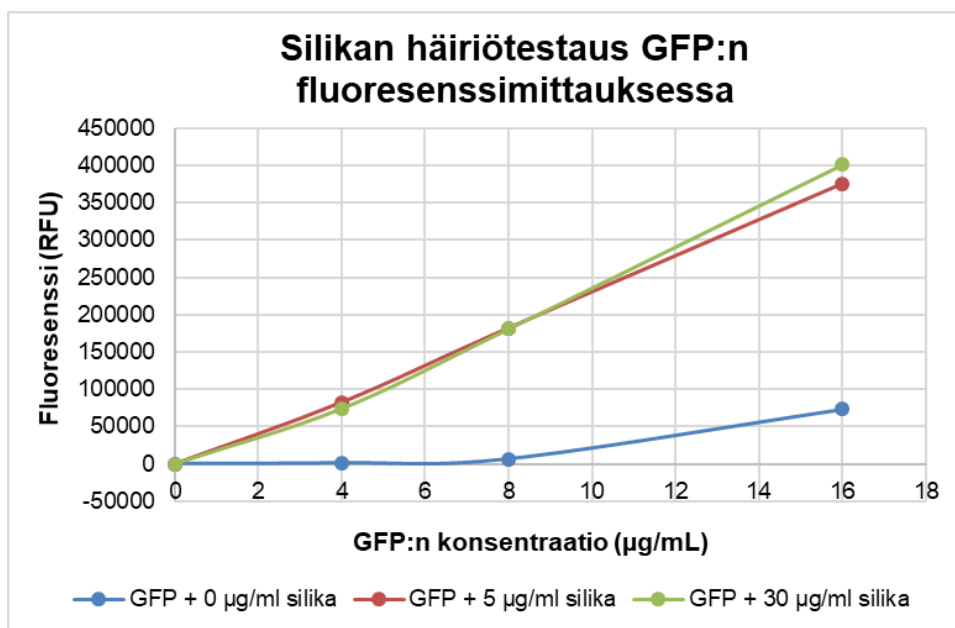
Kuvio 9 Silikan häiriötestaus Micro BCA -analyysissä

Silikan todettiin lisäksi häiritsevän GFP-proteiinin fluoresenssimittausta. Taulukossa 4 on esitetty kyseisen häiriötestin fluoresenssitulokset, joita havainnollistaa kuvio 10. Kuvio 10 nähdään, että SiO₂:n aiheuttama häiriö kasvaa GFP:n pitoisuuden kasvaessa. Lisätutkimukset antaisivat lisää tietoa, mikäli SiO₂ häiritsee mittausta myös dissoluutiotes-tissä vallitsevissa GFP:n konsentraatiopitoisuuksissa (0 µg/ml < c(GFP) < 2 µg/ml). Häiriön suuruus ei näyttäisi olevan riippuvainen silikan pitoisuudesta, sillä silikan konsentraation ollessa 5 µg/ml ja 30 µg/ml fluoresenssimittaus antaa samankaltaiset tulokset.

Silikan aiheuttaman häiriön suuruutta ei pysty taulukon 4 tulosten perusteella arvioimaan, sillä mitattavasta GFP-pitoisuudesta riippuen silika kasvattaa proteiinin mittaustuloksia n. 3 %:sta 70 %:iin asti.

Taulukko 4 Keskiarvoihin perustuvat silikan häiriötetaustulokset GFP:n fluoresenssimittauksessa

SiO ₂ -konsentraatio (µg/ml)	0	5	30
GFP-konsentraatio (µg/ml)	<i>Blank-corrected</i> RFU	<i>Blank-corrected</i> RFU	<i>Blank-corrected</i> RFU
16	73871,25	375599,25	401272,75
8	6571,75	182062,75	180858,00
4	1042,25	82445,75	74105,50
0	4,25	0,00	13,25



Kuvio 10 Silikan häiriötetaus GFP:n fluoresenssimittauksessa (keskiarvo)

GFP-proteiinin kiinnittäminen silika-nanopartikkelien pintaan on todettu parantavan proteiinin fluoresenssi-intensiteettiä. Proteiinin fluoroforien säteilyominaisuuksien muutokset johtuvat mahdollisesti proteiinin (fluoroforien) ja kapselointimateriaalin välisistä pintavuorovaikutuksista, joista aiheutuu häiriötä esimerkiksi fluoresenssimittauksessa (ns. matriisiefekti). (Kumar 2017) (Krajnik et al. 2013)

Micro BCA- ja fluoresenssimittauksen silika-häiriötestausta varten tulisi tehdä lisätutkimuksia siitä, ovatko silikan aiheuttamat häiriöt lineaarisia, kuten opinnäytetyön tuloksista (katso kuviot 9 ja 10) voisi päätellä. Mikäli ne ovat, häiriöt voisi korjata saaduista absorbanssi- ja fluoresenssituloksista korjauskertoimella.

8.3 Tris-puskurin häiriötestaus

Tris-puskurin ei todettu häiritsevän silikan spektrofotometrillä määrittystä, sillä referenssinolla (Milli-Q-vesi) ja Tris-puskuri antoivat samankaltaiset tulokset, riippuen sisälsikö näyte puskuria (samassa suhteessa kuin Milli-Q-vettä) vai ei. Tris-puskuri ei myöskään häirinnyt fluoresenssimittauksia, sillä puskuriliuoksella ei ole fluoresoivaa ominaisuutta.

Tris-puskurin todettiin aiheuttavan suuremman tausta-absorbanssin Micro BCA -analyysissä kuin nollanäytteenä käytetyn Milli-Q-veden, mikä kasvatti absorbanssitulosten arvojen suuruutta. Micro BCA -analyysikitin työohjeen (Thermo Scientific 2015) mukaan on kuitenkin testattu, että kitin työliuos on yhteensopiva käytettävän Tris-puskurin (0,05 M) kanssa. Tämän vuoksi dissoluutiotestissä vapautuneen GFP:n absorbanssituloksista vähennettiin Tris-puskurin tausta. Lisäksi Tris aiheutti Bradford-kokonaisproteiinianalyysissä suuremman tausta-absorbanssin kuin käytettävä nollanäyte (Milli-Q-vesi). Tris-puskurin aiheuttamaa taustaa ei kuitenkaan voitu vähentää mittauksen suorituksen jälkeen GFP:n vapautumismääritystuloksista, sillä ei ole tutkittu, onko häiriö lineaarista.

Tris-puskurin aiheuttamat tausta-absorbanssit on esitetty liitteessä 12.

8.4 Silikahydrogeelin liukenemisnopeus

~R100-silikahydrogeelin liukenemisnopeus määritettiin ruiskujen 1 (rinnakkaistesteistä Falcon A ja B, geelautumisaika 20 h) ja 2 (rinnakkaistesteistä Falcon C ja D, geelautumisaika 7 d) liuenneen silikan määrästä 7 h:n ajalta. Opinnäytetyössä käytetyt ruiskut 1 ja 2, sekä Falconit A – D on määritelty tarkemmin sivuilla 42 – 43 ja kuviossa 7. Taulukoiden 5 – 8 SiO₂:n konsentraatiot kuvaavat liuenneen silikan määrää tunnin aikana näyttekäsittelyn ja puskurivaihdon laimennoskorjauksen jälkeen. Liuenneen silikan todellinen määrä jokaiselta tunnilta saadaan kuitenkin laskemalla tulokset kumulatiivisesti.

Taulukko 5 Ruiskun 1 (Falconin A) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset

Falcon	Näyte-aika (h)	Liuenneen SiO ₂ :n konsentraatio näytekäsittelyn ja puskurivaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
A	1	21,956	658,688	22,370	22,370
	2	15,964	478,909	16,265	38,635
	3	8,064	241,932	8,216	46,852
	4	5,012	150,373	5,107	51,958
	5	3,648	109,440	3,717	55,675
	6	2,212	66,354	2,253	57,929
	7	2,355	70,662	2,400	60,329

Taulukko 6 Ruiskun 1 (Falconin B) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset

Falcon	Näyte-aika (h)	Liuenneen SiO ₂ :n konsentraatio näytekäsittelyn ja puskurivaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
B	1	16,211	486,341	16,517	16,517
	2	12,768	383,041	13,009	29,526
	3	8,459	253,781	8,619	38,145
	4	3,935	118,058	4,009	42,154
	5	3,074	92,206	3,131	45,286
	6	3,181	95,437	3,241	48,527
	7	1,242	37,270	1,266	49,793

Taulukko 7 Ruiskun 2 (Falconin C) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset

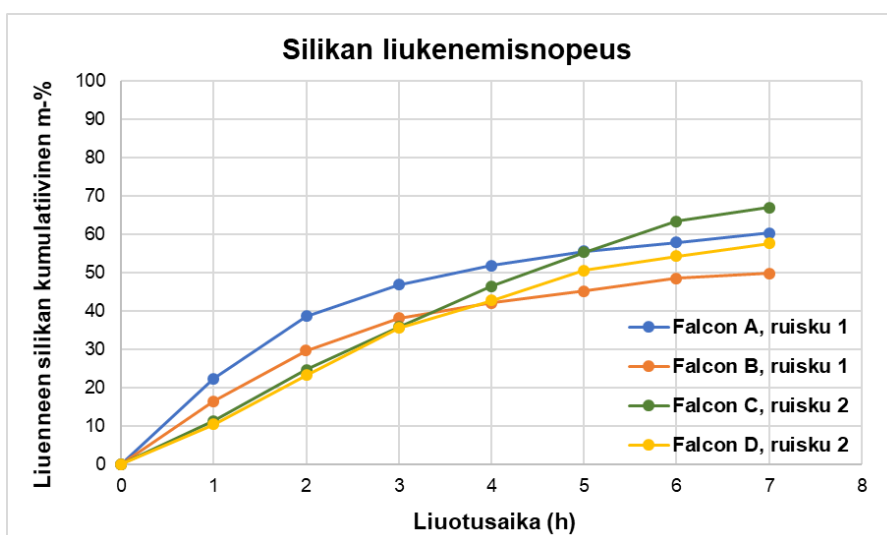
Falcon	Näyte-aika (h)	Liuenneen SiO ₂ :n konsentraatio näytekäsittelyn ja puskurivaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
C	1	11,185	335,538	11,396	11,396
	2	13,091	392,735	13,338	24,734
	3	10,973	329,182	11,180	35,913
	4	10,398	311,948	10,594	46,508
	5	8,747	262,398	8,912	55,419
	6	7,849	235,469	7,997	63,416
	7	3,504	105,132	3,570	66,987

Taulukko 8 Ruiskun 2 (Falconin D) silikahydrogeelin liukenemisnopeustulokset

Falcon	Näyte-aika (h)	Liuenneen SiO ₂ :n konsentraatio näytekäsittelyn ja puskurivaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
D	1	10,287	308,608	10,481	10,481
	2	12,553	376,578	12,789	23,270
	3	12,158	364,729	12,387	35,657
	4	7,023	210,694	7,156	42,813
	5	7,705	231,160	7,851	50,663
	6	3,648	109,440	3,717	54,380
	7	3,289	98,669	3,351	57,731

Liuenneen silikan määrä massaprosentteina laskettiin liuenneen silikan massasta suhteutettuna injektoitavan geelin (100 µl) sisältävän silikan kokonaismassaan. Liitteessä 13 on esitetty tarkemmin silikan mittaustulokset, ja liitteessä 14 on esimerkki silikapitoisuuden laskemisesta näytteessä.

Kuviossa 11 on havainnollistettu silikahydrogeelin ruiskujen 1 ja 2 geelien liukenemisnopeuksia ajan funktiona, jossa jokaisen tunnin liennut silikan määrä massaprosentteina on laskettu kumulatiivisesti. Kuvioissa 12 ja 13 on esitetty vastaavat liukenemisnopeudet ruisku- ja rinnakkaistestikohtaisesti.



Kuvio 11 ~R100-silikahydrogeelin liukenemisnopeus (ruiskut 1 ja 2)

Kuviosta 11 nähdään, että 7 h:n jälkeen silikahydrogeelistä oli liennut testistä riippuen n. 50 – 65 %. Tämän perusteella injektoitava geeli liukenisi puskuriin keskimäärin n. 10 – 14 h:n aikana. Ruiskujen 1 ja 2 rinnakkaistuloksista laskettiin lisäksi keskiarvot, joiden perusteella silikahydrogeelin kokonaisliukenemisaika oli ruiskun 1 geeleillä (Falcon A ja B) n. 12,7 h ja liukenemisnopeus 7,87 m-%/h (katso taulukko 9). Vastaavat keskiarvoon perustuvat tulokset ruiskun 2 geeleille (Falcon C ja D) olivat n. 11,2 h ja n. 8,91 m-%/h. Tulosten perusteella ruiskun 2 geelit liukenivat dissoluutiopuskuriin ruiskun 1 geelejä nopeammin 7 h aikana. Koska liukenemiskäyrät eivät ole lineaarisia eli silikan liukenemisnopeus vaihtelee ajasta riippuen, lasketut liukenemisnopeudet ja kokonaisliukenemisajat ovat vain arvioita, jotka perustuvat mittaustulosten keskiarvoihin 7 h:n ajalta.

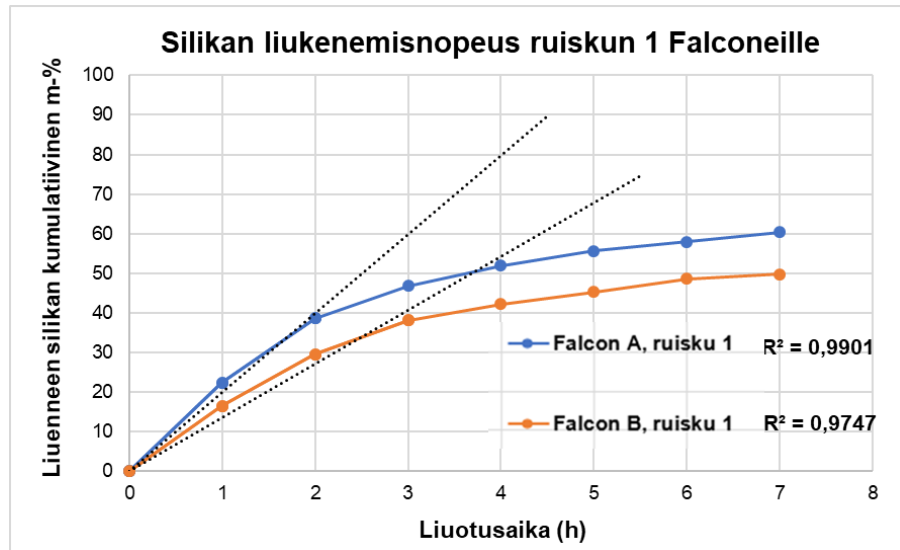
Liukenemisnopeuden ja geelin kokonaisliukenemisajan laskuesimerkit esitetään liitteessä 15.

Taulukko 9 Ruiskujen 1 ja 2 silikahydrogeelin keskiarvoihin perustuvat liukenemisnopeudet ja hydrogeelin kokonaisliukenemisajat

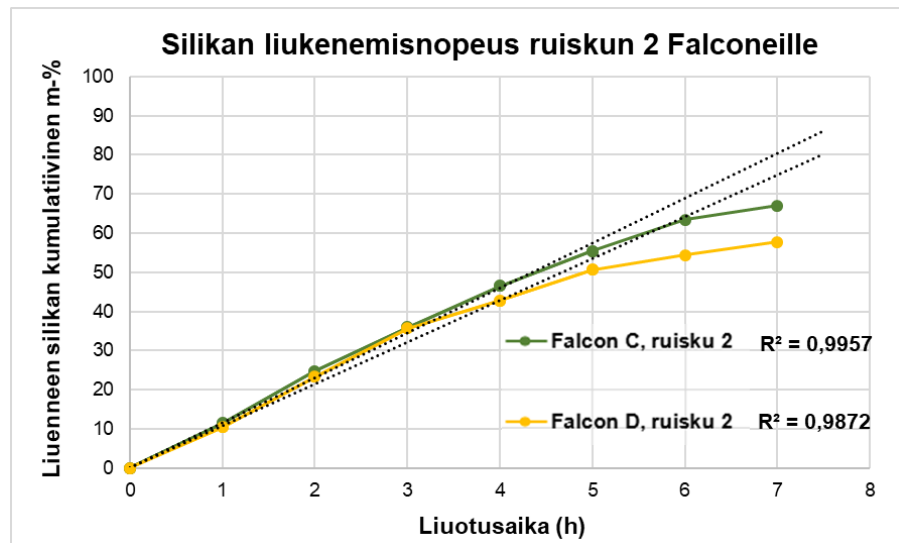
Ruisku	1		1	2		2
Falcon	A	B	A:n ja B:n keskiarvo	C	D	C:n ja D:n keskiarvo
Dissoluutiopuskuriin lienneen SiO ₂ :n määrä 7 h:n aikana (m-%)	60,33	49,79	55,06	66,99	57,73	62,36
SiO ₂ :n liukenemisnopeus (m-%/h)	8,62	7,11	7,87	9,57	8,25	8,91
Geelin kokonaisliukenemisaika (h)	11,60	14,06	12,71	10,45	12,13	11,23

Kuvion 11 liukenemisnopeuskäyristä havaitaan, että silikan liukeneminen hidastuu merkittävän aikaisin, n. 40 – 50 % jälkeen, geelistä riippumatta. Kuvioissa 12 ja 13 on esitetty vastaavat liukenemisnopeudet ruisku- ja rinnakkaistestikohtaisesti, joissa silikamateriaalin liukenemisen hidastuminen erottuu selkeämmin piirrettyjen lineaarisuorien avulla. Kun verrataan kyseisten kuvioiden silikan liukenemisnopeuskäyrien muutosta lineaari-regressioon, nähdään, että samaa trendiä jatkettaessa geelien liukeneminen hidastuisi voimakkaasti käyrien lähestyessä 100 % (lienneen silikan määrästä). Tällöin hidastumisessa olisi kyse todennäköisesti siitä, että silikaa on poistunut näytteiden mukana tai puskurivaihdon aikana enemmän kuin mitä mittaustulokset näyttävät. Lisäksi silika on voinut tarttua Falcon-testiastian seinämiin, kuten aikaisemmin jo mainittiin, jolloin silikapartikkeleiden liukenemispinta-ala pienentyy ja liukeneminen hidastuu huomattavasti. Hidastumiseen vaikuttaa myös mm. liukenevan silikageelipartikkeleiden rakenne ja

muoto. Lisäksi on huomioitava, että materiaalin liukenemisnopeus hidastuu aina loppuvaiheessa, koska liukenevaa materiaalia on vähän verrattuna alkuvaiheeseen.



Kuvio 12 Silikahydrogeelin liukenemisnopeuden lineaarisuuden tutkiminen geeliruiskun 1 Falconeille



Kuvio 13 Silikahydrogeelin liukenemisnopeuden lineaarisuuden tutkiminen geeliruiskun 2 Falconeille

Verrattaessa kuvioden 12 ja 13 käyriä toisiinsa voidaan todeta, että ruiskun 2 rinnakkaisten geelien liukenemisnopeus pysyy tasaisena huomattavasti pidempään kuin ruiskun 1 geelien: Falconien C ja D silikageelien liukenemisnopeus säilyy lineaarisena 5 – 6 tunnin ajan, eli lähes koko testin suorituksen ajan, kun taas Falconien A ja B geelien

liukenemisnopeuden lineaarisuus säilyy vain 2 – 3 tuntia. Liukenemiskäyriä tarkastellessa voidaan lisäksi havaita, että ruiskun 1 geelien liukeneminen ensimmäisinä tunteina on nopeampaa kuin ruiskun 2 geelien, sillä liukenemisnopeuskäyrä kasvaa alussa jyrkemmin. Tämä saattaisi johtua siitä, että ruiskun 1 silikahydrogeelit eivät ole geelautuneet tarpeeksi 20 h:n aikana, minkä vuoksi ne eivät ole yhtä stabiileja dissoluutiopuskurissa kuin Falconien C ja D geelit, jotka ovat geelautuneet 7 päivän ajan. Ruiskun 1 geelien silikapartikkelien verkosto ei ole ehkä ehtinyt muodostumaan lopulliseen muotoonsa, minkä vuoksi rakenne oli ruiskun 2 rakennetta heikompi. Tämä selittäisi Falconien A- ja B-testien kohdalla silikamäärän äkillisen liukenemisen puskuriin ensimmäisten tuntien aikana, jota seuraa nopea liukenemisen hidastuminen. Koska ruiskujen 1 ja 2 geelit olivat samasta soolierästä valmistettuja, voidaan unohtaa geelien muiden ominaisuuksien (esim. pH-erot, valmistusprosessin aikana syntyneet mahdolliset rakenteelliset ja fysikaalis-kemialliset muutokset, lämpötilan (RT) aiheuttamat muutokset etanolin haihdutuksen tai säilytyksen aikana) vaikutukset tulosten poikkeavuuteen, sillä niitä ei pitäisi olla, jos geelien oletetaan olevan homogeenisiä. Lisäksi dissoluutiotestit ryhmien geelleille ja analyysimittaukset näytteille suoritettiin vastaavanlaisesti. Geelien valmistuksen yhteydessä suoritettu soolin pipetointi Pasteur-pipetillä lääkeruiskuihin on kuitenkin voinut muuttaa geeliruiskujen 1 ja 2 homogeenisyyttä ja muita ominaisuuksia, esimerkiksi rikkomalla geelilytvän soolin rakennetta.

Ruiskun 1 rinnakkaisten (Falcon A ja B) ja ruiskun 2 rinnakkaisten (Falcon C ja D) geelien keskinäiset liukenemisnopeuserot oletetaan johtuvan mahdollisista pipetointivirheistä ja/tai esim. silikapartikkelien epäjakautumisesta ruiskuissa. Koska ruiskuja säilyttiin geelautumisen aikana liikkumattomana ruiskusuutin alaspäin, silikapartikkelit (ja kapseloitu GFP) ovat voineet pakkautua epätasaisesti painovoiman vaikutuksesta ruiskun toiseen päähän. Tällöin dissoluutiotestin tulokset ovat saattaneet vääristyä hieman. Tulosten vääristymisen poissulkemisen kannalta geelautuvia lääkeruiskuja tulisi säilyttää uusia testejä ajatellen esim. tasaisesti pyörivässä järjestelmässä, jossa ympäristön lämpötilan hallinta on mahdollista.

8.5 GFP:n teoreettinen vapautumisnopeus

Kun proteiinin kapseloituminen silikahydrogeeliin on hyvä, silikan liukenemisnopeus määrittää GFP:n vapautumisnopeuden ajan funktiona. GFP:n teoreettinen vapautumis-

nopeus laskettiin SiO₂-mittaustulosten keskiarvoon perustuvan liuenneen silikan määrästä (katso liite 16). Proteiinin vapautumisnopeuden määrittämiseen käytettiin ruiskun 2 geelin liukenemistulosten (Falcon C ja D) keskiarvoa, sillä kyseiset tulokset olivat todellisempia ja luotettavampia geelin stabiilisuuden ja liukenemiskäyrän lineaarisuuden ansiosta ruiskun 1 geeliin tuloksiin verrattuna.

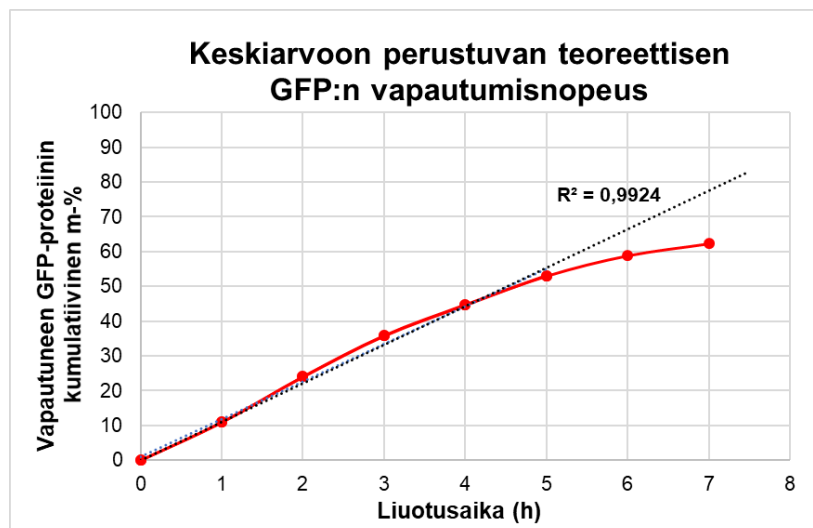
GFP-proteiinia vapautuva määrä on liuenneen silikan massasta 5 %. Kyseisen tiedon perusteella ratkaistiin teoreettisesti vapautuneen GFP:n massa kumulatiivisesti massaprosentteina 7 h:n ajalta (eli vapautuneen GFP:n määrää verrattiin injektoitavan geelin kokonais-GFP-määrään), jotta sen vapautumisnopeutta voitiin tutkia. Lisäksi laskettiin teoreettisesti vapautuneen GFP:n pitoisuus 7 h:n ajalta. Taulukoissa 10 ja 11 sekä kuviossa 14 on esitetty silikan liukenemisnopeuden keskiarvoon perustuvan GFP-proteiinin teoreettinen vapautuminen. GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden määrittämiseen liittyvät laskut löytyvät liitteestä 16.

Taulukko 10 Silikan liukenemisnopeuden keskiarvoon (ruisku 2) perustuvan GFP-proteiinin teoreettinen vapautuminen

Näyte-aika (h)	Keskiarvoon (ruisku 2) perustuvan liuenneen SiO ₂ :n massa puskurinvaihdon ja laimennoskorjausten jälkeen (µg)	Vapautuneen GFP:n massa teoriassa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% teoriassa (%)	Vapautuneen GFP:n m-% kumulatiivisena, teoriassa (%)
1	322,073	16,101	10,936	10,936
2	384,657	19,230	13,062	23,998
3	346,956	17,345	11,781	35,779
4	261,321	13,064	8,874	44,653
5	246,779	12,337	8,380	53,033
6	172,455	8,621	5,856	58,889
7	101,900	5,094	3,460	62,349

Taulukko 11 Silikan liukenemisnopeuden keskiarvoon perustuvan vapautuneen GFP-proteiinin pitoisuus teoriassa

Näyte-aika (h)	Vapautuneen GFP:n massa teoriassa (µg)	Vapautuneen GFP:n pitoisuus teoriassa (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n pitoisuus kumulatiivisena (µg/ml)
1	16,101	0,537	0,537
2	19,230	0,641	1,178
3	17,345	0,578	1,756
4	13,064	0,435	2,191
5	12,337	0,411	2,603
6	8,621	0,287	2,890
7	5,094	0,170	3,060



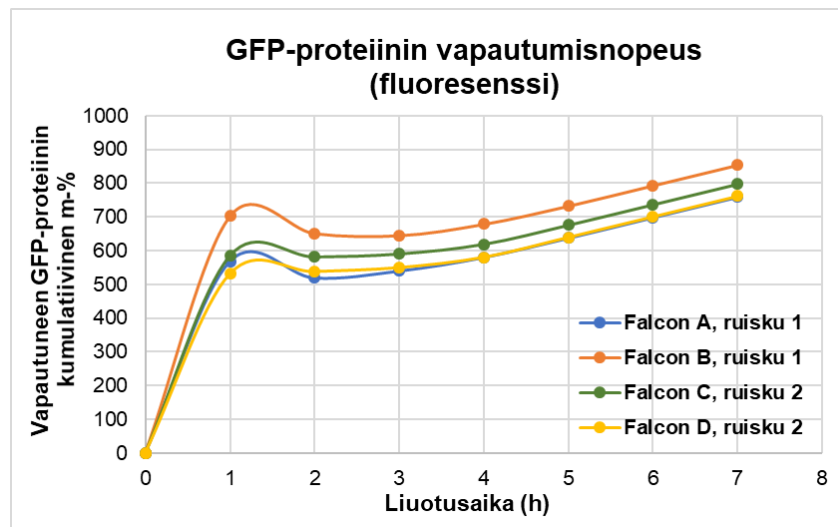
Kuvio 14 GFP-proteiinin teoreettinen vapautumisnopeus

~R100 SiO₂-geelin liukenemisnopeustuloksiin perustuvan laskennallisen eli teoreettisen GFP-proteiinin vapautumisnopeudeksi saatiin ~8,91 m-%/h, eli pitoisuuksina GFP:tä vapautuisi keskimäärin ~0,437 µg/ml joka tunti. Koska ruiskun 2 geelien keskimääräiseksi kokonaisliukenemisajaksi saatiin ~11,23 h (katso taulukko 9 ja liite 15), vapautuneen proteiinin loppukonsentraatio olisi geelin kokonaisliukenemisen jälkeen ~4,90665 µg/ml (katso liite 16). Verrattaessa saatua loppukonsentraatiotulosta teoreettisesti lasketun vapautuneen GFP:n kokonaiskonsentraatioarvoon dissoluutiotestissä (~4,90745 µg/ml, katso liite 2), huomataan, että arvot vastaavat lähes toisiaan. Silikan liukenemisnopeuden perustuvan GFP:n teoreettisen vapautumistuloksen perusteella silikan häviämistä ei ole tapahtunut ruiskun 2 geelien dissoluutiotestin aikana, tai se on erittäin vähäistä.

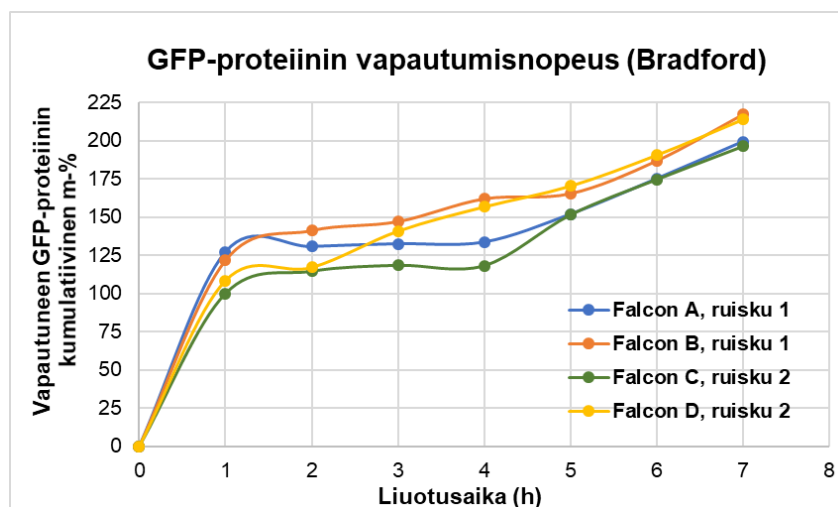
8.6 GFP:n vapautumisnopeuden määrittäminen eri analyysimenetelmillä

Kuvioissa 15, 16 ja 17 on esitetty GFP:n vapautumisnopeusmittaustulokset kumulatiivisena ajan funktiona eri menetelmillä mitattuna. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteessä 17. Kuvioista nähdään, että mittaustulokset eroavat toisistaan selkeästi monin eri tavoin: mm. vapautumisnopeudeltaan (vertaa eri käyrien jyrkkyyttä ajan suhteessa), vapautuneen proteiinin määrältä sekä lineaarisuudeltaan. Mainitut eroavaisuudet johtuvat suurimmaksi osaksi analyysihäiriöistä, jotka väärentävät mittaustuloksia. Lisäksi tuloksiin vaikuttaa käytetyt standardisuorayhtälöt. Voidaan esimerkiksi huomata, että vapautu-

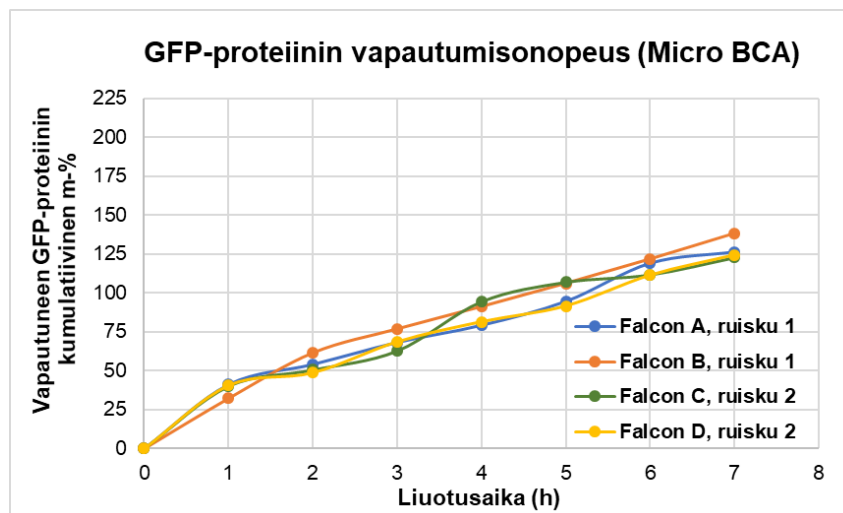
neen GFP:n määrä jokaisen analyysin tuloksissa on kaksin- tai moninkertainen teoreettiseen GFP:n tuloksiin verrattuna. Vapautuneen proteiinin määrien vertailua ja analyysihäiriöiden sekä standardisuoran vaikutusta menetelmäkohtaisesti käsitellään tarkemmin seuraavassa luvussa. Lisäksi GFP:n vapautumismittaustuloksissa esiintyy ruiskukohtaisia (rinnakkaisnäytekohtaisia) eroja enemmän (vertaa Falcon A:n ja B:n käyriä toisiinsa ja Falcon C:n ja D:n) kuin silikan määrittämisessä. Kuviota 17 tarkastelemalla havaitaan, että Micro BCA -analyysin mittaustulosten keskinäinen eroavaisuus on kuitenkin pientä.



Kuvio 15 GFP-proteiinin vapautumismittaustulokset kumulatiivisena ajan funktiona fluoresenssimittauksessa



Kuvio 16 GFP-proteiinin vapautumismittaustulokset kumulatiivisena ajan funktiona Bradford-mittauksessa



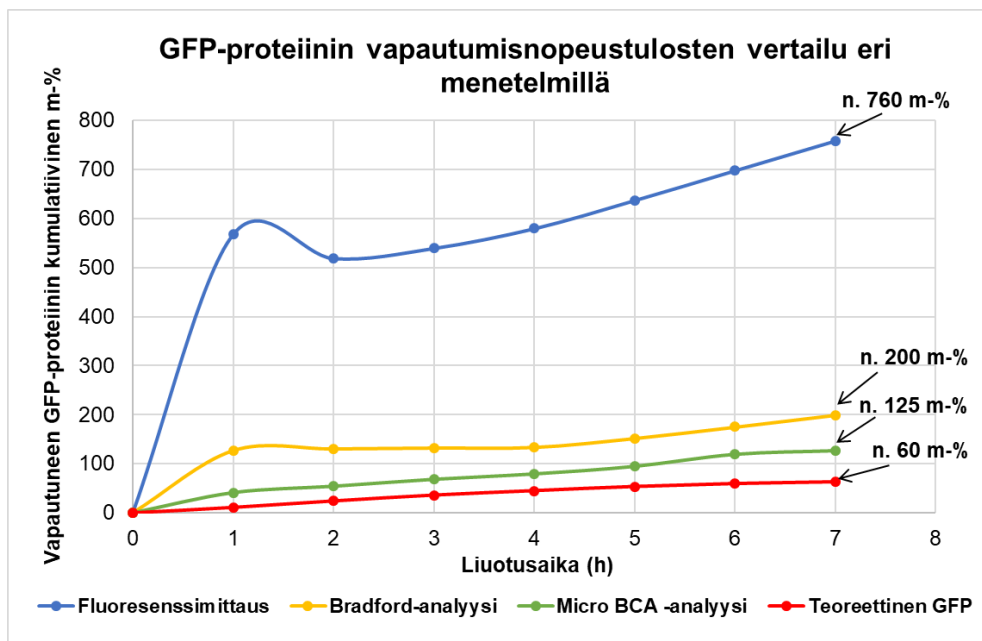
Kuvio 17 GFP-proteiinin vapautumismittaukset kumulatiivisena ajan funktiona Micro BCA -mittauksessa

Koska kumulatiivisessa vapautumisessa ei voi tulla laskua, kuvion 15 fluoresenssitulokset eivät ole luotettavia. Vapautumiskäyrien lasku johtuu virheellisistä tuloksista, joihin on vaikuttanut analyysiä häiritsevät tekijät ja tuloksiin käytetty standardisuora. Fluoresenssimittauksia käsitellään tarkemmin luvussa 8.6.1.

Koska analyysimenetelmien mittaukset ovat vääristyneet ja vapautuneen proteiinin määrä on kaksin- tai moninkertainen teoreettiseen määrään verrattuna, GFP:lle ei voida määrittää tulosten perusteella vapautumisnopeutta menetelmäkohtaisesti.

8.6.1 Analyysimenetelmien tulosten vertailu

Kuviossa 18 on esitetty keskiarvo eri menetelmillä mitatuista GFP:n vapautumistuloksista sekä GFP:n teoreettinen vapautuminen (teoreettinen vapautuminen perustuu oletukseen, jossa proteiinin kapseloituminen oletetaan olevan hyvä). Kuvioista nähdään, että proteiinin vapautumismittaukset eroavat paljon proteiinin teoreettisesta vapautumisesta (vrt. punaista käyrää muihin väreihin). Vapautuneen GFP:n määrä teoreettisesti 7 h:n liuotuksen jälkeen on n. 60 % (~62,3 m-%, ruisku 2), vastaava keskiarvoon perustuva tulos on Micro BCA -analyysillä yli kaksinkertainen, Bradfordilla yli kolminkertainen ja fluoresenssimittauksella lähes 13-kertainen.



Kuvio 18 GFP-proteiinin vapautumistulosten vertailu eri menetelmillä. Teoreettisen GFP:n vapautumista kuvastaa ruiskun 2 geelien keskiarvoon perustuvan vapautumisen arvio

Kuvion 18 fluoresenssimittaustulosten korkeat arvot johtuvat silikan aiheuttamasta häiriöstä GFP-mittauksessa (katso luku 8.2). Koska häiriön suuruutta ei pystytty häiriömittausten perusteella arvioimaan, sitä ei ole poistettu fluoresenssituloksista. Lisäksi tuloksiin vaikuttaa käytetty standardisuorayhtälö (käytetään tulosten laskemisessa), jonka suoritus ei onnistunut (katso liite 11). Kyseisen standardisuoran korrelaatiokertoimeksi saatiin $R^2 = 0,8085$ (raja-arvona voidaan pitää esim. $R^2 = 0,90$), mikä kertoo standardisuoran yhtälön epäluotettavuudesta. Bradford- ja Micro BCA -analyysien standardisuorien yhtälöiden luotettavuus on sen sijaan hyvä (katso liitteet 8 ja 10).

Vaikka Tris-puskurin aiheuttama (arvoja kasvattava) häiriö on poistettu Micro BCA -analyysin tuloksista, kyseisellä menetelmällä saadut vapautumismittaustulokset ovat edelleen todellisia arvoja korkeampia (katso kuvio 18). Tutkimusten edetessä Tris-puskurin aiheuttamaa taustaa voisi vähentää MA:MB:MC -työliuoksen suhteita muuttamalla menetelmän työohjeiden mukaisesti (Thermo Scientific 2015). Kuten luvussa 8.2. todettiin, Micro BCA -menetelmää häiritsee puskurin lisäksi silika. Koska kyseisen häiriön aiheuttama suuruus on tuntematon, sitä ei poistettu tuloksista. Saadut proteiinin vapautumistulokset muistuttaisivat arviolta lähemmin teoreettisen GFP:n arvoja, mikäli silikamateriaalin aiheuttama arvoja alentava häiriö huomioitaisiin tuloksissa. Jatkotutkimuksia varten

menetelmälle tulisi tehdä lisää häiriötestejä erityisesti SiO₂-illa, jotta kyseinen häiriö saataisi poistettua mittaustuloksista.

Dissoluutionäytteiden esikäsittely tuotti ongelmia Micro BCA -menetelmässä. GFP-näytteen inkubointi ennen mittauksen suoritusta aiheutti tuntemattomasta syystä näyteliuokseen kuplia, mikä saattoi vääristää tuloksia. Mittauksessa spektrofotometrin lähettämä valosäde läpäisee kuplat, mutta laite ei tällöin mittaa näytettä tarkasti.

Bradford -analyysillä mitattujen vapautuneen GFP-pitoisuuksien tuloksista ei voitu poistaa suoraan Tris-puskurin aiheuttamaa taustaa, koska häiriön lineaarisuutta ei ole tutkittu. Tämän vuoksi mittaustulokset poikkesivat todellisista arvoista.

Koska fluoresenssi-, Bradford-, Micro BCA -tulokset ovat vääristyneet, ja koska silikan aiheuttamien häiriöiden lineaarisuutta ei ole tutkittu (eikä siksi silikahäiriötä voida poistaa mittaustuloksista), on analyysimenetelmien tulosten vertailu GFP:n vapautumisesta lähes mahdoton suorittaa.

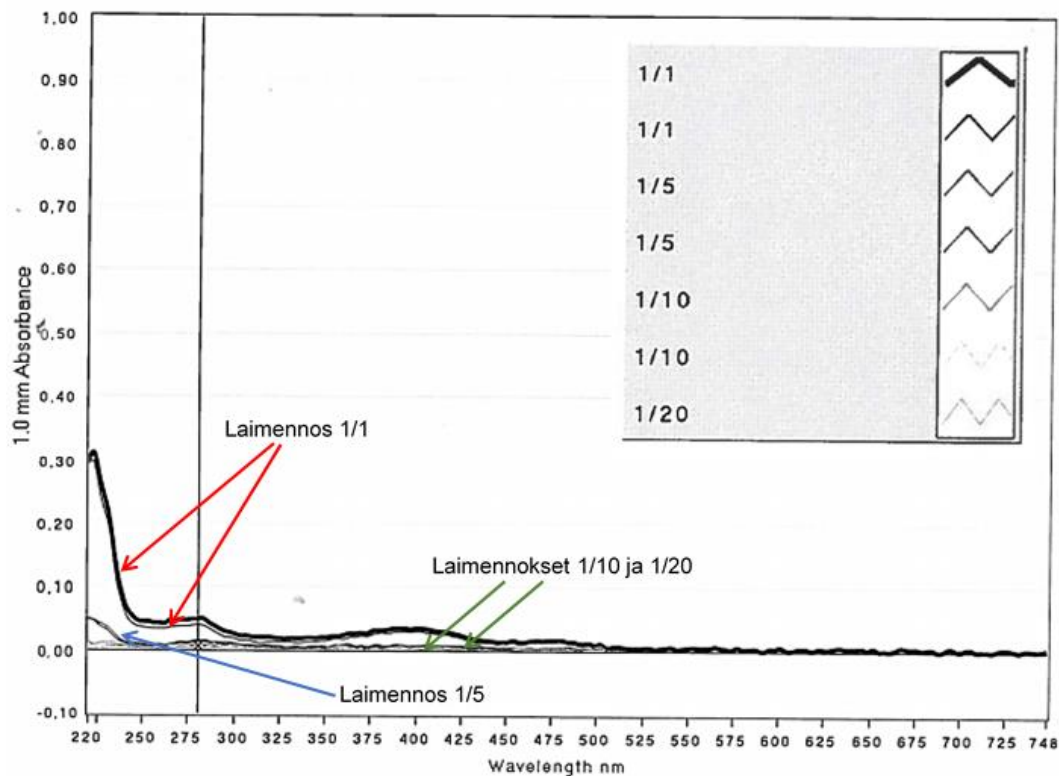
Micro BCA:lla saadut GFP:n vapautumismittaustulokset olivat kaikkein lähimpänä todellisia arvoja. Analyysimenetelmien herkkyyden perusteella voidaan kuitenkin todeta, että käytettävistä menetelmistä Micro BCA:n tulisi olla herkin (opinnäytetyön lineaarinen mittaustulosalue 0,5 – 20 µg/ml katso luku 5.3), minkä vuoksi se soveltuisi parhaiten vapautuvan GFP:n mittaamiseen dissoluutiotestissä, sillä testissä vallitsevat GFP-pitoisuudet ovat matalat ($0 \mu\text{g/ml} < c(\text{GFP}) < 2 \mu\text{g/ml}$). Suorittaessa standardisuoran mittausta Micro BCA -määrittystä varten, huomattiin kuitenkin, ettei käytettävä spektrofotometri (Shimadzu, UV-1800) anna toistuvia ja tarkkoja mittaustuloksia alle 1 µg/ml:n konsentraatioissa. Jotta tulokset olisivat luotettavia menetelmän lineaarisella mittaustulosalueella, tulisi GFP:n määrittämisessä käyttää mahdollisesti herkempää, menetelmälle sopivampaa spektrofotometriä.

8.7 Tris-puskurin häiriötestaus NanoDrop:lle (UV/Vis) ja RP-HPLC-UV/Vis:lle

NanoDrop:n ja RP-HPLC-UV/Vis häiriötestauksessa todettiin, ettei GFP-liuoksen sisältämä (ja dissoluutiotestissä käytetty) Tris-puskuri häiritse määrittämiä (HPLC:ssa aallonpituuksilla 280 nm ja 485 nm), sillä kyseisen puskurin mittaustulokset eivät eroa nollanäytteenä käytetyn Milli-Q-H₂O:n tuloksista.

8.8 GFP-liuosten määrittäminen NanoDrop:illa (UV/Vis)

Kuviossa 19 on esitetty NanoDrop:illa (UV/Vis) saatuja mittaustuloksia kaupallisen GFP-proteiininliuoksen laimennoksista (1/1, 1/5, 1/10 ja 1/20) aallonpituudella 220 – 750 nm. Kuvion perusteella kyseinen GFP-liuos antaisi ainoastaan laimentamattomana (300 µg/ml) selkeän piikin aallonpituudella 220 nm (max. Abs ~0,32). Lisäksi alueella 250 – 300 nm ja 375 – 425 nm näkyy poikkeavuutta nollatasosta (sekä 220 nm:ssä laimennoksen 1/5 kohdalla), mutta loivien piikkien (max. Abs ~0,05) vuoksi niitä ei voi pitää luotettavina tuloksina. Laitteen herkkyys ei siis riittänyt laimennosten 1/5, 1/10 tai 1/20 määrittämiseen.

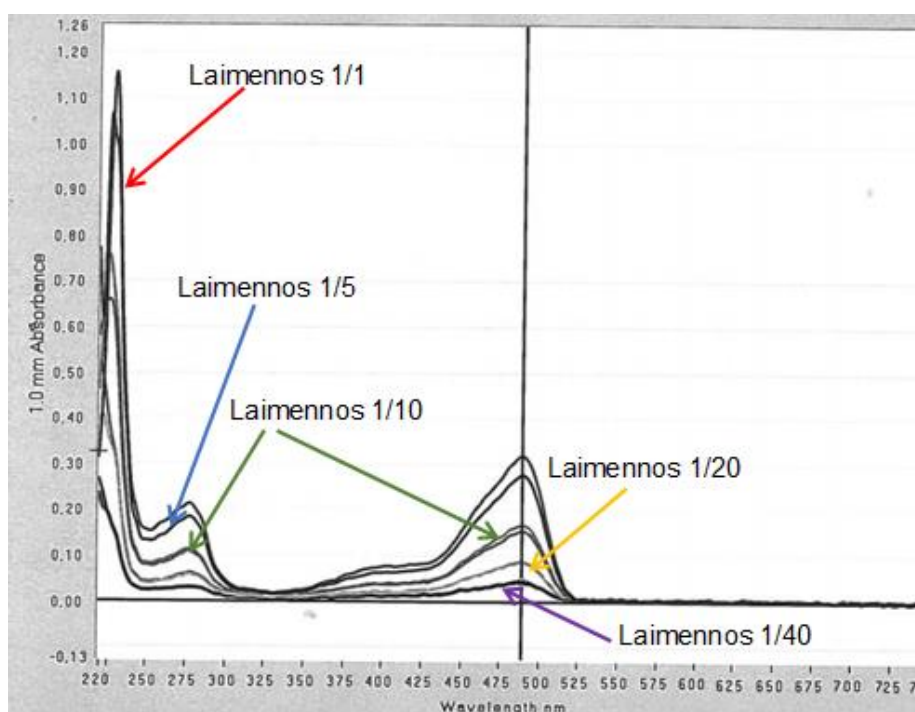


Kuvio 19 Kaupallisen GFP-liuoksen absorbanssitulokset laajan spektrin mittauksessa (NanoDrop, UV/Vis)

Vastaava mittaus suoritettiin itsetuotetun GFP-proteiiniliuoksen laimennoksille (1/1, 1/5, 1/10, 1/20 ja 1/40), jonka tuloksia kuvastaa kuvio 20. Kyseisen liuoksen proteiinipitoisuus (~15000 µg/ml) oli 50-kertainen kaupallisen GFP-liuoksen konsentraatioon verrattuna. Tulokset ovat epäluotettavia, sillä saadut itsetuotetun proteiiniliuoksen absorbanssitulokset eivät ole 50-kertaiset standardiliuokseen nähden (katso kuvio 20). Kyseinen GFP-

liuos antaa kuitenkin piikit samoilla absorbanssialueilla kuin kaupallinen GFP (vertaa kuvioiden 19 ja 20 käyriä toisiinsa). Koska kaupallisen tai itsetuotetun GFP:n absorptiomaksimeja ei tarkasti tiedetä, valittiin GFP:n määrittämiseen HPLC-menetelmän kehityksessä aallonpituudet 280 nm (jota käytetään yleisesti proteiinien määrittämiseen) sekä 485 nm (jonka valinta suoritettiin GFP-liuosten antamien piikkien perusteella).

Saatujen tulosten absorbanssiarvoihin ei ole kuitenkaan suoraan luottamista, sillä opinäytetyön käytännöntyön osuudessa ei tutkittu NanoDrop-spektrofotometrin havaitsemisrajoja (eng. *measurement concentration range*) kyseisen proteiinin konsentraatiolle. Lisäksi NanoDrop:ille ei tehty tutkimusta, millä pitoisuusalueella absorbanssi ja GFP:n konsentraatio ovat lineaarisessa suhteessa toisiinsa.



Kuvio 20 Itsetuotetun GFP-liuoksen laimennosten absorbanssitulokset laajan spektrin mittauksessa (NanoDrop, UV/Vis)

8.9 RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän kehitys GFP:n määrittämiseen

Artikkelin (Hentz & Mosley 2016) gradientti ja ajo-olosuhteet (katso taulukko 1, s. 52) eivät soveltuneet käytettävien GFP-liuoksien (kaupallinen ja itsetuotetun) laimennosten ajoon (aallonpituudella 280 nm), sillä kromatogrammin signaalista ei pystytty tunnistamaan tutkitun GFP:n aiheuttamaa piikkiä (tai piikkejä). Lisäksi liuosten komponenttien

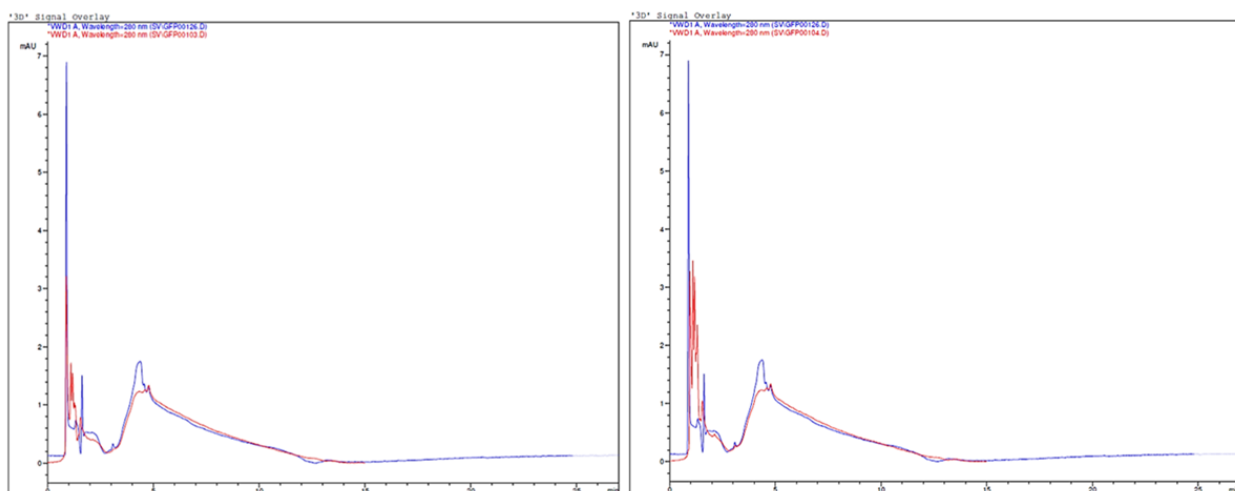
uskotaan jääneen kolonniin, koska gradienttiohjelman loputtua kolonnin tasapainotuksen ja pesun aikana, saatiin useita erikokoisia piikkejä noin 15 – 20 min ajan. Kyseiset piikit olivat kolonniin jääneitä (retentoituneita) tutkitun GFP-liuoksen (kaupallinen/itsetuotettu) komponentteja, jotka eluoutuivat ulos pesuliuoksen mukana. Tämän perusteella gradientin kokonaisajon pituus ei ollut riittävä, tai gradientissa käytettyjen ajoliuosten (A- ja B-ajoliuokset) suhteet eivät soveltuneet GFP-liuosten määrittämiseen.

Suoritettaessa vastaava ajo mittausaallonpituudella 485 nm, GFP-liuoksista ei saatu tuloksia (kromatogrammissa ei näkynyt muutosta nolatasoon verrattuna). Tämän perusteella aallonpituus 485 nm ei sovellu käytettäväksi HPLC-menetelmässä GFP-liuosten analysointiin.

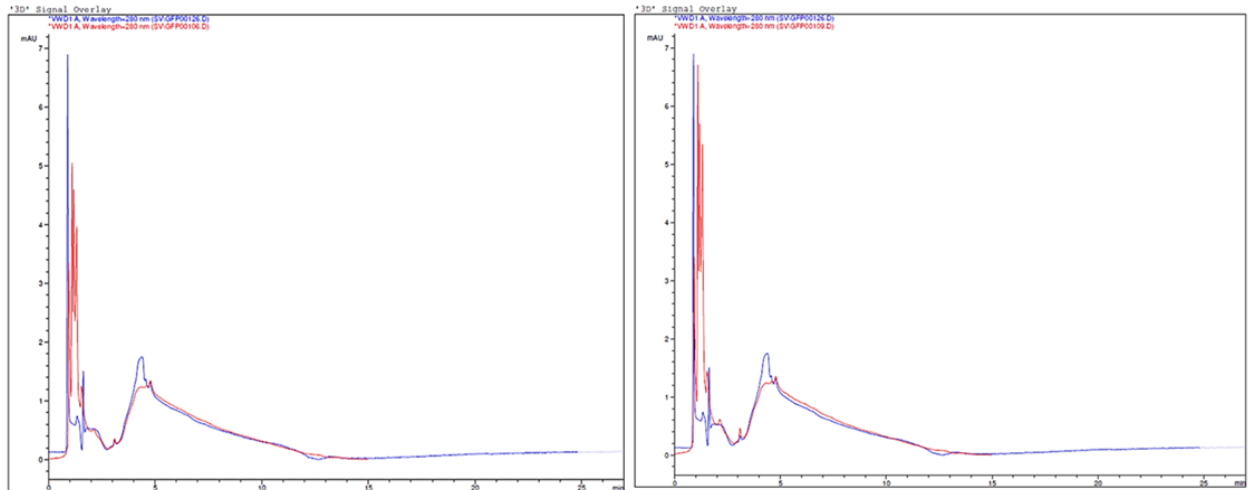
Artikkelissa esitettyä gradienttia muokattiin usean eri testikokeilun jälkeen GFP-liuoksille sopivammaksi. Lisäksi muutettiin injektioilavuutta (5 µl, 10 µl ja 20 µg), kolonnin lämpötilaa (30 °C ja 40 °C) sekä ajon kokonaispituutta (6 min – 30 min). Tarkoituksena oli selvittää näiden testien avulla GFP:n retentioaika, ja muokata gradienttiajota niin, että GFP:n piikit saatiin eroteltua selkeästi muista liuoksen sisältämistä komponenttien aiheuttamista (mahdollisista) piikeistä. Testeissä huomattiin, että käytettävä B-ajoliuos (vähemmän poolinen) eluoi A-ajoliuosta (poolisempi) tehokkaammin GFP:tä kolonnista, jolloin proteiinin piikit saatiin nopeammin ja selkeämmin ulos kolonnista. Lisäksi lämpötilaa sekä injektioilavuutta muuttamalla pystyttiin vaikuttamaan proteiinin piikin muotoon (terävyyteen/loivuuteen) sekä sen korkeuteen ja retentioaikoihin. Esimerkiksi käyttämällä kolonnin lämpötilana 30 °C ajon aikana, tulokset olivat epätarkat verrattuna 40 °C:ssa suoritettujen ajon tuloksiin. Lisäksi saadut tulokset eivät olleet toistettavia, kun käytettiin 20 µl:n injektioilavuutta, tai 5 µl:n injektioilavuudessa piikit olivat liian matalat GFP-määrittämiseen. Parhaimmat tulokset tutkittavista liuoksista saatiin käyttämällä taulukon 2 HPLC:n gradienttia (katso s. 52), injektioilavuutena 10 µl, kolonnin lämpötilana 40 °C ja ajon kokonaispituutena 30 min. Kyseinen menetelmä antoi toistettavimmat tulokset suoritetuissa rinnakkaisajoissa.

Testiajoissa huomattiin lisäksi, ettei käytettävä pesuliuos (C-liuos: sis. H₂O + ACN suhteessa 50:50) ole yksin riittävä käytettävän kolonnin pesuun. Pesuliuos ei eluoinut tehokkaasti kolonniin retentoituneita komponentteja, mikä saattoi väärentää varsinaisten ajosten tuloksia. Retentoituneet komponentit eluoutuivat ulos nopeasti A- ja B-liuoksen konsentraatiota kasvattamalla ajoliuoksessa. Menetelmän kehitystä varten olisi hyvä lisätä esimerkiksi B-liuoksen pitoisuutta pesuohjelmaan, mikä varmistaisi mahdollisten komponenttijäännösten eluoitumisen kolonnista ennen ajon suoritusta.

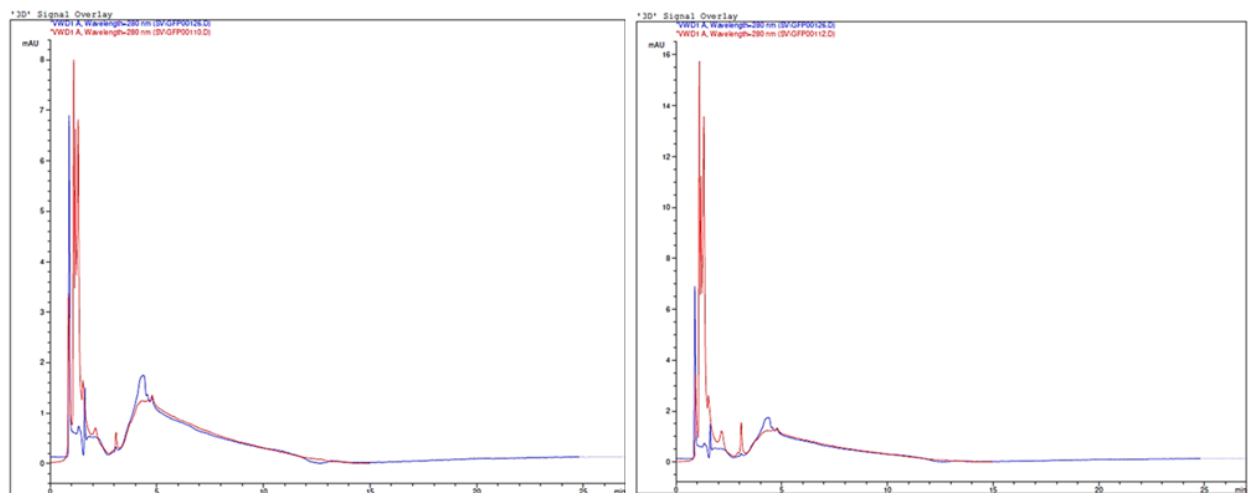
GFP-liuosten (itsetuotetun ja kaupallisen GFP-liuosten) taulukon 2 mukaisten ajo-ominaisuuksien HPLC-ajotulokset on esitetty kuvioissa 21 – 23 sekä tarkemmin liitteessä 19 (katso liitteen kuvat 1 – 6). Kuvioita tarkastelemalla huomataan, että GFP antaa kromatogrammeissa terävät piikit ajassa n. 1 – 2,5 min, ja loivat ajassa 3,5 – 12 min. Koska itsetuotetun GFP:n piikit (punaiset) muistuttavat läheisesti kaupallisen proteiinin piikkejä (siniset) ja saaduilla piikeillä on vastaavat retentioajat, liuosten GFP-proteiini on vastaavanlainen. Huomataan kuitenkin, että itsetuotetun GFP:n tulokset eroavat aikavälillä 1 – 2 min standardi-GFP:n piikeistä. Eroavaisuus voi johtua esimerkiksi siitä, että liuoksen GFP on hajonnut osittain (näytelaimennoksissa) esim. proteiinin käsittelyssä (puhdistus- tai jälkikäsittelyvaiheessa). Hajonneen proteiinin komponentit eluoituvat tällöin eri retentioaikoina ulos kolonnista (kuin varsinaisen GFP:n komponentit). Lisäksi kaupallinen GFP-proteiiniliuos ja tutkittu itsetuotettu GFP-liuos ovat eri puskurissa. Myös tällä on suuri merkitys tuloksiin.



Kuvio 21 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, vasen ja oikea kuva: pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, vasen kuva: pitoisuus ~100 µg/ml ja oikea kuva: pitoisuus ~200 µg/ml) kromatogrammitulokset



Kuvio 22 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, vasen ja oikea kuva: pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, vasen kuva: pitoisuus ~300 µg/ml ja oikea kuva ~400 µg/ml) kromatogrammitulokset



Kuvio 23 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, vasen ja oikea kuva: pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, vasen kuva: pitoisuus ~500 µg/ml ja oikea kuva ~1000 µg/ml) kromatogrammitulokset

Lisäksi kaupallinen GFP-liuos on konsentraatioiltaan (30 µg/ml) paljon pienempi kuin itsetuotetun GFP:n laimennokset 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml ja 400 µl/ml (vertaa punaisia piikkejä sinisiin), mutta standardi antaa silti korkeamman piikin. Myös tämä viittaisi proteiinin hajoamiseen. Toisaalta itsetuotetussa GFP-liuoksessa voi myös olla esim. jokin toinen proteiini tai komponentti, joka häiritsee mittausta. Tulosta voisi parantaa hienosäätämällä gradienttia, jolloin saatujen GFP-liuosten piikit voitaisiin erotella vieläkin

selkeämmiksi. Gradientin muokkauksen (ja olosuhteiden muuttamisen) seurauksena GFP-piikit saataisiin mahdollisesti korkeammiksi.

8.9.1 RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän käyttöönotto dissoluutiotestissä

HPLC-menetelmä vapautuneen GFP:n määrittämiseen vaatii vielä lisää kehittämistä, jotta sitä voitaisiin käyttää dissoluutiotestin kvantitatiivisena ja kvalitatiivisena analyysimenetelmänä. Menetelmää tulisi kehittää tarkemmaksi ja täsmällisemmäksi, jotta saatuihin tuloksiin voitaisiin luottaa. Lisäksi tulisi testata menetelmän lineaarinen mittausalue ja havaitsemisrajat standardi-GFP:llä käytettävän liuoksen määrittämiseen. Lisäksi menetelmää varten tulisi tehdä SiO₂-häiriötestaus.

Koska opinnäytetyössä ei tutkittu ja määritetty kehitetyn HPLC-menetelmän havaitsemisrajoja tai lineaarisuutta, voidaan vain arvioida saatujen tulosten (kuviot 21 – 23) perusteella menetelmän käyttöönoton mahdollisuutta dissoluutiotestissä vapautuneen GFP-proteiinin määrittämiseen. Koska kehitetyn menetelmän tuloksena kaupallisesta GFP-liuoksesta (30 µg/ml) saatiin 7 mAU:n (eng. *milli absorption units*) korkeiset piikit, pitoisuudeltaan 1 µg/ml :n GFP-piikin korkeudeksi saataisiin 0,23 mAU:ta. Tällöin dissoluutiotestin näytteiden sisältämä GFP-pitoisuus (esim. 0 µg/ml < c(GFP) < 5 µg/ml) antaisi todennäköisesti liian matalan piikin kromatogrammissa, ja piikkiä olisi vaikea erottaa ajoliuosten aiheuttamasta taustakohinasta ja tulokset olisivat epäluotettavia. Saatujen tulosten perusteella dissoluutiotestinäytteiden proteiinikonsentraatio ei siis ole riittävä kehitetyllä HPLC-menetelmällä analysoitavaksi. Kuten luvun 8.9 lopussa mainittiin, säätämällä kehitetyn menetelmän gradienttia ja ajo-ominaisuuksia, piikkien korkeutta ja tulosten luotettavuutta saataisiin paremmaksi. Lisäksi dissoluutionäytteitä voisi konsentroida (esim. kylmäkuivaamalla tai ultrasuodattamalla), jolloin niiden määrittäminen HPLC-menetelmällä olisi toimivampaa ja tulokset luotettavampia.

9 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyössä tutkittiin biofarmaseuttisille lääkeaineille mallina toimivan GFP-proteiinin kontrolloitua vapautumista injektoidavasta ~R100-silikahydrogeelistä (*in sink*-olosuhteissa) fysiologisia olosuhteita simuloivassa puskurissa (Tris-puskurissa). Kyseiset dissoluutiotestit suoritettiin kahdelle ikäänymisajaltaan ja ominaisuuksiltaan erilaisille hydrogeelille rinnakkaistesteinä: ruiskun 1 geelejä ikäännytettiin 20 tuntia ja ruiskun 2 geelejä 7 päivää RT-olosuhteissa ennen käyttöä. Dissoluutioteisteistä otettiin näytteitä tunnin välein ja tuloksista määritettiin silikan liukenemisnopeus spektrofotometrisesti ja arvioitiin geelin kokonaisliukenemisaika. Saatujen tulosten liukenemiskäyrien lineaarisuuden perusteella ruiskun 2 geelit olivat ruiskun 1 geelejä homogeenisempiä ja stabiilimpia käytettävässä puskurissa.

Kun proteiinin kapseloituminen on onnistunut hyvin, GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden määrittää silikahydrogeelin liukenemisnopeus. Teoreettisesti vapautuneen GFP:n vapautumisnopeuden laskemiseen käytettiin ruiskun 2 geelin rinnakkaistestien tuloksia. Kyseinen vapautumisnopeus kuvasti työssä injektoidavan lääkeannostelijan kontrolloidusti annostelemaa (biofarmaseuttisen) mallimolekyylin vapautumisnopeutta.

Silikahydrogeelin liukenemismittaustuloksiin perustuvan teoreettisen GFP:n loppukonsentraation arvoa verrattaessa vapautuneen GFP-proteiinin kokonaiskonsentraatioarvoon (dissoluutioteistissä) silikan häviämistä ei ole tapahtunut testin suorituksen aikana, tai häviäminen on ollut vähäistä. Tällöin myös tutkittua proteiinia on hävinnyt vähän tai ei ollenkaan, mikä lisää dissoluutioteistissä vapautuneen GFP-mittaustulosten luotettavuutta.

Dissoluutioteistin näytteistä määritettiin liuenneen silikan lisäksi vapautuneen GFP-proteiinin määrä käyttämällä kolmea eri kvantitatiivista proteiinianalyysimenetelmää: Bradford, Micro BCA ja fluorometria. Analyysimenetelmistä Micro BCA oli opinnäytetyössä käytössä ensimmäistä kertaa käytössä vapautuneen GFP-proteiinin määrittämisessä. Menetelmillä saatuja tuloksia verrattiin teoreettisesti määritetyn proteiinin vapautumiseen, jotta pystyttiin löytämään luotettavin ja toimivin analyysimenetelmä geelistä vapautuneen proteiinin mittaukseen.

Menetelmien toimivuuden ja mahdollisten häiriöiden eliminoimiseksi sekä luotettavuuden todentamiseksi käytettäville analyysimenetelmille suoritettiin SiO₂- ja Tris-puskurin

häiriötestit. Tutkimustuloksista havaittiin, että silika häiritsee proteiinin määrittämistä Micro BCA -analyysissä ja fluoresenssimittauksessa. Lisäksi Tris-puskurin todettiin häiritsevän Bradford- ja Micro BCA -menetelmiä. Koska opinnäytetyössä ei tutkittu häiriöiden lineaarisuutta, silikan tai Tris-puskurin aiheuttamaa taustaa ei voitu poistaa dissoluutiotes- tissä vapautuneen GFP-proteiinin mittaustuloksista. Häiriötä saattoi aiheuttaa myös eri menetelmissä käytettävät liuokset ja niiden ominaisuudet (esim. happamuus). Näistä syistä kvantitatiivisten analyysimenetelmien vertailua vääristyneiden tulosten perusteella ei pystytty suorittamaan luotettavasti. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin arvioida, että Micro BCA -menetelmä voisi antaa teoreettisia vapautumistuloksia vastaavia tulok- sia, mikäli silikan aiheuttama häiriö huomioitaisiin.

Dissoluutiotestin analyysien kehittämisen jatkon kannalta olisi hyvä toistaa menetelmien SiO_2 - ja Tris-puskurin häiriötestaukset dissoluutiotestin pitoisuusrajoissa ($0 \mu\text{g/ml} < c(\text{SiO}_2) < 30 \mu\text{g/ml}$ ja esim. $0 \mu\text{g/ml} < c(\text{GFP}) < 5 \mu\text{g/ml}$). Lisäksi häiriöiden lineaarisuus tulisi tutkia, jotta häiriöiden aiheuttama tausta saataisiin poistettua tuloksista korjausker- toimilla.

Tarkastelemalla käytettävien analyysimenetelmien herkkyyttä, pystyttiin kuitenkin totea- maan Micro BCA:n soveltuvan parhaiten herkkyytensä perusteella vapautuvan GFP:n määrittämiseen. Menetelmän mittausta suoritettaessa huomattiin, ettei käytetty spektro- fotometri-laitteisto (Shimadzu, UV-1800) vastannut menetelmän vaatimaa herkkyyttä. Jotta tulokset saataisiin luotettaviksi Micro BCA -menetelmän lineaarisella mittausalu- eella, tulisi GFP:n määrittämisessä käyttää herkempää, menetelmälle sopivampaa spekt- rofotometriä.

HPLC-menetelmä vapautuneen GFP:n määrittämiseen vaatii vielä lisää kehittämistä, jotta sitä voitaisiin käyttää dissoluutiotestin kvantitatiivisena ja kvalitatiivisena analyysi- menetelmänä. Menetelmää tulisi kehittää tarkemmaksi ja täsmällisemmäksi, jotta saa- tuihin tuloksiin voisi luottaa. Lisäksi kehitetylle menetelmälle tulisi tehdä SiO_2 -häiriötes- taus, ja sen lineaarisesta mittausalueesta tulisi tutkia. On myös huomioitava, että HPLC-me- netelmällä mitattuna käytettävän referenssiproteiinin (standardin) tulisi olla samassa puskurissa kuin tutkittava proteiini, jotta tulokset olisivat luotettavia. Menetelmän kehittä- misen jatkon kannalta olisi lisäksi hyvä tutkia käytettävien ajoliuosten sekä kolonnin so- veltuvuutta kyseiseen analyysiin.

HPLC:llä on etu muihin dissoluutiotestin analyysihin verrattuna, sillä kvantitatiivisen määrittämisen lisäksi menetelmää voisi käyttää vapautuneen proteiinin kvalitatiiviseen

analyysiin. Projektissa, jonka osana tämä opinnäytetyö suoritettiin, ei ole tutkittu, onko dissoluutiotestissä vapautunut GFP rakenteeltaan enää samanlainen kuin ennen silikaageeliin kapselointia. Tiedetään, että proteiinin rakenne voi muuttua paljon valmistusprosessin aikana sekä vapautumisen jälkeen mahdollisen adsorption ja desorption seurauksena. Proteiinin rakennetta voisi tutkia RP-HPLC –menetelmällä vertaamalla vapautuneen GFP:n antamaa piikkiä referenssi-GFP:n piikkiin.

RP-HPLC vaatii kuitenkin erikoisosaamista ja on yleensä työläämpi menetelmä vapautuneen proteiinin määrittämiseen käytettäviin analyysimenetelmiin verrattuna. Toisaalta RP-HPLC on näistä menetelmistä yleensä herkin.

Opinnäytetyön HPLC-tulokset osoittivat, ettei dissoluutiotestinäytteiden proteiinikonsentraatio ole riittävä kehitetyllä HPLC-menetelmällä analysoitavaksi. Ajo-ominaisuuksia ja gradienttia muuttamalla menetelmästä voisi tulla käyttökelpoinen haluttuun tarkoitukseen. Lisäksi dissoluutionäytteiden konsentroidi voisi parantaa menetelmän toimivuutta ja luotettavuutta.

LÄHTEET

American Laboratory Trading. 2018. Viitattu 8.6.2018 <https://americanlaboratorytrading.com/> > Category: Spectroscopy > Subcategory: Spectrophotometer > Shimadzu UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer

American Public Health Association. 1999. Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. 425 Silica. Viitattu 12.12.2017. Saatavissa https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf

Anttila, P. 2010. Punaviinin flavonoidien tunnistaminen. Kandidaatin työ. Kemianteeniikan koulutusohjelma. Lappeenranta. Lappeenrannan teknillinen yliopisto

ASTM International. Standard D859-00. ASTM. 2000. Standard Test Method for Silica in Water. West Conshohocken. Viitattu 12.12.2017. Saatavilla <http://www.astm.org/cgi-bin/retrieve.cgi?D859-00>

Bandyopadhyay, A. & Susmita B. 2013. Characterization of biomaterials. Newnes. Elsevier Science

Beckett, A. H. & Stenlake, J. B. 1988. Practical Pharmaceutical Chemistry: Part Two. 4th ed. The Athlone Press. London

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Volume 72, pages 248 – 254

Brinker, J. & Scherer, G. 1990. SOL-GEL SCIENCE: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. San Diego. ACADEMIC PRESS

Campbell, T. N. & Choy. 2001. The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: A Brief Review. Molecular Biology Today. Volume 2, issue 1, page 1

Coskun, O. 2016. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanbul 2016 Volume 3, issue 1, pages 156 – 160

DeSiTech Oy. Viitattu 8.4.2018. <http://www.delsitech.com/eng/home/> > Technology > Silica drug delivery matrix

Edu.fi. Spektrofotometriset menetelmät. <http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/index.html> > laboratorioanalyysit > analyysimenetelmät > spektrofotometriset menetelmät. Viitattu 15.1.2018

Harris, C. D. 2007. Quantitative Chemical Analysis. W. H. Freeman and Company. New York. USA. Seventh Edition

Hawkins, M. A. 2012. Biodegradable hydrogels and nanocomposite polymers: Synthesis and characterization for biomedical applications. Master's Theses. University of Kentucky

Hentz, N. & Mosley, B. 2016. Development of Stability Indicating Methods for Green Fluorescent Protein by HPLC. LCGC North America. Volume 34, issue 10, pages 798 – 803

Hidex. 2015. <http://hidex.com/> > microplate readers > Hidex Sense Multimodal Microplate Reader. Viitattu 7.6.2018

Hitachi High-Technologies. Viitattu 18.2.2018. <https://www.hitachi-hightech.com> > Products & Services > Science & Medical Systems > Technical Support > Technical Support: Analytical Systems > Technical Support: High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) > HPLC Basic Course > Principle and System Configuration of HPLC

Iler, R. K. 1979. The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica. John Wiley & Sons. New York

Janson, J-C. 2011. Methods of Biochemical Analysis: Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. Third edition

Jin, J-F.; Zhu, L-L.; Chen, M.; Xu, H-M.; Wang, H-F.; Feng, X-Q.; Zhu, X-P. & Zhou, Q. 2015. The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. Patient Preference and Adherence. Volume 2, issue 9, pages 923 – 942

Jokinen, M.; Jalonen, H.; Forsback, A-P. & Koskinen M. 2013. Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof. Patent Number: EP2118006 B9

Jokinen, M.; Koskinen, M. & Areva, S., 2008. Rationale of Using Conventional Sol-Gel Derived SiO₂ for Delivery of Biologically Active Agents. Key Engineering Materials. Volume 377, pages 195 – 210

Kim, H.; Park, H. & Lee, S. J. 2017. Effective method for drug injection into subcutaneous tissue. Scientific Reports. Volume 7, issue 1, page 9613

Krajnik, B.; Gajda-Rączka, M.; Piątkowski, D.; Nyga, P.; Jankiewicz, B.; Hofmann, E. and Mackowski, S. 2013. Silica nanoparticles as a tool for fluorescence collection efficiency enhancement. Nanoscale Research Letters. Volume 8, issue 1, page 146

Kumar, C. V. 2017. NanoArmoring of Enzymes: Rational Design of Polymer-Wrapped Enzymes. In: Liu, Y. & Cao, A. Ed. Methods in Enzymology, Volume 590, 1st ed. City: USA, pages 1 – 31

Laine, A. 2009. Polaaristen yhdisteiden analytiikkaan soveltuvat nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmät. Pro gradu -tutkielma. Lääkekemian maisteriohjelma. Jyväskylän yliopisto

Lakowicz, J.R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third edition. Springer Science + Business Media. USA. Pages 1 – 23

Lampiselkä, J.; Mutanen, J.; Myllyviita, A. & Perna, J. 2016. Orbitaali 2 – Ihmisen ja elinympäristön kemiaa. e-Oppi Oy. Jokioinen. Saatavissa <https://peda.net/id/f7067a64f10>

Lowman, A. M. 2004. Biomaterials in Drug Delivery. Biomedical Devices and Their Applications. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg

Mahler, H-C. & Jiskoot, W. 2012. Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals. John Wiley & Sons

NanoDrop Technologies, Inc. 2007. ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual. Review. Volume 7. Wilmington USA. Viitattu 12.12.2017

Neradko, N. 2014. Solukapselointiin käytettävien biomateriaalien huokoistaminen. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Turku. Turun Ammattikorkeakoulu.

Park, H.; Park, K. & S.W. Shalaby, W. 2011. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. CRC Press

Peda.net. Viitattu 7.4.2018. <https://peda.net/joensuu/lukiot/lyseon-lukio/oppiaineet2> > Kemia > Kemia 4, VANHA OPS > 6. Synteettiset polymeerit ja biopolymeerit

Pepperkok, R.; Squire, A.; Geley, S. & Baestiaens P. I. H. 1999. Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Brief Communications*. Volume 9, issue 5, pages 269 – 274

Popescu, M. A. 2011. *Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine: Drug Delivery*. Nova Science Publishers

Qu, H.; Bhattacharyya, S. & Ducheyne, P. 2015. Silicon oxide-based materials for controlled release in orthopedic procedures. *Advanced Drug Delivery Review* article. Volume 94, pages 96 – 115

Redmile-Gordon, M. A.; Armenise, E.; White, R. P.; Hirsch, P.R. & Goulding, K. W. T. 2013. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 67, issue 100, pages 166 – 173

Rich, J. & Ahola N. 2002. *Kontrolloitu lääkeaineannostelu*. Teknillinen korkeakoulu: Polymeeritekniologia. Luennot keväällä 2002. KEM-100.570 Biopolymeerit. Espoo. Otamedia Oy. Technology Workshop 8

Sälliluoma, J. 2014. *Spektrofotometrin käyttöönotto ja validointi*. Opinnäytetyö. Kemianteeniikan koulutusohjelma. Satakunta: Satakunnan ammattikorkeakoulu.

Schmidt, S. R. 2013. *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges*. John Wiley & Sons. Canada

Seppälä, J.; Vallittu, P.; Närhi, T.; Allan Alho, A. & Yli-Urpo A. 2004. Uudet polymeeripohjaiset biomateriaalit. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. Numero 120, sivut 1203 – 1209

Shimadzu. Viitattu 8.6.2018 <https://www.ssi.shimadzu.com/> > Products > Molecular Spectroscopy > UV-Vis Spectrophotometers > UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, D. M.; Fujimoto, E. K.; Goeke, M. N.; Olson B. J. & Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. Volume 150, issue 1, pages 76 – 86

Solunetti. 2006. Viitattu 4.4.2018. <http://www.solunetti.fi/fi/> > Solubiologia > Solukalvo > Aineiden kuljetus solukalvon läpi > Diffuusio

Sundström, H. 2016. *Virusten kaltaisten partikkelien kapselointi*. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Turku. Turun ammattikorkeakoulu

Tauriainen, E. & Wetterstrand, L. 2012. *Tavoitteena potilasturvallinen lääkehoito*. Opinnäytetyö. Hoitotyön koulutusohjelma. Joensuu. Pohjois-Karjalan ammattikorkeakoulu

Thermal Product Solutions. 2017. *Uses and Benefits to the biopharmaceutical industry*. Viitattu 5.4.2018. <https://www.thermalproductsolutions.com/> > Blog: Think Thermal > Uses and Benefits to the biopharmaceutical industry, Part Two

Thermo Scientific. 2013. *Instructions. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit Number 23200*. Viitattu 3.1.2018.

Thermo Scientific. 2015. *Instructions. Micro BCA Protein Assay Kit Number 23235*. Viitattu 20.1.2018.

Thermo Scientific. *Chemistry of Protein Assays*. Viitattu 22.1.2018 <https://www.thermofisher.com/fi/en/home.html> > Applications & Techniques: Life Sciences > Protein Biology > Protein Biology Learning Center > Protein Biology Resource Library > Pierce Protein Methods > Chemistry of Protein Assays

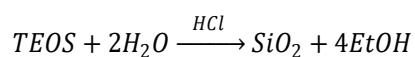
- Thermo Scientific. Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye. Catalog number 20278. Viitattu 22.1.2018
- Thermo Scientific. The Genomics Core Facility. University Texas Arlington. Viitattu 6.4.2018. <http://gcf.uta.edu/index.html?reload> > Equipment > Thermo Scientific Nanodrop
- Thermo Spectronic. Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications. Viitattu 20.1.2018
- Tieteen termipankki. 2017. Biologia: Fluoresenssi. Viitattu 20.2.2018. Saatavissa <http://www.tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:fluoresenssi>
- Törmälä, P.; Aho, A.; Anderson, Ö.; Heikkilä, J.; Keränen, J.; Kontinen, Y.; Lappalainen, R.; Leppöjärvi, M.; Nevalainen, J.; Santavirta, S.; Tarvianen, T.; Vallittu, P.; Viljanen, V.; Waris, E. & Waris, V. 2003. Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin, Osa 1. 00301 Helsinki: Lääkelaitos Terveydenhuollon laitteet ja tarvikkeet –osasto PI 55
- Tsien, R. Y. 1998. The Green Fluorescent protein. Annual Review of Biochemistry. Volume 67, pages 509 – 544
- Turku AMK. (ei pvm). Reaktiivisen silikaatin määrittäminen spektrofotometrisesti. Laboratoriotyöohje
- Turner Designs. An Introduction to Fluorescence Measurements. Review article. Viitattu 20.2.2018. Saatavissa <https://www.turnerdesigns.com/t2/doc/appnotes/998-0050.pdf>
- Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. 2013. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Second edition
- Valvira. 2015. Biomateriaalit. Viitattu 10.1.2018 www.valvira.fi > terveydenhuolto > terveysteknologia > biomateriaalit
- Vartija, J. 2017. Biohajoavan malli-implantin kehitys biofarmaseuttisten aineiden vapautumiselle. Opinnäytetyö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Turku. Turun ammattikorkeakoulu.
- Veromaa, T. 2003. Taikaluodeista oikeiksi lääkkeiksi – immunoterapiaa apteekin hyllyltä. Duodecim -lehti. Numero 119, sivut 793-800. Turku. Saatavissa <http://www.duodecim-lehti.fi/api/pdf/duo93537>
- Walsh, G. & Murphy, B. 1999. Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective. Springer Science & Business Media
- Weston, A. & Brown, P. R. 1997. HPLC and CE: Principles and Practice. Academic Press. San Diego, California. USA

Sooli-geeli –laskuri

Soolilaskuri		
Tekijä:	Salla	
Päivämäärä:	12.3.2018	
V(total)	100	ml
R-arvo:	80	
pH:	2	
c(HCl):	1	mol/l
Lähtöaineet:		
	V (ml)	n (mol)
TEOS:	13,65	0,05990
H ₂ O:	85,35	4,79200
HCl:	1	0,001
Lopputuotteet:		
SiO ₂ :	3,60	g
EtOH:	13,98	ml
Tarkistus:		
V(total):	100,0	ml
R(calculated):	80	

Geelilaskuri		
Tekijä:	Salla	
Päivämäärä:	12.3.2018	
V(total):	10	ml
Soolin osuusl:	9	
Neutralointiliuoksen osuus:	2,00	
V(sooli):	8,18181818	ml
n(TEOS) geelissä:	0,00490091	mol
V(neutralointiliuos):	1,81818182	ml
n(H ₂ O) geelissä:	0,3921	mol
n(H ₂ O) liuos:	0,1009	mol
n(H ₂ O) total:	0,4930	mol
Valmistetun geelin R:	100,6	

Aine	M (g/mol)	Tiheys (g/ml)	m-%	c (mol/l)
TEOS	208,33	0,933	98	-
H ₂ O	18,02	1	100	-
HCl	36,46	1,017	-	1
SiO ₂	60,08	-	-	-
EtOH	46,07	0,7894	-	-



$$V_{TEOS} = \frac{V_{total}}{\left(\frac{R_{sooli} \cdot c_{TEOS}}{c_{H_2O}} + 1\right)}$$

$$V_{H_2O} = V_{total} - V_{TEOS} - V_{HCl}$$

$$V_{HCl} = \frac{10^{-pH} \cdot V_{total}}{c_{HCl}}$$

Silikahydrogeelin valmistukseen ja dissoluutioteistiin liittyvät laskut

Geeliin valmistukseen käytetyn soolin osuus koko soolimäärästä:

$$\frac{8,181818 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} * 100 \% = 8,181818 \%$$

Silikan määrä geelissä:

$$3,60 \text{ g} * 0,08181818 = 0,2944469... \text{ g} = 294446,9 \mu\text{g}$$

Teoreettinen GFP-proteiinin määrä geelissä (5 % silikan massasta geelissä):

$$0,05 * 0,2944469 \text{ g} = 0,014722346 ... \text{ g} = 14722,346 \mu\text{g}$$

GFP-liuos (15999,95 $\mu\text{g/ml}$) toimii geelin valmistuksessa neutralointiliuoksena. GFP-liuoksen tarve soolissa:

$$\frac{14722,346 \mu\text{g}}{15999,95 \mu\text{g/ml}} = 0,920149479 \text{ mL} \approx 0,92 \text{ ml}$$

Sooliin lisätyn HCl:n (1 M) tilavuus on 1 ml, eli HCl:n teoreettinen tilavuus soolissa on:

$$0,08181818 * 1 \text{ ml} = 0,08181818 ... \text{ ml} = 8,18 \mu\text{l}$$

NaOH:ia tarvitaan soolissa sama määrä kuin HCl:ää, jotta lopullinen pH saadaan nostettua haluttuun arvoon pH6.5 – pH7. Sooliin tarvittavan teoreettisen NaOH:n määrä voidaan laskea, sillä pH:n säätöön käytetyt liuokset ovat yhdenarvoisia. Yhdenarvoisen (1 M) NaOH:n tarve soolissa:

$$V(\text{NaOH}, 1 \text{ M}) = V(\text{Geelin valmistukseen käytettävä sooliosuus}) \times \frac{V(\text{HCl}, 1 \text{ M})}{V(\text{Sooli})}$$

$$V(\text{NaOH}, 1 \text{ M}) = 8,18 \text{ ml} \times \frac{1 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0,08181818 ... \text{ ml} = 8,18 \mu\text{l}$$

Soolin pH:n nostamisessa käytetään 1 M:n NaOH:n tilalla 0,25 M:sta, jotta geelautuminen tapahtuu tasaisesti. 0,25 M:n NaOH:n tarve soolissa:

$$\frac{1 \text{ M}}{0,25 \text{ M}} \times 0,08181818 \text{ ml} = 0,3272 \text{ ml}$$

Testien perusteella, todellinen NaOH:n tarve soolissa on kuitenkin 400 μl .

Neutralointiliuos koostuu H₂O:sta, GFP-liuoksesta, and NaOH:sta. Jotta neutralointiliuoksen kokonaistilavuus soolissa on 1,818182 ml, lasketaan tarvittavan H₂O:n määrä tunnettujen NaOH:n ja GFP-liuoksen tilavuuksien avulla:

$$V(\text{Neutralointiliuos}) - V(\text{GFP}) - V(\text{NaOH}, 0,25 \text{ M}) \\ = 1,818182 \text{ ml} - 0,920149479 \text{ ml} - 0,4 \text{ ml} = 0,49803251 \dots \text{ ml} \approx 498 \mu\text{l}$$

Sooli (kokonaistilavuudeltaan 10 ml), siirretään ikääntymään 1 ml:n lääkeruiskuihin. Silikan määrä 1 ml:n ruiskussa:

$$\frac{294446,9132 \mu\text{g}}{10 \text{ ml}} = 29444,69132 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 29444,69132 \mu\text{g}$$

Dissoluutiotestissä injektoidaan 100 μl ~R100-GFP-silikageeliä 1 ml:n ruiskusta Tris-puskuriin (0,05 M, pH7.4 37 °C:ssa), joten silikan kokonaismäärä testissä on:

$$\frac{29444,69132 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{\frac{1 \text{ ml}}{0,100 \text{ ml}}} = 2944,469132 \mu\text{g}$$

Koska GFP:n teoreettinen määrä geelissä (10 ml) on 14722,34566 μg , GFP:n määrä 1 ml:n ruiskussa on:

$$\frac{14722,34566 \mu\text{g}}{10} = 1472,234566 \mu\text{g}$$

Dissoluutiotestissä injektoidaan 100 μl ~R100-GFP-silikageeliä 1 ml:n ruiskusta Tris-puskuriin (0,05 M, pH7.4 37 °C:ssa), joten GFP:n kokonaismäärä testissä on:

$$\frac{1472,234566 \mu\text{g}}{\frac{1 \text{ ml}}{0,100 \text{ ml}}} = 147,2234566 \mu\text{g}$$

Dissoluutiotestissä injektoidaan 100 μl ~R100-GFP-silikageeliä 30 ml:n Tris-puskuriin. Liuenneen silikan teoreettinen kokonaiskonsentraatio testissä on:

$$\frac{2944,469132 \mu\text{g}}{30 \text{ ml}} = 98,14897107 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} (\text{ppm})$$

Vapautuneen GFP-proteiinin teoreettinen kokonaiskonsentraatio dissoluutiotestissä on:

$$\frac{147,2234566 \mu\text{g}}{30 \text{ ml}} = 4,907448553 \mu\text{g/ml}$$

Silikahydrogeelin todellisen R-arvon laskeminen

Silikahydrogeelin valmistuksessa etanolin suhteellista pitoisuutta pienennettiin haihduttamalla soolista. Haihdutuksen aikana sooliin lisättiin vettä, jonka tarkoituksena oli syrjäyttää haihtuneen seoksen tilavuus. Haihdutusprosessi vaikutti valmistetun soolin ja lopullisen hydrogeelin R-arvoihin. Opinnäytetyössä käytetyn soolin ja geelin todelliset R-arvot on ratkaistu seuraavaksi esitettyjen laskujen mukaisesti alla olevan taulukon arvoja käyttäen.

Taulukko. Silikahydrogeelin valmistukseen liittyviä oleellisia arvoja

Sooli		
n(TEOS soolissa)	0,0599	mol
n(H ₂ O soolissa, ennen haihdutusta)	4,792	mol
V(H ₂ O+HCl soolissa, ennen haihdutusta)	86,35	ml
V(EtOH soolissa)	13,98	ml
m(sooli ennen haihdutusta)	58,84	g
m(sooli haihdutuksen jälkeen)	67,12	g
V(syrjäyttävä H ₂ O)	20	ml
ρ(EtOH)	0,7894	g/ml
ρ(H ₂ O)	1	g/ml
M(H ₂ O)	18,02	g/mol
Geeli		
Geeliin valmistukseen käytetyn soolin osuus koko soolimäärästä, 100 ml (%)	8,1818	%
n(TEOS geelissä)	0,0049	mol
n(H ₂ O neutralointiliuoksessa)	0,1009	mol

Laskuissa oletetaan, että soolin sisältämät HCl:n ja NaOH:n tiheydet ovat samat kuin veden (1 g/ml). Lisäksi oletetaan, että soolin valmistuksessa syntynyt etanolimäärä (13,98 ml) haihtuu kokonaan (todellisuudessa vesi-etanoliseoksissa näin ei tapahdu koskaan).

Soolin todellisen R-arvon laskeminen

EtOH:n syrjäyttävänä vesimääränä käytettiin 20 ml, joka vastasi lähes kaksinkertaista määrää haihtuneeseen seokseen verrattuna (13,98 ml). Haihdutusprosessin vesi- ja etanolimäärien painot saadaan laskettua kyseisten aineiden tiheyksien avulla ($\rho(\text{H}_2\text{O}) = 1 \text{ g/ml}$ ja $\rho(\text{EtOH}) = 0,7894 \text{ g/l}$).

$$m = V \times \rho$$

$$\text{Syrjäyttävän veden paino } m(H_2O) = 20 \text{ ml} * 1 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 20 \text{ g}$$

$$\text{Haihtuvan etanolin paino } m(EtOH) = 13,98 \text{ ml} * 0,7894 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 11,0358 \text{ g}$$

Lasketaan massoina, kuinka paljon enemmän vettä lisätään haihtuvan etanolin määrään verrattuna. "Ylimääräisen" veden määrä soolissa:

$$m(H_2O) - m(EtOH) = 20 \text{ g} - 11,0358 \text{ g} = 8,96419 \text{ g}$$

Lasketaan seuraavaksi laskennallisen soolin paino etanolin haihdutuksen jälkeen. Tämä saadaan lisäämällä "ylimääräisen" lisätyn veden massa punnitun soolin painoon lähtötilanteessa (58,84 g).

$$\begin{aligned} m(\text{"ylimääräinen" lisätty } H_2O) + m(\text{sooli total lähtötilanteessa}) \\ = 8,96419 \text{ g} + 58,84 \text{ g} = 67,8042 \text{ g} \end{aligned}$$

Verrataan laskennallisen soolin painoa todellisen (punnitun) soolin painoon etanolin haihdutuksen jälkeen. Huomataan, että laskennallisen soolin paino on hieman todellista painoa suurempi. Tämä tarkoittaa, että haihdutusprosessissa soolista on haihtunut seosta haluttua enemmän (eli etanolin lisäksi myös vettä on haihtunut). Vähennetään laskennallisen soolin massasta (67,8042 g) todellisen soolin paino (67,12 g), jotta voidaan ratkaista suspension sisältämän veden todellinen ainemäärä haihdutuksen jälkeen, ja sitä kautta ratkaisemalla todellinen R-arvo valmistetulle soolille.

$$\begin{aligned} m(\text{haihtunut vesiseos}) &= m(\text{laskennallinen sooli total}) - m(\text{todellinen sooli total}) \\ &= 67,8042 \text{ g} - 67,12 \text{ g} = 0,68419 \text{ g} \end{aligned}$$

$$n(\text{haihtunut vesiseos}) = \frac{0,68419 \text{ g}}{18,02 \text{ g/mol}} = 0,03797 \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} n(H_2O \text{ todellisessa soolissa haihdutuksen jälkeen}) \\ &= n(\text{soolin } H_2O \text{ lähtötilanteessa}) - n(\text{haihtunut vesiseos}) \\ &= 4,792 \text{ mol} - 0,03797 \text{ mol} = 4,75403 \text{ mol} \end{aligned}$$

Todellisen R – arvon laskeminen soolille

$$\begin{aligned} &= \frac{n(H_2O \text{ todellisessa soolissa haihdutuksen jälkeen})}{n(\text{TEOS soolissa})} = \frac{4,75403 \text{ mol}}{0,0599 \text{ mol}} \\ &= 79,3661 \end{aligned}$$

Tulokseksi soolin todelliseksi R-arvoksi saadaan ~79,4.

Geelin todellisen R-arvon laskeminen

Koska haihdutusprosessissa soolista haihtui etanolin lisäksi vesiseosta, tämä vaikutti soolin R-arvon (~R79,4) lisäksi opinnäytetyössä käytetyn lopullisen silikahydrogeelin R-arvoon.

Koska silikahydrogeelin valmistukseen käytettiin vain 8,18 ml soolia, lasketaan käytetyn soolimäärän sisältämän veden ainemäärä.

$$\begin{aligned} n(\text{geeliin käytetyn soolimäärän } H_2O) &= \text{Geeliin valmistukseen käytetyn soolin osuus koko soolimäärästä (\%)} \\ &\times n(H_2O \text{ todellisessa soolissa haihdutuksen jälkeen}) \\ &= 0,0818 \times 4,75403 \text{ mol} = 0,3888797965 \text{ mol} \end{aligned}$$

Lisätään saatu veden ainemäärä neutralointiliuoksen sisältämään veden ainemäärään (0,1009 mol, katso liite 1), jotta saadaan selville todellisen geelin sisältämän veden ainemäärä ja laskettua todellinen R-arvo.

$$\begin{aligned} n(\text{todellisen geelin } H_2O) &= n(\text{geeliin käytetyn soolimäärän } H_2O) \\ &+ n(H_2O \text{ neutralointiliuoksessa}) = 0,388879797 \text{ mol} + 0,1009 \text{ mol} \\ &= 0,48978 \text{ mol} \end{aligned}$$

Lasketaan silikahydrogeelin todellinen R-arvo, kun TEOS:n ainemäärä geelissä on 0,00490091 mol (katso liite 1).

$$\begin{aligned} \text{Todellisen R - arvon laskeminen geelille} &= \frac{n(H_2O \text{ todellisessa geelissä})}{n(TEOS \text{ geelissä})} \\ &= \frac{0,48978 \text{ mol}}{0,00490091 \text{ mol}} = 99,93650088 \approx 100 \end{aligned}$$

Opinnäytetyössä käytetyn silikahydrogeelin todelliseksi R-arvoksi saadaan ~100.

Tris(hydroksimetyyli)aminometaanipuskuriliuoksen eli Tris -puskurin valmistus

Valmistetaan dissoluutiotestiä varten 1,0 l 0,05 M Tris-puskuria (pH 7.4, 37 °C:ssa) alla olevan kuvan mukaisesti. Punnitaan 5,72 g Trizma-suolahappoa (HCl) (Thermo Scientific) ja 1,66 g Trizma Base -reagenssia (Thermo Scientific) ja liuotetaan reagenssit 1,0 L Milli-Q-veteen (18,2 MΩ). Puskurin säilyvyys jääkaappilämpötilassa (+ 4 C) n. 1 kk.

5°C	pH		Trizma HCl (Grams/Liter)	+	Trizma Base (Grams/Liter)
	25°C	37°C			
7.76	7.20	6.91	7.02		0.67
7.89	7.30	7.02	6.85		0.80
7.97	7.40	7.12	6.61		0.97
8.07	7.50	7.22	6.35		1.18
8.18	7.60	7.30	6.06		1.39
8.26	7.70	7.40	5.72		1.66
8.37	7.80	7.52	5.32		1.97
8.48	7.90	7.62	4.88		2.30
8.58	8.00	7.71	4.44		2.65
8.68	8.10	7.80	4.02		2.97
8.78	8.20	7.91	3.54		3.34
8.88	8.30	8.01	3.07		3.70
8.98	8.40	8.10	2.64		4.03
9.09	8.50	8.22	2.21		4.36
9.18	8.60	8.31	1.83		4.65
9.28	8.70	8.42	1.50		4.90
9.36	8.80	8.51	1.23		5.13
9.47	8.90	8.62	0.96		5.32
9.56	9.00	8.70	0.76		5.47

Kuva. Tris-puskurin reagenssitarve eri lämpötila- ja happamuusolosuhteissa (muokattu: Sigma Aldrich)

(Kuvan lähde: Sigma Aldrich. Trizma Buffers. Product Specification. Supelco. Viitattu 12.2.2018. <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4709.pdf>)

REAKTIIVISEN SILIKAATIN MÄÄRITYS SPEKTROFOTOMETRISESTI

1 Yleistä

Pii on maankuoren toiseksi yleisen alkuaine. Pii esiintyy oksidina eli silikaattina kvartsissa ja hiekassa ja muodostaa metallien kanssa silikaattiminaaleja. Silikaattia sisältävien kivilajien hajoaminen vapauttaa silikaattia suspensiopartikkeleina luonnonvesiin. SiO₂:ta on yleensä luonnonvesissä 1-30 mg/l.

...

2 Soveltamisalue

Menetelmä soveltuu reaktiivisen (liukoisen) SiO₂:n määrittäisiin vesistä, jotka sisältävät 0,1- 1,2 mg/l silikaattia.

Menetelmää käytetään ...

3 Periaate

Piihappo muodostaa happamassa liuoksessa (pH 1,1 - 1,3) molybdaatin kanssa koostumukseltaan ilmeisesti H₄[SiMO₁₂O₄₀] olevan keltaisen kompleksiyhdisteen, joka pelkistetään sulfiitin ja 1-amino-2-hydrokso-4-naftaleenisulfonihapon avulla molybdeenisiniseksi. Saadun pelkistystuotteen absorbanssi mitataan aallonpituudella 815 nm. Tulos lasketaan saadun absorbanssin ja standardisuoran yhtälön perusteella.

4 Menetelmän laatusuureet

Menetelmän mittausepävarmuus on noin 6,4 % pitoisuustasolla 0,6 mg/l. Mittausepävarmuuden laskennassa ei ole otettu huomioon näytteenoton aiheuttamaa virhettä. Liitteessä 1 on esitetty menetelmän validointituloksia.

5 Häiriöt

Määrittästä häiritsevät muut molybdeenin kanssa kompleksiyhdisteitä muodostavat ionit. Suurin häiriö aiheutuu fosfaatista, joskin sen aiheuttama häiriö voidaan poistaa lisäämällä orgaanista happoa, esim. oksaalitai viinihappoa. Tällöin orgaaninen happo kompleksoi ylimäärän molybdaatin ja hajottaa muut kuin piitä sisältävät häiritsevät kompleksit.

Hydratsiini häiritsee määrittästä ja se on poistettava ennen määrittästä. Lasiastioista liukeneva silikaatti kontaminoi käytettävät liuokset, erityisesti jos ne ovat alkaalisia. Tämän vuoksi on käytettävä muoviastioita.

Valon intensiteettiä mitattaessa on varmistuttava, ettei kyvetti ole likainen tai mitattavassa liuoksessa partikkeleita, jotka häiritsevät valon kulkua. Kyvetin seinämille muodostuvaa molybdeenisinikalvo puhdistetaan 2 mol/l natriumhydroksiliuoksella.

6 Vastuu

...

7 Laitteisto

Käytettävien astioiden tulee olla muovisia kontaminaation välttämiseksi

- Spektrofotometri varusteineen
- 50 mm kvartsinen läpivirtauskyvetti
- 100 ml muovisia titrausastioita
- 100 ja 250 ml:n muovisia mittapulloja
- Pipettejä
- Kello

8 Reagenssit

Kaikkien reagenssien on oltava vähintään analyysipuhdasta laatua ja käytettävä vesi tuoretta milli-Q -vettä.

Kaikki reagenssit tehdään muovisiin mittapulloihin.

8.1 Natriumhydroksidiliuos, 2 mol/l

Liuotetaan 80 g natriumhydroksidia milli-Q -veeseen, jäähdytetään ja laimennetaan milli-Q -vedellä yhdeksi litraksi. Liuosta käytetään kyvetin puhdistamiseen.

8.2 Rikkihappo, 0,5 mol/l

Valmistetaan Titrisol-ampullista (Merck 1.09981 tai vastaava) laimentamalla yhdeksi litraksi milli-Q -vedellä tai laimentamalla 27,8 ml väkevää rikkihappoa, H_2SO_4 (Merck 1.00731 tai vastaava) yhdeksi litraksi milli-Q -vedellä. Liuos säilytetään muovipullossa. Liuos säilyy kuusi kuukautta.

8.3 Ammoniumheptamolybdaattiliuos

Liuotetaan 25 g ammoniumheptamolybdaattitetrahydraattia, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ (Merck 1.01182 tai vastaava) noin 200 ml milli-Q -vettä. Lisätään varovasti ja sekoittaen 20 ml väkevää rikkihappoa, H_2SO_4 (Merck 1.00731 tai vastaava), jäähdytetään ja laimennetaan 250 ml milli-Q -vedellä. Liuos säilyy kuusi kuukautta.

8.4 Oksaalihappoliuos

Liuotetaan 25 g oksaalihappodihydraattia, $C_2H_2O_4 \times 2H_2O$ (Merck 1.00495 tai vastaava) milli-Q -veteen ja laimennetaan 250 ml. Liuos säilyy kuusi kuukautta.

8.5 Pelkistysreagenssi

Liuotetaan 0,625 g 1-amino-2-hydrokso-4-naftaleenisulfonihappoa $C_{10}H_9NO_4S$ (Merck 1.00099 tai vastaava) ja 1,25 g natriumsulfiittia Na_2SO_3 (Merck 1.06657 tai vastaava) noin 50 ml milli-Q -vettä 250 ml muovisessa mittapullossa, lämmitään tarvittaessa.

Lisätään edelliseen 37,5 g natriumdisulfiittia, $Na_2S_2O_5$ (Merck 1.06528 tai vastaava) ja milli-Q -vettä. Kun kaikki on liennut, niin täytetään milli-Q -vettä merkkiin ja seisotetaan yön yli jääkaapissa. Tämän jälkeen liuos suodatetaan (paperi Whatman 2 tai vastaava) ja säilytetään muovipullossa jääkaapissa. Liuoksen väri ei saa muuttua säilytyksen aikana. Liuoksen käyttöikä on korkeintaan kaksi kuukautta.

8.6 Silikaattiperusliuos, 1000 mg SiO_2/l

Liuotetaan 0,473 g natriummetasilikaattia, $Na_2SiO_3 \times 9H_2O$ (esim. Acros Organic 41959 tai vastaava) milli-Q -veteen 100 ml muovisessa mittapullossa. Liuoksesta valmistetaan standardisuoran vertailuliukset. Standardisuora ja laadunvarmistusnäytteet tehdään eri perusliuoksista. Liuoksen käyttöikä on kolme kuukautta.

8.7 Silikaattityöliuos, 50 mg SiO_2/l

Laimennetaan 2,5 ml kohdan 8.6 liuosta 50 ml:ksi milli-Q -vedellä. Liuos on valmistettava jokaista käyttökertaa varten.

8.8 Standardisuoran vertailuliukset, 0,1- 1,2 mg SiO_2/l

Standardisuoraa varten valmistetaan seitsemän vertailuliusta kohdan 8.7 työliuoksesta 100 ml mittapulloihin taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1. Vertailuliusten pipetointilavuudet ja pitoisuudet

Vertailuliuos	Pipetointilavuus ml	Lopullinen SiO_2 -pitoisuus (mg/l)
1	0,2	0,1
2	0,4	0,2
3	0,8	0,4
4	1,2	0,6
5	1,6	0,8

6	2,0	1,2
7	2,4	1,2

Lisäksi valmistetaan reagenssinolla milli-Q -vedestä.

8.9 Laadunvarmistusnäyte eli QC-näyte 0,6 mg/l

QC-näyte valmistetaan eri silikaattiperusliuoksesta, kun standardisuora on valmistettu. Kohdan 8.7 työliuosta pipetoidaan 1,2 ml 100 ml mittapulloon ja täytetään milli-Q -vedellä merkkiin. Liuos sisältää 0,6 mg SiO₂ litrassa. Valmistetaan aina analysoitaessa.

Vaihtoehtoisesti QC-näytteet voidaan valmistaa suoraan perusliuoksesta (1000 mg/l) pipetoimalla 30 µl 50 ml milli-Q -vettä.

9 Suoritus

9.1 Standardisuora

Standardisuora mitataan 3 vuoden välein tai aina tarpeen vaatiessa.

Näytetilavuus on 50 ml, jonka päälle reagenssiliuokset pipetoidaan.

Mitataan 50 ml kohdan 8.7 vertailuliukuksia ja milli-Q vettä (reagenssi-näyte) muovisiin 100 ml titrausastioihin, pipetoidaan niihin 1 ml kohdan 8.2 rikkihappoliuosta ja sekoitetaan. Lisätään 2 ml kohdan 8.3 ammoniumheptamolybdaattiliuosta, sekoitetaan ja odotetaan 10 minuuttia.

Lisätään 2 ml kohdan 8.4 oksaalihappoliuosta ja 30 - 60 s kuluessa 1 ml kohdan 8.5 pelkistysreagenssia, sekoitetaan ja odotetaan 20 minuuttia.

Vertailuliuokset mitataan spektrofotometrin käyttöohjeen mukaan.

Spektrofotometrin nollaukseen (autozero) käytetään reagenssinolla ja liuokset mitataan seuraavassa järjestyksessä.

9.2 Näytteiden mittaus

Näytetilavuus on 50 ml, jonka päälle reagenssiliuokset pipetoidaan.

Mitataan 50 ml milli-Q -vettä (reagenssinolla), kohdan 8.9 QC-näytettä sekä tarvittaessa laimennettuja näytteitä muovisiin 100 ml titrausastioihin.

Pipetoidaan 1 ml kohdan 8.2 rikkihappoliuosta ja sekoitetaan. Lisätään 2 ml kohdan 8.3 ammoniumheptamolybdaattiliuosta, sekoitetaan ja odotetaan 10 minuuttia.

Lisätään 2 ml kohdan 8.4 oksaalihappoliuosta ja 30 - 60 s kuluessa 1 ml kohdan 8.5 pelkistysreagenssia, sekoitetaan ja odotetaan 20 minuuttia.

QC-näyte ja näytteet mitataan spektrofotometrin käyttöohjeen mukaan.

10 Tuloksen laskenta

Spektrofotometrin mittausohjelma laskee näytteiden pitoisuudet milligrammoina silikaattia litrassa standardisuoran yhtälön (1) perusteella.

Standardisuoran yhtälön:

$$\text{Abs} = k * \text{SiO}_2 \text{ (mg/l)} + b \quad (1)$$

jossa,

k =	standardisuoran kulmakerroin
abs =	mitattu absorbanssi
b =	kalibrointisuoran leikkauspiste

11 Tulosteet ja tulosten kirjaus

...

Mikäli laadunvarmistusnäytteet ovat sallittujen rajojen x-x mg/l ulkopuolella, on tarkistettava reagenssien ikä, uusittava mittaliuokset ja tarpeen vaatiessa määritettävä uusi standardisuora

12 Työsuojelu

Happoja käsitellessä noudatetaan erityistä varovaisuutta ja käytetään suojasilmälaseja sekä suojakäsineitä.

Työsuojelussa noudatetaan työsuojelukäsikirjan ohjeita sekä laboratorion työturvallisuusohjetta 1 17462.

Laboratoriokemikaalit säilytetään ja varastoidaan kemian käsikirjan ohjeen 103510 (Vaarallisten aineiden varastointi laboratoriossa) mukaisesti.

13 Liittyvät ohjeet

14 Kirjallisuus

- 1 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, 425 Silica.
- 2 Standardi ASTM D859-00, Standard Test Method for Silica in Water.

- 3 Pitkänen, P., Luukkonen, A., Ruotsalainen, P., Leino-Forsmann, H. ja Vuorinen, U., Geochemical modelling of groundwater evolution and residence time at the Olkiluoto site. Posiva 98-10, 1999.

15 Liitteet

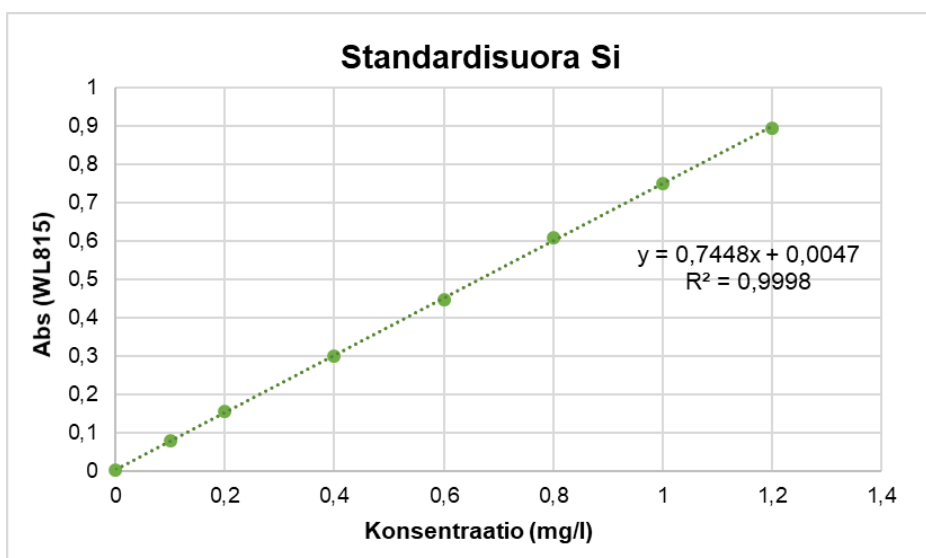
- 1 Menetelmän validointituloksia
- 2 Menetelmän laiteparametrit

Piin standardisuora

Silikan spektrofotometristä pitoisuusmäärittystä varten valmistetaan Pii-standardisuora (Si) ”Reaktiivisen silikaatin määrittäminen spektrofotometrisesti” -työohjeen mukaisesti (Turku AMK). Standardisuoran yhtälön avulla ratkaistaan näytteiden Si-pitoisuudet.

Taulukko. Piin standardisuora

Vertailuliuos	Konsentraatio (mg/l)	Abs (WL815)
0	0	0,00328
1	0,1	0,07942
2	0,2	0,15649
3	0,4	0,30089
4	0,6	0,44556
5	0,8	0,60912
6	1	0,75061
7	1,2	0,89499



Kuvio. Piin (Si) standardisuora

Standardisuoran yhtälö:

$$Abs = k \cdot SiO_2 (mg/l) + b \quad (1)$$

, jossa Abs = absorbanssi

k = standardisuoran kulmakerroin

b = kalibroitisuoran leikkauspiste

Lasketaan spektrofotometrin antamasta absorbanssiarvosta Si-konsentraatio näytteessä standardisuoran yhtälön perusteella. Esimerkkilasku:

Mitattu absorbanssi, y: 0,127

Si-konsentraatio:

$$x \left(Si \frac{mg}{l} \right) = \frac{0,127 - 0,0047}{0,7448} = 0,1642051557 \frac{mg}{l} \approx 0,164 \frac{mg}{l}$$

Bradford-proteiinimääritys GFP-proteiiniliuokselle

Työohje

Johdanto

Työssä määritetään GFP-proteiiniliuoksen (*Green fluorescent protein*) pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$) spektrofotometrisesti Bradford-kokonaisproteiinimenetelmällä standardisuoran (BSA-albumiini) avulla.

Menetelmän lineaarinen mittausalue on 1 – 25 $\mu\text{g/ml}$ mikro-mikrokuoppalevy (eng. *micro microplate protocol*) mittakaavassa (96-kuoppalevy).

Käytettävä menetelmä

Laite	Spektrofotometri kuoppalevylukijalla (esim. Hidex Sense tai Victor Wallac)
Kuoppalevy	Musta tasa- ja kirkaspohjainen 96-kuoppalevy (esim. Wallac)
Näytetilavuus (GFP)	150 μl / kuoppa
Väriainetilavuus (CBB)	150 μl / kuoppa
Sekoitusnopeus	100 – 200 rpm (kuoppalevyravistelija esim. Wallac)
Sekoitusaika	60 sekuntia
Inkubointi	10 min, RT-olosuhteissa
Aallonpituus	595 nm

Reagenssit

- Milli-Q H₂O (18,2 M Ω , Millipore)
- Albumiinistandardiliuos (esim. Thermo Scientific, Albumiini BSA, 2,0 mg/ml)
- Kaupallinen Coomassie Bradford väriaine (CBB, *Coomassie bradford brilliant*, esim. Thermo Scientific)

Standardilaimennosten valmistus

Analyysia varten valmistetaan proteiinistandardit BSA-albumiinista (2000 $\mu\text{g/ml}$) alla olevan taulukon mukaisesti. Standardilaimennokset valmistetaan Milli-Q veteen (18,2 M Ω).

Taulukko. Albumiinistandardin laimennossarjan valmistus

Pipetoitava tilavuus (H ₂ O) / µl	Pipetoitu tilavuus BSA albumiinia (mistä pitoisuudesta pipetoidaan)	Lopullinen pitoisuus (µg/ml)	Lopullinen tilavuus (µl)
2370	30 µl (2000 µg/ml)	25	2400
4950	50 µl (2000 µg/ml)	20	2400
3970	30 µl (2000 µg/ml)	15	2500
2500	2500 µl (20 µg/ml)	10	3000
2000	2000 µl (10 µg/ml)	5	2500
1500	1500 µl (5 µg/ml)	2,5	3000
5000	0 µl	0 = BLANK	5000

GFP-laimennosten valmistus

GFP-liuokset tulee tarvittaessa laimentaa niin, että liuosten pitoisuus osuu lineaariselle mittausalueella 1 – 25 µg/ml. Laimennokset tehdään Milli-Q-veteen.

Näytteiden mittaus

1. Pipetoi 150 µl jokaista standardilaimennosta ja tuntematonta GFP-näytettä 96-kuoppalevyille (vähintään 3 x rinnakkaisnäytettä).
2. Pipetoi 150 µl CBB-väriainetta standardilaimennosten ja näytteiden päälle.
3. Sekoita kuoppalevyä tehokkaasti levysekoittimessa n. 30 sekunnin ajan ja inkuboi 10 min huoneenlämmössä (RT).
4. Mittaa näytteistä absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm.
5. Laske tutkittujen proteiininäytteiden pitoisuudet saadun absorbanssin ja albumiinistandardisuoran yhtälön avulla.

Standardisuoran yhtälö:

$$Abs = k \times GFP (\mu g/ml) + b, \text{ jossa}$$

k = standardisuoran kulmakerroin

Abs = mitattu absorbanssi

b = kalibroitisuoran leikkauspiste

Lähteet

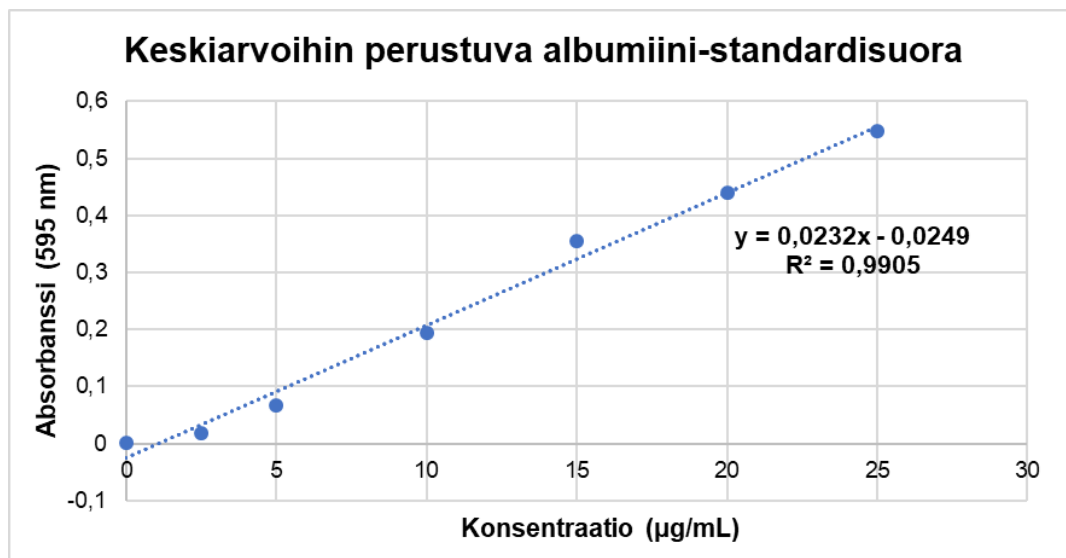
Thermo Scientific. 2013. Instructions. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit Number 23200

BSA-standardisuora (Bradford)

Vapautuneen GFP-proteiinin Bradford-pitoisuusmäärittystä varten valmistetaan albumiinistandardisuora (BSA). Standardisuoran yhtälön avulla ratkaistaan näytteiden GFP-pitoisuus.

Taulukko. Albumiinistandardisuora

Vertailuliuos	Konsentraatio (mg/l)	\bar{x} (Abs) (WL595)
0	0	0,0015
1	2,5	0,0195
2	5	0,067
3	10	0,1945
4	15	0,355
5	20	0,44
6	25	0,547



Kuvio. Absorbanssitulosten keskiarvoihin perustuva albumiini-standardisuora

Micro BCA-proteiinimääritys GFP-proteiiniliuokselle

Työohje

Johdanto

Työssä määritetään GFP-proteiiniliuoksen (*Green fluorescent protein* pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$) spektrofotometrisesti kolorometrisellä Micro BCA-kokonaisproteiinimenetelmällä standardisuoran (BSA-albumiini) avulla.

Menetelmän lineaarinen mittausalue on 0,5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ kyvettimittakaavassa.

Käytettävä menetelmä

Laite	Spektrofotometri kyvettilukijalla (esim. Shimadzu)
Kyvetit	Semi micro 2,5 ml
Näytetilavuus (GFP-liuos)	1 ml / kyvetti
WR-reagenssi (<i>working reagent</i>)	1 ml / kyvetti
Aallonpituus	562 nm
Inkubointi	60 min, 60 °C lämpökaapissa

Tarvittavat reagenssit

- Milli-Q H₂O (18,2 M Ω , Millipore)
- Albumiinistandardiliuos (esim. Thermo Scientific, Albumiini BSA, 2,0 mg/ml)
- Työliuos eli WR-reagenssi (*working reagent*): Kaupallinen Micro BCA -proteiinimäärityskitti (Thermo Scientific, 23235)

Standardilaimennosten valmistus

Analyysia varten valmistetaan proteiinistandardit BSA-albumiinista (2000 $\mu\text{g/ml}$) alla olevan taulukon mukaisesti. Standardilaimennokset valmistetaan Milli-Q veteen (18,2 M Ω).

Taulukko. Albumiinistandardin laimennossarjan valmistus

Pipetoitava tilavuus (H ₂ O) / ml	Pipetoitu tilavuus BSA albumiinia (mistä pitoisuudesta pipetoidaan)	Lopullinen pitoisuus (µg/ml)	Lopullinen tilavuus (ml)
4,5	0,5 ml (2000 µg/ml)	200	3,0
8,0	2,0 ml (200 µg/ml)	40	6,0
4,0	4,0 ml (40 µg/ml)	20	4,0
4,0	4,0 ml (20 µg/ml)	10	4,0
4,0	4,0 ml (10 µg/ml)	5,0	4,0
4,0	4,0 ml (5 µg/ml)	2,5	4,8
4,8	3,2 ml (2,5 µg/ml)	1,0	4,0
4,0	4,0 ml (1,0 µg/ml)	0,5	8,0
8,0	0 ml	0 = BLANK	8,0

GFP-laimennosten valmistus

GFP-liuokset tulee tarvittaessa laimentaa niin, että liuosten pitoisuus osuu lineaariselle mittausalueella 0,5-20 µg/ml. Laimennokset valmistetaan Milli-Q-veteen.

Työliuoksen eli WR-reagenssin valmistus

- Micro BCA -määrityksessä tarvittava WR-reagenssi (*working reagent*) tulee valmistaa mitaussuorituspäivänä. Työliuos säilyy stabiilina yhden päivän ajan valmistuksesta
- WR-reagenssin tarve yhtä näytettä kohti on 1,0 ml
- Käytä seuraavaa yhtälöä WR-reagenssin kokonaistarpeen määrittämiseen:

(Standardien kappalemäärä + Tuntemattomien näytteiden kappalemäärä) x (Rinnakkaisnäytteiden kappalemäärä) x (Tarvittavan WR-reagenssin tilavuus näytettä kohti) = Tarvittavan WR-reagenssin kokonaistilavuus (ml)

Esim. (9 kpl std + 5 kpl GFP-näytettä) x (2 kpl rinnakkaisnäytettä) x (1 ml) = 28 ml

WR-reagenssin koostumus

MA:MB:MC; 25:24:1

- Micro BCA reagenssi A (MA, osa 25)
- Micro BCA reagenssi B (MB, osa 24)
- Micro BCA reagenssi C (MC, osa 1)

Reagenssi	OSA	Esim. V(ml)
MA	25	15
MB	24	14,4
MC	1	0,6
Yhteensä	50	30,0

Näytteiden mittaus

1. Pipetoi 1,0 ml jokaista standardilaimennosta ja tuntematonta GFP-näytettä kyvetteihin (+ esim. 3 x rinnakkaisnäytettä).
2. Pipetoi 1,0 ml WR-reagenssia standardilaimennosten ja näytteiden päälle. Sekoita pipetinkärjellä imien (varo muodostamasta kuplia kyvetteihin!).
3. Päälyystä kyvetit sulkijakalvolla ja inkuboi 60 °C:ssa lämpökaapissa tai lämpöhauteessa 1 h:n ajan.
4. Anna näytteiden ja standardien jäähtyä 10 min huoneenlämmössä ja mittaa absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituudella 562 nm.
5. Laske tutkittujen proteiininäytteiden pitoisuudet saadun absorbanssin ja albumiinistandardisuoran yhtälön avulla.

Standardisuoran yhtälö:

$$Abs = k \times GFP (\mu g/ml) + b, \text{ jossa}$$

k = standardisuoran kulmakerroin

Abs = mitattu absorbanssi aallonpituudella 562 nm

b = kalibroitisuoran leikkauspiste

Lähteet

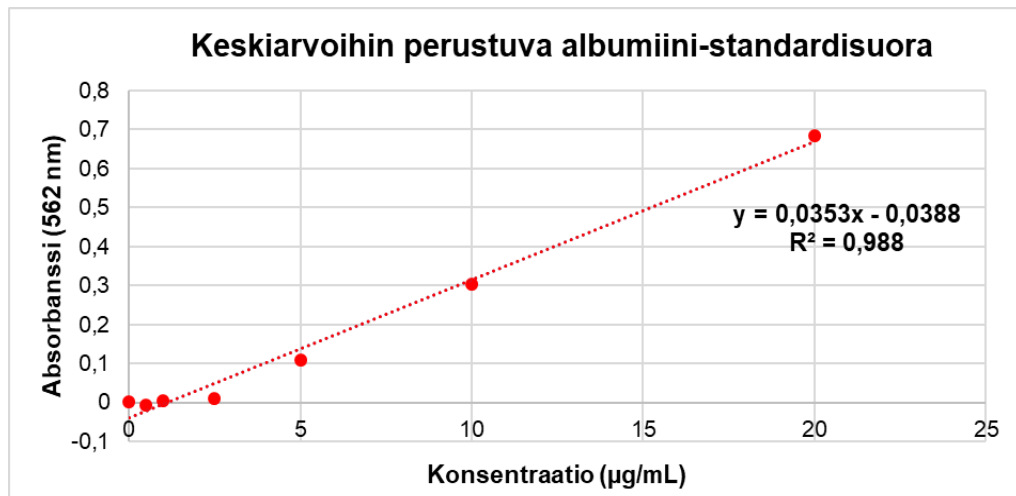
Thermo Scientific. 2015. Instructions. Micro BCA Protein Assay Kit Number 23235

BSA-standardisuora (Micro BCA)

Vapautuneen GFP-proteiinin Micro BCA-pitoisuusmäärittystä varten valmistetaan albumiinistandardisuora (BSA). Standardisuoran yhtälön avulla ratkaistaan näytteiden GFP-pitoisuus.

Taulukko. Albumiinistandardisuora

Vertailuliuos	Konsentraatio (mg/l)	\bar{x} (Abs) (WL595)
0	0	0,001
1	0,5	-0,006
2	1	0,005
3	2,5	0,01
4	5	0,108
5	10	0,303
6	20	0,685



Kuvio. Absorbanssitulosten keskiarvoihin perustuva albumiinistandardisuora

GFP:n standardisuora fluoresenssimittaukseen

Dissoluutionäytteiden GFP:n fluoresenssimittauksia varten valmistetaan kaupallisesta GFP-liuoksesta (esim. Merck, 300 µg/ 300 µl, lot #2829456, puhtaus >70 %) laimennossarja alla olevan taulukon mukaisesti. Laimennokset valmistetaan Milli-Q-veteen (18,2 MΩ).

Taulukko. GFP-laimennossarjan valmistus

Pipetoitava tilavuus (H ₂ O) / µl	Pipetoitu tilavuus BSA albumiinia (mistä pitoisuudesta pipetoidaan)	Lopullinen pitoisuus (µg/ml)	Lopullinen tilavuus (µl)
3104	96 µl (1000 µg/ml)	30	1032
1084	2168 µl (30 µg/ml)	20	1452
600	1800 µl (20 µg/ml)	15	1000
700	1400 µl (15 µg/ml)	10	1000
1100	1100 µl (10 µg/ml)	5	1000
1200	1200 µl (5 µg/ml)	2,5	1000
350	1400 µl (2,5 µg/ml)	2,0	1000
750	750 µl (2,0 µg/ml)	1,0	1000
500	500 µl (1,0 µg/ml)	0,5	1000
1000	0 µl	0 = BLANK	1000

Pipetoidaan laimennoksista 250 µl:aa / kuoppa rinnakkaisnäytteineen (esim. 3 x) 96-kuoppalevyille (esim. Wallac, musta, tasapohjainen 96-kuoppalevy) ja mitataan fluoresenssi spektrofotometrillä eksitaatioaallonpituudella 485 nm ja emissioaallonpituudella 535 nm. Dissoluutionäytteiden GFP-pitoisuus lasketaan standardisuoran yhtälön perusteella.

Taulukko. GFP:n standardisuora

Pitoisuus ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ka. Fluoresenssi (RFU, <i>Blank corrected</i>)	
30	94789	Ylivalottunut
30	95937	
30	101349	
20	49214	
20	49497	
20	51654	
15	13201	
15	14884	
15	14416	
10	1181	
10	1192	
10	1097	
5	135	
5	228	
5	240	
2,5	97	Spektrofotometrin herkkyys ei riitä
2,5	101	
2,5	65	
2	96	Spektrofotometrin herkkyys ei riitä
2	118	
2	26	
1	0	Spektrofotometrin herkkyys ei riitä
1	23	
1	3	
0,5	20	Spektrofotometrin herkkyys ei riitä
0,5	0	
0,5	0	
0	0	Spektrofotometrin herkkyys ei riitä
0	4	
0	9	

Standardisuoran yhtälö:

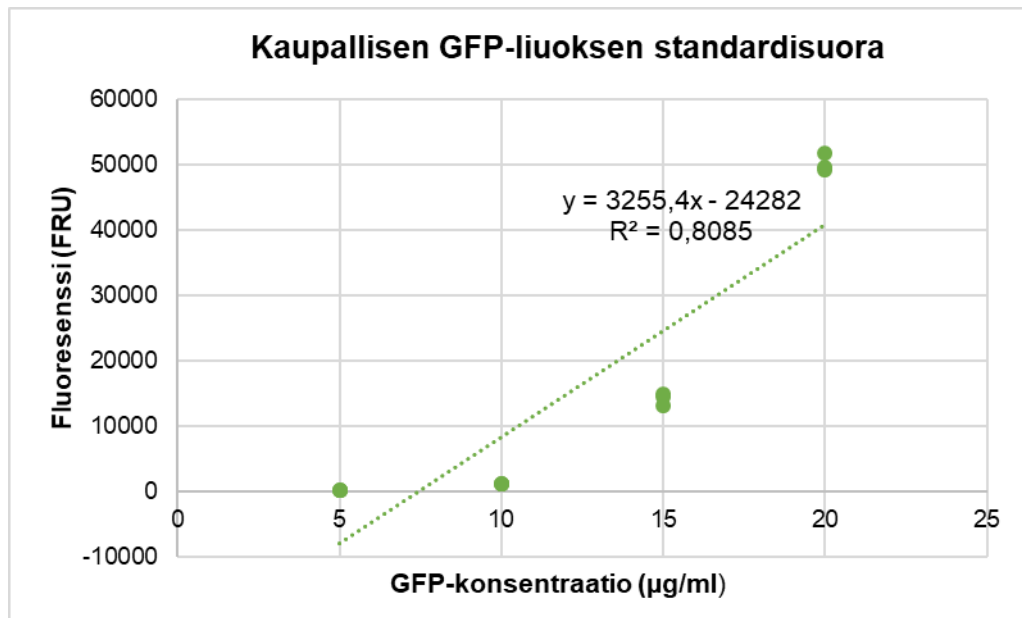
$$RFU = k \times GFP (\mu g/ml) + b$$

, jossa

RFU = fluoresenssi

k = standardisuoran kulmakerroin

b = kalibrointisuoran leikkauspiste



Kuvio. Kaupallisen GFP-liuoksen standardisuora

Fluoresenssimittaustuloksen perusteella (RFU) lasketaan GFP-konsentraatio dissoluuti-onäytteessä standardisuoran yhtälön perusteella.

Esim. Mitattu fluoresenssi $y = X$

GFP-konsentraatio:

$$x \text{ (GFP } \mu g/ml) = \frac{X + (-24282)}{3255,4} = X$$

Tris-puskurin aiheuttamat absorbanssitaustat eri analyysimenetelmillä mitattuna

Taulukko Tris-puskurin ja referenssinollan (*blank-corrected*) aiheuttamat absorbanssitaustat Bradford- ja Micro BCA -analyysissä. Tuloksista on vähennetty automaattisesti mittauksen suorituksessa Milli-Q-veden tausta, minkä vuoksi veden tausta on nolla absorbanssia.

	Tris-puskurin aiheuttama tausta <i>Blank-corrected</i> Abs (WL562)	Milli-Q-veden aiheuttama tausta <i>Blank-corrected</i> Abs (WL562)
Näyte 1	0,017	0
Näyte 2	0,013	0
Näyte 3	0,009	0

Taulukko Tris-puskurin ja referenssinollan (*blank-corrected*) aiheuttamat absorbanssitaustat Bradford-analyysissä

	Milli-Q-veden aiheuttama tausta Abs (WL595)	Keskiarvo mittaus- tuloksista Abs	Tris-puskurin aiheuttama tausta Abs (WL595)	Keskiarvo mittaus- tuloksista Abs
Näyte 1	0,3	0,314533333	0,334	0,3394
Näyte 2	0,318		0,328	
Näyte 3	0,314		0,342	
Näyte 4	0,303		0,336	
Näyte 5	0,318		0,333	
Näyte 6	0,315		0,339	
Näyte 7	0,304		0,338	
Näyte 8	0,321		0,333	
Näyte 9	0,318		0,342	
Näyte 10	0,319		0,35	
Näyte 11	0,315		0,338	
Näyte 12	0,32		0,368	
Näyte 13	0,319		0,338	
Näyte 14	0,326		0,335	
Näyte 15	0,308		0,337	

Liuenneen silikan mittaustulokset

Falcon	Näyteaika (h)	Blank corrected Abs (WL815)	Si-konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio näytettäsiiteltyyn laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
A	1	0,127	0,164	0,351	21,956	21,956	658,688	22,370	22,370
	2	0,167	0,218	0,466	29,137	15,964	478,909	16,265	38,635
	3	0,147	0,191	0,409	25,547	8,064	241,932	8,216	46,852
	4	0,118	0,152	0,325	20,341	5,012	150,373	5,107	51,958
	5	0,093	0,119	0,254	15,852	3,648	109,440	3,717	55,675
	6	0,07	0,088	0,188	11,723	2,212	66,354	2,253	57,929
	7	0,057	0,070	0,150	9,389	2,355	70,662	2,400	60,329

Falcon	Näyteaika (h)	Blank corrected Abs (WL815)	Si-konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio näytettäsiiteltyyn laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
B	1	0,095	0,121	0,259	16,211	16,211	486,341	16,517	16,517
	2	0,13	0,168	0,360	22,495	12,768	383,041	13,009	29,526
	3	0,127	0,164	0,351	21,956	8,459	253,781	8,619	38,145
	4	0,1	0,128	0,274	17,109	3,935	118,058	4,009	42,154
	5	0,079	0,100	0,213	13,339	3,074	92,206	3,131	45,286
	6	0,067	0,084	0,179	11,185	3,181	95,437	3,241	48,527
	7	0,049	0,059	0,127	7,953	1,242	37,270	1,266	49,793

Falcon	Näyteaika (h)	Blank corrected Abs (WL815)	Si-konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio näytettäsiiteltyyn laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
C	1	0,067	0,084	0,179	11,185	11,185	335,538	11,396	11,396
	2	0,115	0,148	0,317	19,802	13,091	392,735	13,338	24,734
	3	0,132	0,171	0,366	22,854	10,973	329,182	11,180	35,913
	4	0,139	0,180	0,386	24,111	10,398	311,948	10,594	46,508
	5	0,134	0,174	0,371	23,213	8,747	262,398	8,912	55,419
	6	0,126	0,163	0,348	21,777	7,849	235,469	7,997	63,416
	7	0,097	0,124	0,265	16,570	3,504	105,132	3,570	66,987

Falcon	Näyteaika (h)	Blank corrected Abs (WL815)	Si-konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio näytettäsiiteltyyn laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	SiO ₂ -konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
D	1	0,062	0,077	0,165	10,287	10,287	308,608	10,481	10,481
	2	0,109	0,140	0,300	18,725	12,553	376,578	12,789	23,270
	3	0,135	0,175	0,374	23,392	12,158	364,729	12,387	35,657
	4	0,122	0,157	0,337	21,059	7,023	210,694	7,156	42,813
	5	0,118	0,152	0,325	20,341	7,705	231,160	7,851	50,663
	6	0,093	0,119	0,254	15,852	3,648	109,440	3,717	54,380
	7	0,076	0,096	0,205	12,800	3,289	98,669	3,351	57,731

Esimerkki silikapitoisuuden laskemisesta näytteessä

Lasketaan spektrofotometrin antamasta absorbanssituloksesta (WL815 nm) Si-konsentraatio näytteessä standardisuoran kulmakertoimen avulla.

Esimerkkilasku (Liitteestä 6):

Mitattu absorbanssi, y : 0,127

Si-konsentraatio:

$$x \left(\text{Si} \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{0,127 - 0,0047}{0,7448} = 0,1642051557 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \approx 0,164 \frac{\text{mg}}{\text{l}} (= 0,164 \mu \frac{\text{g}}{\text{ml}})$$

Spektrofotometrimittaukset antavat vain piin konsentraation. Silikan konsentraatio lasketaan kertomalla tulos kertoimella $\sim 2,14$, joka saadaan silikan ja piin molekyylimassojen suhteesta:

$$\frac{M(\text{SiO}_2)}{M(\text{Si})} = \frac{28,085 + (2 \times 16,00) \text{ g/mol}}{28,085 \text{ g/mol}} = 2,1393982553 \approx 2,14$$

Taulukko Piin ja silikan konsentraation laskeminen absorbanssituloksesta (esim. Falcon A, ruisku 1)

Falcon	Näyte-aika (h)	Blank corrected Abs (WL815)	Si-konsentraatio ($\mu\text{g/ml}$)	SiO ₂ -konsentraatio ($\mu\text{g/ml}$)
A	1	0,127	$\frac{0,127 \dots - 0,0047}{0,7448} \approx 0,164$	$0,164 \dots \times 2,139 \dots \approx 0,351$
	2	0,167	0,218	0,466
	3	0,147	0,191	0,409
	4	0,118	0,152	0,325
	5	0,093	0,119	0,254
	6	0,07	0,088	0,188
	7	0,057	0,070	0,150

Seuraavaksi tuloksissa huomioidaan mittausta varten tehdyt silikanäytekäsittelyn laimennokset (1/62,5). SiO₂-konsentraatio dissoluutiopuskurissa saadaan, kun poistetaan laimennoksesta saatu osatekijä: SiO₂-konsentraatio jaetaan laimennoksen suhteella.

Lisäksi tuloksissa huomioidaan tunnin välein suoritettavan puskurinvaihdon aiheuttama laimennos näytteessä sekä edeltävän näytteen pitoisuus. Ensimmäisen tunnin näytteen ei ole tehty puskurinvaihtoa, minkä vuoksi kyseisessä konsentraatituloksessa ei tarvitse huomioida laimennosta. Muiden aikapisteiden näytteissä (2 – 7 h) laimennos huomioidaan.

Näytteiden hetkittäistä SiO_2 -konsentraatiota voidaan kuvata differentiaaliyhtälöllä:

$$c_n = c_{n-1} \left(\frac{30 - 12}{30} \right)$$

, jossa c_n on SiO_2 -konsentraatio alkuhetkellä (esim. $c_{2h}(\text{SiO}_2)$)

ja c_{n-1} on alkuhetkeä edeltävä SiO_2 -konsentraatio (esim. $c_{2h-1}(\text{SiO}_2) = c_{1h}(\text{SiO}_2)$)

ja $\left(\frac{30-12}{30} \right)$ on puskurinvaihdon aiheuttama laimennossuhde (eli $\frac{30 \text{ ml} - 12 \text{ ml}}{30 \text{ ml}}$)

Taulukko Silikan konsentraation laskeminen dissoluutiopuskurissa

Falcon	Näyte-aika (h)	SiO_2 -konsentraatio ($\mu\text{g/ml}$)	SiO_2 -konsentraatio näytekäsittelyn laimennoskorjauksen jälkeen ($\mu\text{g/ml}$)	SiO_2 -konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen ($\mu\text{g/ml}$)
A	1	0,351	$\frac{0,351 \dots}{\left(\frac{1}{62,5}\right)} \approx 21,956$	21,956
	2	0,466	$\frac{0,466 \dots}{\left(\frac{1}{62,5}\right)} \approx 29,137$	$29,137 \dots - \left[21,956 \dots \times \left(\frac{30 - 12}{30} \right) \right] \approx 15,964$
	3	0,409	25,547	8,064
	4	0,325	20,341	5,012
	5	0,254	15,852	3,648
	6	0,188	11,723	2,212
	7	0,150	9,389	2,355

Liuenneen silikan todellinen määrä jokaiselta tunnilta saadaan laskemalla tulokset kumulatiivisesti (edeltävän tunnin arvo lisätään seuraavan tunnin silikapitoisuuteen).

Esimerkki silikan liukenemisnopeuden ja geelin kokonaisliukenemisajan laskemisesta

Silikan konsentraatioarvosta (puskurinvaihdon laimennoskorjauksen) ratkaistaan liuenneen silikan massa aikapisteittäin kertomalla saatu SiO₂-konsentraatio dissoluutiitestin kokonaispuskuritilavuudella (30 ml).

Taulukko. Dissoluutiopuskuriin liuenneen silikan määrän laskeminen massoina

Falcon	Näyteaika (h)	SiO ₂ -konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)
A	1	21,956	21,956 × 30 ≈ 658,688
	2	15,964	478,909
	3	8,064	241,932
	4	5,012	150,373
	5	3,648	109,440
	6	2,212	66,354
	7	2,355	70,662

Liuenneen silikan määrä massaprosentteina lasketaan suhteuttamalla liuenneen silikan massa dissoluutiitestin geelin (100 µl) sisältämän silikan kokonaismassaan (~2944,47 µg, katso liite 2). Saadut tulokset lasketaan kumulatiivisesti.

Taulukko. Dissoluutiopuskuriin liuenneen silikan määrän laskeminen massaprosentteina ja kumulatiivisesti

Falcon	Näyteaika (h)	Liuenneen SiO ₂ :n massa (µg)	Liuenneen SiO ₂ :n m-% (%)	Liuenneen SiO ₂ :n kumulatiivinen m-% (%)
A	1	658,688	$\left(\frac{658,688 \dots}{2944,469 \dots}\right) \times 100 \% \approx 22,370$	22,370
	2	478,909	16,265	16,265 ... + 22,370 ... ≈ 38,635
	3	241,932	8,216	8,216 ... + 38,635 ... ≈ 46,852
	4	150,373	5,107	51,958
	5	109,440	3,717	55,675
	6	66,354	2,253	57,929
	7	70,662	2,400	60,329

Silikan liukenemisnopeus (m-%/h) saadaan ratkaistua jakamalla dissoluutiopuskuriin liuenneen silikan massaprosenttinen määrä 7 h:n aikana testin liuotusajalla (eli 7 h:lla). Hydrogeelin kokonaisliukenemisaika (h) ratkaistaan poistamalla liukenemisnopeudesta massaprosentit.

Ruisku	1		1	2		2
Falcon	A	B	A:n ja B:n keskiarvo	C	D	C:n ja D:n keskiarvo
Dissoluutiopuskuriin liuenneen SiO ₂ :n määrä 7 h:n aikana (m-%)	60,329	49,793	55,061	66,987	57,731	62,359
SiO ₂ :n liukenemisnopeus (m-%/h)	$\frac{60,329 \dots}{7}$ ≈ 8,618	7,113	$\frac{55,061 \dots}{7}$ ≈ 7,866	9,570	8,247	8,908
Geelin kokonaisliukenemisaika (h)	$\frac{100}{8,618 \dots}$ ≈ 11,603	14,058	$\frac{100}{7,866 \dots}$ ≈ 12,713	10,450	12,125	11,225

GFP:n teoreettisen vapautumisnopeuden laskeminen

Silikan liukenemisnopeus määrittää GFP:n vapautumisnopeuden. Lasketaan ensin tuntikohtaiset keskiarvot liuenneen silikan massasta ruiskun 2 geelin silikan liukenemismittaustuloksista.

Taulukko. Liuenneen silikan massan tuntikohtaisten keskiarvojen laskeminen

Ruisku 2	Liuenneen SiO ₂ :n massa näytekäsittelyn ja puskurivaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg)		Keskiarvoon perustuvan liuenneen SiO ₂ :n massa puskurivaihdon ja laimennoskorjauksen jälkeen (µg)
	C	D	
Falcon Näyteaika (h)			
1	335,538	308,608	$\frac{335,538 + 308,608}{2} \approx 322,073$
2	392,735	376,578	384,657
3	329,182	364,729	346,956
4	311,948	210,694	261,321
5	262,398	231,160	246,779
6	235,469	109,440	172,455
7	105,132	98,669	101,900

Liuenneen silikan massasta lasketaan GFP-proteiinia vapautuva määrä (eli ~5 %). Koska tiedetään GFP:n massa (~14719,95 µg, katso liite 2) ja silikan massa geelissä (~294446,9 µg, katso liite 2) saadaan laskettua GFP:n tarkka osuus silikan massa suhteutettuna:

$$\begin{aligned} \text{GFP:n tarkka osuus SiO}_2 \text{ massasta (100 \%)} &= \frac{m(\text{GFP geelissä})}{m(\text{SiO}_2 \text{ geelissä})} \\ &= \frac{14719,95 \mu\text{g}}{294446,9 \mu\text{g}} \times 100\% \approx 4,9992\% \end{aligned}$$

Lasketaan tarkkaa GFP-osuutta (suhteessa silikan massa) käyttäen vapautuneen GFP:n massa teoriassa 7 h:n ajalta kertomalla liuenneen SiO₂:n massa GFP:n osuudella (~0,04992). Vapautuneen GFP:n määrä massaprosentteina lasketaan suhteuttamalla vapautuneen GFP:n massa dissoluutiotestin geelin (100 µl) sisältämän GFP:n laskennalliseen kokonaisuuteen (~147,223 µg, katso liite 2). Saadut tulokset lasketaan kumulatiivisesti.

Taulukko. GFP:n teoreettisen vapautumisen laskeminen

Näyte-aika (h)	Keskiarvoon perustuvan liuenneen SiO ₂ :n massa puskurivaihdon ja laimennoskorjausten jälkeen (µg)	Vapautuneen GFP:n massa teoriassa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% teoriassa (%)	Vapautuneen GFP:n m-% kumulatiivisena, teoriassa (%)
1	322,073	$322.073 \dots \times 0,04992 \dots \approx 16,101$	$\left(\frac{16,101 \dots}{147,223 \dots}\right) \times 100 \% \approx 10,936$	10,936
2	384,657	19,230	13,062	$13,062 \dots + 10,936 \dots \approx 23,998$
3	346,956	17,345	11,781	$11,781 \dots + 23,998 \dots \approx 35,779$
4	261,321	13,064	8,874	44,653
5	246,779	12,337	8,380	53,033
6	172,455	8,621	5,856	58,889
7	101,900	5,094	3,460	62,349

Lasketaan lisäksi vapautuneen GFP:n pitoisuus teoriassa jakamalla vapautuneen GFP:n massa dissoluutiotestin puskuritulavuudella (30 ml). Lasketaan saadut tulokset kumulatiivisesti.

Taulukko. Vapautuneen GFP:n pitoisuus teoriassa

Näyte-aika (h)	Vapautuneen GFP:n massa teoriassa (µg)	Vapautuneen GFP:n pitoisuus teoriassa (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n pitoisuus kumulatiivisena (µg/ml)
1	16,101	$\frac{16,101 \dots}{30} \approx 0,537$	0,537
2	19,230	0,641	1,178
3	17,345	0,578	1,756
4	13,064	0,435	2,191
5	12,337	0,411	2,603
6	8,621	0,287	2,890
7	5,094	0,170	3,060

Liitteen 15 laskujen perusteella dissoluutiopuskuriin liuenneen ruiskun 2 geelin silikan liukenemisnopeuden keskiarvoksi saatiin ~8,91 m-%/h. Tämä on myös GFP:n teoreettinen liukenemisnopeus. Määritetään proteiinin teoreettinen liukenemisnopeus pitoisuusyksikkönä (µg/ml) tuntia kohden jakamalla 7 h:n aikana liuenneen kokonais-GFP-määrä (~3,060 µg/ml) kokonaisliuotusajalla (7 h).

$$\frac{3,060 \frac{\mu g}{ml}}{7 h} \approx 0,43711 \frac{\mu g}{ml} / h$$

Ratkaistaan saadusta tuloksesta GFP-proteiinin teorettinen kokonaiskonsentraatio disoluutiotestissä geelin kokonaisliukenemisen jälkeen: kerrotaan teorettisen GFP:n ratkaistu liukenemisnopeus (0,43711 $\mu g/ml$ /h) geelin kokonaisliukenemisajalla (~11,255 h, katso liite 15).

$$0,43711 \frac{\mu g}{ml} / h \times 11,255 \dots h \approx 4,90665 \mu g/ml$$

GFP:n vapautumismittaustulokset eri analyysimenetelmillä

Bradford-analyysin mittaustulokset

Tulosten laskemiseen on käytetty liitteen 8 standardisuoran yhtälöä.

Falcon	Näyte-aika (h)	OD(595)	Blank corrected OD(595)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
A	1	0,451	0,122	6,331896552	6,245689655	6,245689655	187,3706897	127,26959	127,26959
	1	0,439	0,109	5,771551724					
	1	0,459	0,129	6,63362069					
	2	0,76	0,43	19,60775862	3,918103448	0,170689655	5,120689655	3,478175131	130,7477652
	2	0,396	0,066	3,918103448					
	2	0,409	0,08	4,521551724					
	3	0,364	0,034	2,538793103	2,438218391	0,087356322	2,620689655	1,780076162	132,5278413
	3	0,366	0,037	2,668103448					
	3	0,353	0,024	2,107758621					
	4	0,351	0,022	2,021551724	1,518678161	0,055747126	1,672413793	1,135969656	133,663811
	4	0,317	0	1,073275862					
	4	0,339	0,009	1,461206897	1,806034483	0,894827586	26,84482759	18,23406963	151,8978806
	5	0,348	0,018	1,849137931					
	5	0,352	0,022	2,021551724					
	5	0,34	0,011	1,547413793	2,222701149	1,13908046	34,17241379	23,21125626	175,1091369
	6	0,355	0,025	2,150862069					
	6	0,367	0,037	2,668103448	2,524425287	1,190804598	35,72413793	24,26524873	199,3743856
6	0,348	0,018	1,849137931						
7	0,374	0,045	3,012931034	2,524425287	1,190804598	35,72413793	24,26524873	199,3743856	
7	0,361	0,031	2,409482759						
7	0,355	0,025	2,150862069						

Falcon	Näyte-aika (h)	OD(595)	Blank corrected OD(595)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
B	1	0,483	0,153	7,668103448	5,972701149	5,972701149	179,1810345	121,706852	121,706852
	1	0,414	0,084	4,693965517					
	1	0,434	0,104	5,556034483					
	2	0,429	0,1	5,38362069	4,543103448	0,959482759	28,78448276	19,55156021	141,2584122
	2	0,42	0,09	4,952586207					
	2	0,4	0,071	4,13362069	3,012931034	0,287068966	8,612068966	5,849658175	147,1080704
	3	0,38	0,051	3,271551724					
	3	0,339	0,01	1,504310345					
	3	0,369	0,039	2,754310345	2,538793103	0,731034483	21,93103448	14,89642683	162,0044972
	4	0,372	0,042	2,88362069					
	4	0,363	0,033	2,495689655	1,691091954	0,167816092	5,034482759	3,419619994	165,4241172
	4	0,356	0,027	2,237068966					
	5	0,373	0,043	2,926724138					
	5	0,325	0	1,073275862	2,064655172	1,05	31,5	21,39604702	186,8201643
	5	0,309	0	1,073275862					
	6	0,356	0,026	2,193965517	2,725574713	1,486781609	44,60344828	30,29642783	217,1165921
	6	0,342	0,012	1,590517241					
6	0,361	0,031	2,409482759						
7	0,366	0,036	2,625	2,725574713	1,486781609	44,60344828	30,29642783	217,1165921	
7	0,32	0	1,073275862						
7	0,409	0,079	4,478448276						

Falcon	Näyte-aika (h)	OD(595)	Blank corrected OD(595)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatio-tuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
C	1	0,365	0,05	3,228448276	4,909482759	4,909482759	147,2844828	100,0414514	100,0414514
	1	0,447	0,132	6,762931034					
	1	0,4	0,085	4,737068966					
	2	0,387	0,073	4,219827586	3,659482759	0,713793103	21,4137931	14,545096	114,5865474
	2	0,374	0,06	3,659482759					
	2	0,375	0,06	3,659482759					
	3	0,346	0,031	2,409482759	2,387931034	0,192241379	5,767241379	3,917338658	118,503886
	3	0,339	0,024	2,107758621					
	3	0,344	0,03	2,36637931					
	4	0,324	0,009	1,461206897	1,418103448	-0,014655172	-0,439655172	-0,298631198	118,2052548
	4	0,322	0,007	1,375					
	4	0,051	0	1,073275862					
	5	0,349	0,034	2,538793103	2,481321839	1,63045977	48,9137931	33,22418467	151,4294395
	5	0,343	0,028	2,280172414					
	5	0,351	0,036	2,625					
	6	0,368	0,054	3,400862069	2,625	1,136206897	34,0862069	23,15270113	174,5821406
	6	0,339	0,024	2,107758621					
6	0,344	0,03	2,36637931						
7	0,348	0,034	2,538793103	2,639367816	1,064367816	31,93103448	21,6888227	196,2709633	
7	0,347	0,032	2,452586207						
7	0,357	0,043	2,926724138						

Falcon	Näyte-aika (h)	OD(595)	Blank corrected OD(595)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatio-tuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
D	1	0,411	0,097	5,254310345	5,326149425	5,326149425	159,7844828	108,5319462	108,5319462
	1	0,422	0,107	5,685344828					
	1	0,407	0,092	5,038793103					
	2	0,402	0,088	4,86637931	3,61637931	0,420689655	12,62068966	8,572472041	117,1044183
	2	0,375	0,06	3,659482759					
	2	0,373	0,058	3,573275862					
	3	0,361	0,046	3,056034483	3,336206897	1,16637931	34,99137931	23,76753006	140,8719483
	3	0,369	0,055	3,443965517					
	3	0,374	0,059	3,61637931					
	4	0,363	0,049	3,185344828	2,783045977	0,781321839	23,43965517	15,92114172	156,7930901
	4	0,349	0,034	2,538793103					
	4	0,35	0,036	2,625					
	5	0,349	0,034	2,538793103	2,337643678	0,667816092	20,03448276	13,60821381	170,4013039
	5	0,34	0,026	2,193965517					
	5	0,342	0,028	2,280172414					
	6	0,359	0,044	2,969827586	2,395114943	0,992528736	29,77586207	20,22494428	190,6262482
	6	0,336	0,021	1,978448276					
6	0,342	0,027	2,237068966						
7	0,368	0,054	3,400862069	2,581896552	1,144827586	34,34482759	23,32836654	213,9546147	
7	0,347	0,032	2,452586207						
7	0,334	0,019	1,892241379						

Micro BCA -analyysin mittaustulokset

Tulosten laskemiseen on käytetty liitteen 10 standardisuoran yhtälöä.

Falcon	Näyte-aika (h)	Abs(562)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
A	1	0,033	2,033994334	2,015108593	2,015108593	60,45325779	41,06224591	41,06224591
	1	0,033	2,033994334					
	1	0,031	1,97733711					
	2	0,026	1,835694051	1,845136922	0,636071766	19,08215297	12,96135372	54,02359963
	2	0,026	1,835694051					
	2	0,027	1,864022663					
	3	0,028	1,892351275	1,797922568	0,690840415	20,72521246	14,07738477	68,10098441
	3	0,026	1,835694051					
	3	0,02	1,66572238					
	4	0,016	1,552407932	1,618508026	0,539754485	16,19263456	10,99867843	79,09966284
	4	0,019	1,637393768					
	4	0,02	1,66572238					
	5	1,434	41,7223796	1,722379603	0,751274788	22,53824363	15,30886731	94,40853015
	5	0,022	1,722379603					
	5	0,022	1,722379603					
	6	0,05	2,515580737	2,232294618	1,198866856	35,96600567	24,42953487	118,838065
6	0,271	8,776203966						
6	0,03	1,949008499						
7	0,02	1,66572238	1,694050992	0,354674221	10,64022663	7,227263151	126,0653282	
7	0,02	1,66572238						
7	0,023	1,750708215						

Falcon	Näyte-aika (h)	Abs(562)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
B	1	0,017	1,580736544	1,580736544	1,580736544	47,42209632	32,21096516	32,21096516
	1	0,018	1,609065156					
	1	0,016	1,552407932					
	2	0,044	2,345609065	2,383380548	1,434938621	43,04815864	29,24001354	61,4509787
	2	0,046	2,402266289					
	2	0,046	2,402266289					
	3	0,038	2,175637394	2,185080264	0,755051936	22,65155807	15,38583497	76,83681367
	3	0,037	2,147308782					
	3	0,04	2,232294618					
	4	0,031	1,97733711	2,015108593	0,704060434	21,12181303	14,34677158	91,18358525
	4	0,034	2,062322946					
	4	0,032	2,005665722					
	5	0,026	1,835694051	1,939565628	0,730500472	21,91501416	14,88554519	106,0691304
	5	0,027	1,864022663					
	5	0,036	2,11898017					
	6	0,027	1,864022663	1,930122757	0,766383381	22,99150142	15,61673795	121,6858684
	6	0,03	1,949008499					
	6	0,031	1,97733711					
	7	0,148	5,291784703	1,963172805	0,80509915	24,1529745	16,40565645	138,0915248
7	0,031	1,97733711						
7	0,03	1,949008499						

Falcon	Näyte-aika (h)	Abs(562)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatio-tuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
C	1	0,03	1,949008499	1,96789424	1,96789424	59,0368272	40,10015018	40,10015018
	1	0,03	1,949008499					
	1	0,032	2,005665722					
	2	0,018	1,609065156	1,694050992	0,513314448	15,39943343	10,45990482	50,56005499
	2	0,023	1,750708215					
	2	0,022	1,722379603					
	3	0,016	1,552407932	1,618508026	0,602077432	18,06232295	12,2686448	62,82869979
	3	0,017	1,580736544					
	3	0,022	1,722379603					
	4	0,042	2,288951841	2,525023607	1,553918791	46,61756374	31,66449479	94,49319457
	4	0,015	1,52407932					
	4	0,094	3,76203966					
	5	0,017	1,580736544	2,128423041	0,613408876	18,40226629	12,49954777	106,9927423
	5	0,018	1,609065156					
	5	0,074	3,195467422					
	6	0,031	1,97733711	1,509915014	0,23286119	6,985835694	4,745056158	111,7377985
	6	0,015	1,52407932					
6	0,014	1,495750708						
7	0,013	1,467422096	1,448536355	0,542587347	16,2776204	11,05640417	122,7942027	
7	0,011	1,410764873						
7	0,013	1,467422096						

Falcon	Näyte-aika (h)	Abs(562)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatio-tuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
D	1	0,024	1,779036827	1,986779981	1,986779981	59,60339943	40,48498847	40,48498847
	1	0,029	1,920679887					
	1	0,041	2,260623229					
	2	0,016	1,552407932	1,59490085	0,402832861	12,08498584	8,208600799	48,69358927
	2	0,019	1,637393768					
	2	0,061	2,827195467					
	3	0,011	1,410764873	1,930122757	0,973182247	29,19546742	19,83071726	68,52430653
	3	0,016	1,552407932					
	3	0,061	2,827195467					
	4	0,031	1,97733711	1,788479698	0,630406043	18,9121813	12,84590224	81,37020877
	4	0,027	1,864022663					
	4	0,015	1,52407932					
	5	0,014	1,495750708	1,571293673	0,498205855	14,94617564	10,15203418	91,52224295
	5	0,021	1,694050992					
	5	0,015	1,52407932					
	6	0,054	2,628895184	1,911237016	0,968460812	29,05382436	19,73450769	111,2567506
	6	0,015	1,52407932					
6	0,017	1,580736544						
7	0,078	3,30878187	1,779036827	0,632294618	18,96883853	12,88438606	124,1411367	
7	0,033	2,033994334						
7	0,015	1,52407932						

Fluoresenssimittaustulokset

Tulosten laskemiseen on käytetty liitteen 11 standardisuoran yhtälöä.

Falcon	Näyte-aika (h)	Blank corrected (RFU)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
A	1	64461	27,26024452	27,88648604	27,88648604	836,5945813	568,2481587	568,2481587
	1	66506	27,88843153					
	1	68532	28,51078209					
	2	21113	13,94452295	14,30576888	-2,42612275	-72,7836825	-49,43755851	518,8106002
	2	22617	14,40652454					
	2	23137	14,56625914					
	3	6823	9,554893408	9,605783211	1,022321886	30,66965657	20,83204489	539,6426451
	3	7502	9,763469927					
	3	6641	9,4989863					
	4	903	7,736376482	7,735250148	1,971780222	59,15340665	40,17933556	579,8219806
	4	862	7,723782024					
	4	933	7,74559194					
	5	16	7,463906125	7,462267822	2,821117733	84,63353198	57,48644539	637,308426
	5	0	7,458991215					
	5	16	7,463906125					
	6	0	7,458991215	7,464110913	2,98675022	89,6025066	60,86156966	698,1699957
	6	28	7,467592308					
6	22	7,465749217						
7	0	7,458991215	7,459298397	2,980831849	89,42495546	60,7409699	758,9109656	
7	0	7,458991215						
7	3	7,45991276						

Falcon	Näyte-aika (h)	Blank corrected (RFU)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
B	1	85223	33,6379554	34,46222686	34,46222686	1033,866806	702,2432632	702,2432632
	1	88187	34,54844259					
	1	90309	35,20028261					
	2	38173	19,18504638	18,1573181	-2,520018021	-75,60054064	-51,35088007	650,8923832
	2	33276	17,68077656					
	2	33033	17,60613135					
	3	10095	10,55999263	10,59214433	-0,302246524	-9,067395712	-6,158934127	644,733449
	3	10033	10,54094735					
	3	10471	10,67549303					
	4	2039	8,085335135	8,015604841	1,66031824	49,80954721	33,83261633	678,5660654
	4	1747	7,995638017					
	4	1650	7,965841371					
	5	0	7,458991215	7,45940079	2,650037886	79,50113657	54,00031925	732,5663846
	5	0	7,458991215					
	5	4	7,460219942					
	6	0	7,458991215	7,461039094	2,98539862	89,56195859	60,83402785	793,4004125
	6	0	7,458991215					
6	20	7,465134853						
7	0	7,458991215	7,460834306	2,98421085	89,52632549	60,80982444	854,2102369	
7	3	7,45991276						
7	15	7,463598943						

Falcon	Näyte-aika (h)	Blank corrected (RFU)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
C	1	69891	28,92824231	28,6973439	28,6973439	860,920317	584,7711614	584,7711614
	1	68242	28,42169933					
	1	69285	28,74209007					
	2	30651	16,87442403	17,04880097	-0,169605374	-5,088161209	-3,456080523	581,3150809
	2	32658	17,49093813					
	2	30347	16,78104073					
	3	10123	10,56859372	10,66177223	0,432491655	12,97474965	8,812963604	590,1280445
	3	10258	10,61006328					
	3	10898	10,8066597					
	4	1223	7,834674694	7,80723311	1,410169769	42,30509308	28,73529399	618,8633384
	4	1141	7,809485777					
	4	1037	7,77538859					
	5	4	7,460219942	7,465851611	2,781511745	83,44535234	56,67938674	675,5427252
	5	28	7,467592308					
	5	35	7,469742582					
	6	0	7,458991215	7,463394155	2,983883189	89,51649567	60,80314763	736,3458728
	6	12	7,462677398					
	6	31	7,468513854					
	7	7	7,461141488	7,459707972	2,981671479	89,45014438	60,75807921	797,103952
7	0	7,458991215						
7	0	7,458991215						

Falcon	Näyte-aika (h)	Blank corrected (RFU)	GFP-konsentraatio (µg/ml)	Keskiarvo GFP-konsentraatiotuloksista (µg/ml)	GFP-konsentraatio puskurinvaihdon laimennoskorjauksen jälkeen (µg/ml)	Vapautuneen GFP:n massa (µg)	Vapautuneen GFP:n m-% (%)	Vapautuneen GFP:n kumulatiivinen m-% (%)
D	1	60940	26,178657	26,08578567	26,08578567	782,5735701	531,5549493	531,5549493
	1	62641	26,70117343					
	1	58332	25,37752657					
	2	27512	15,91018001	15,95574533	0,304273924	9,128217731	6,20024685	537,7551961
	2	27163	15,80297352					
	2	28306	16,15408245					
	3	9051	10,23929471	10,15748193	0,584034732	17,52104196	11,90098532	549,6561814
	3	8457	10,05682865					
	3	8846	10,17632242					
	4	473	7,60428826	7,599168561	1,504679404	45,14038213	30,66113456	580,317316
	4	405	7,583399889					
	4	491	7,609817534					
	5	27	7,467285126	7,463086973	2,903585837	87,10757511	59,16691342	639,4842294
	5	8	7,46144867					
	5	5	7,460527124					
	6	4	7,460219942	7,464008519	2,986156335	89,58469005	60,84946796	700,3336974
	6	2	7,459605578					
	6	43	7,472200037					
	7	20	7,465134853	7,463701337	2,985296226	89,55888677	60,83194135	761,1656387
7	0	7,458991215						
7	26	7,466977944						

Esimerkkilasku GFP-mittaustulosten laskemisesta

Lasketaan spektrofotometrin antamasta absorbanssi-/fluoresenssituloksesta (WL815 nm) GFP-konsentraatio näytteessä standardisuoran kulmakertoimen avulla (Bradfordissa käytetty standardisuora liitteessä 8, Micro BCA:ssa käytetty liitteessä 10 ja fluoressissä käytetty liitteessä 11).

Esimerkkilasku Bradfordilla saaduista tuloksista (Ruisku 1, Falcon A, näyteaika 1 h):

Mitattu absorbanssi (*blank corrected*), y : 0,122 (sij. liitteen 7 standardisuoran yhtälöön)

GFP-konsentraatio:

$$c(GFP) = \frac{Abs - b}{k} = \frac{0,122 - (-0,0249)}{0,0232} = 6,3318 \dots \mu g/ml$$

Lasketaan kaikista rinnakkaisnäytteistä GFP:n pitoisuus, ja lasketaan lopuksi saaduista tuloksista keskiarvo.

$$\bar{x}(c(GFP)) = \frac{(6,3310\dots + 5,7715 \dots + 6,6336 \dots) \mu g/ml}{3} = 6,2456 \dots \mu g/ml$$

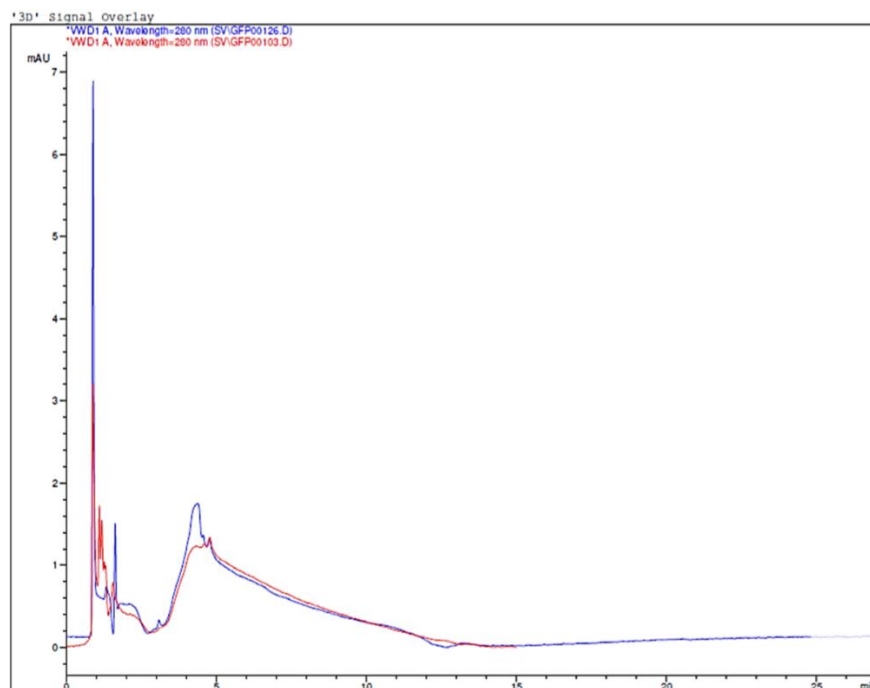
...

GFP:n keskiarvokonsentraatiotuloksista huomioidaan seuraavaksi puskurivaihdon aiheuttama laimennos silikanäytteiden tulosten käsittelyn mukaisesti differentiaaliyhtälöllä (katso liite 14). (Huom! Laimennos huomioidaan ainoastaan aikapisteiden 2 – 7 h näytteissä!)

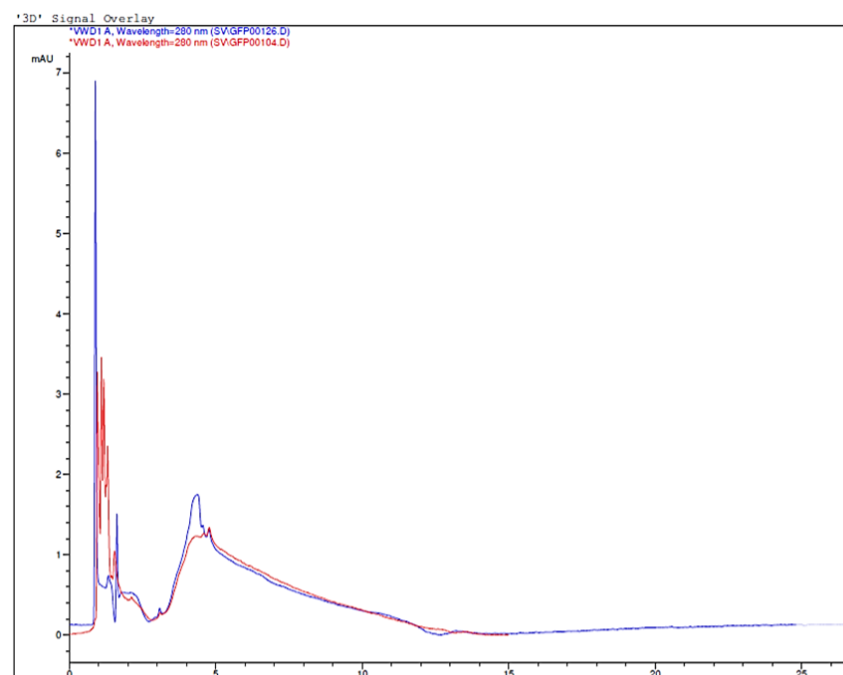
Vapautuneen GFP:n massa aikapisteittäin ratkaistaan kertomalla puskurilaimennoskorjauksen jälkeen saatu GFP-konsentraatio dissoluutiotestin kokonaispuskuritulavuudella (30 ml). Vapautuneen GFP:n määrä massaprosentteina lasketaan suhteuttamalla vapautuneen proteiinin massa dissoluutiotestin geelin (100 μ l) sisältämän GFP:n kokonaisuomassa (~147,22 μ g, liite 2) (katso liite 14, esimerkkilasku liuenneen silikan määrän laskemisesta massoina ja massaprosentteina). Saadut tulokset lasketaan kumulatiivisesti.

GFP-liuosten kromatogrammitulokset (RP-HPLC-UV/Vis)

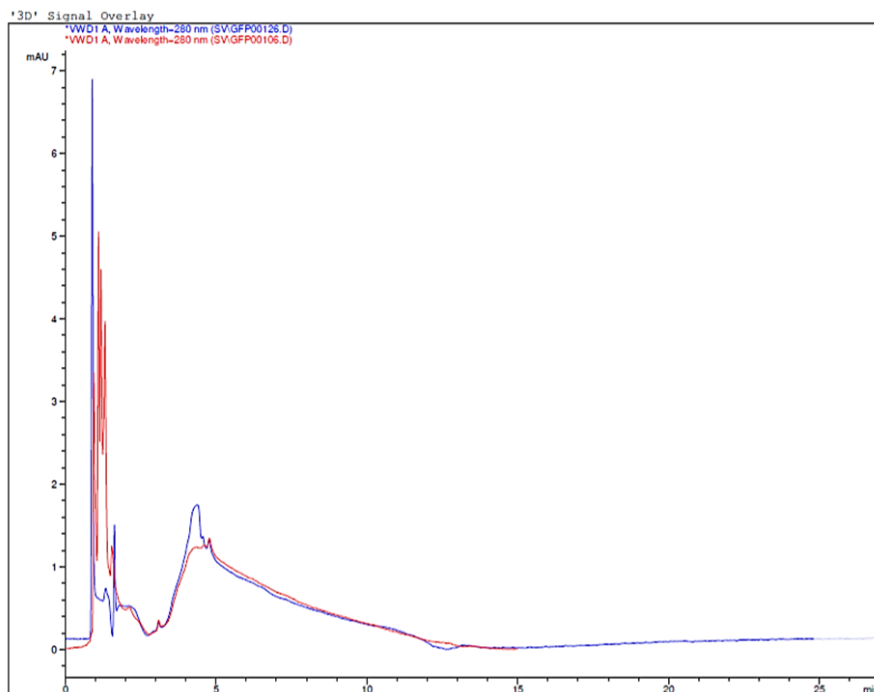
Alla on esitelty RP-HPLC-UV/Vis –ajojen tuloksia kaupallisen GFP-liuoksen ja itsetuotetun GFP-liuoksen määrittämiseen taulukon 2 (katso opinnäytetyön s. 52) ajo-ominaisuuksia käyttäen.



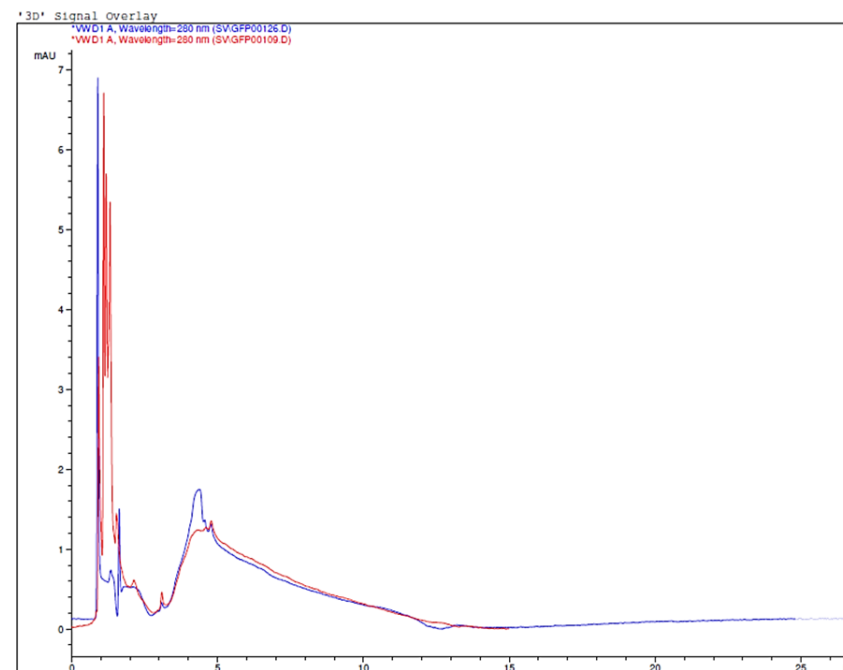
Kuvio 1 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, pitoisuus ~100 µg/ml) kromatogrammitulokset



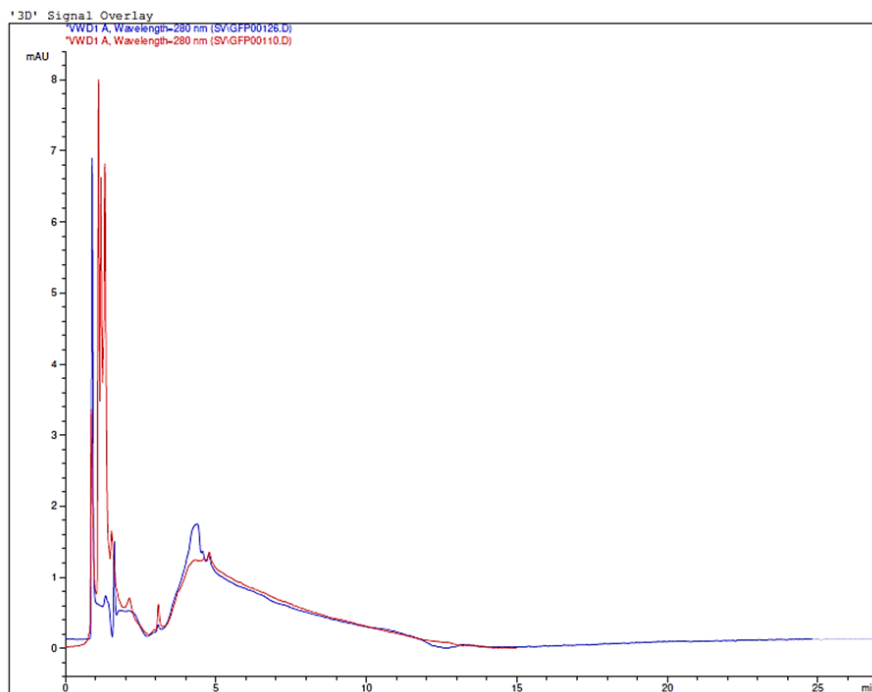
Kuvio 2 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, pitoisuus ~200 µg/ml) kromatogrammitulokset



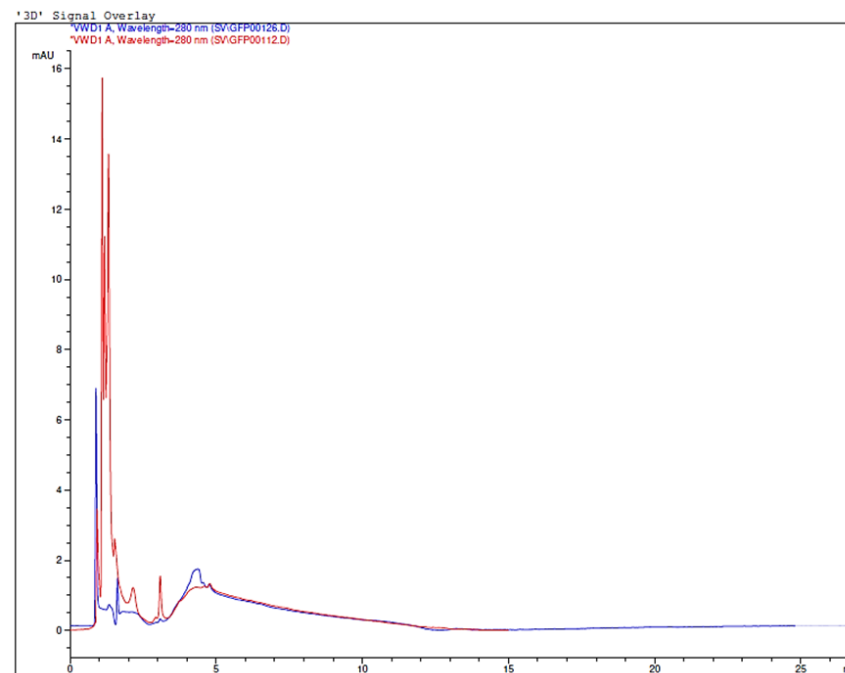
Kuvio 3 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, pitoisuus ~300 µg/ml) kromatogrammitulokset



Kuvio 4 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, pitoisuus ~400 µg/ml) kromatogrammitulokset



Kuvio 5 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, pitoisuus ~500 µg/ml) kromatogrammitulokset



Kuvio 6 Kaupallisen GFP-liuoksen (siniset piikit, pitoisuus 30 µg/ml) ja itsetuotetun GFP-liuoksen (punaiset piikit, pitoisuus ~1000 µg/ml) kromatogrammitulokset

RP-HPLC-UV/Vis –menetelmän työohje GFP-proteiiniliuoksen määrittämiseen

Menetelmäohje & ohjeistus menetelmän kehittämisen jatkajaa varten

Yleisohjeistus HPLC:n käyttöön

Tarvittavat reagenssit ja välineet:

- HPLC-UV/Vis detektorilla (esim. Agilent 1100)
- HPLC-näytevialaja
- RP-HPLC -kolonni (esim. 4,6 mm x 15 cm, Agilent Eclipse XDB-C18, 5 µm)
- Ruiskusuodattimia (45 µm tai 22 µm) ja ruiskuja
- Ajoliuokset
 - A: milli Q H₂O + 0,1 % TFA
 - B: ACN + 0,1% TFA
- Pesuliuos C: H₂O + ACN 50:50

Laitteiston käynnistys:

- Käynnistä virta vakuumikaasunpoistoyksikköön, pumppuun, detektoriin, automaatti-injektoriin ja tietokoneeseen
- Käynnistä *ChemStation online* -ohjelmisto

Laitteiston huuhtelu eli *PURGE*-ajo:

- Ennen ajoa, jokainen käytettävä linja pitää huuhdella (*PURGE*) ennen käyttöä. Valmista ajo- ja pesuliuokset ja aseta ne linjoihin A, B, C tai D. Huuhtelu tapahtuu seuraavasti:
 - Avaa *PURGE*-venttiili (ajoliuokset menevät suoraan jäteastiaan)
 - Valitse alasetoalasta *Instrument. Set up Pump*: Valitse käyttämäsi linja (A, B, C tai D) ja kirjoita liuottimelle valitsemasi prosenttiosuus (esim. opinnäytetyössä käytetty A: 40 %, B: 30 % ja C: 30 %)
 - Valitse maksimipaineeksi 200 bar ja min paineeksi 0 bar
 - Aseta virtaukseksi 5 ml/min tai 10 ml/min (*flow*)
 - Huuhtele n. 10 – 15 min ajan

Menetelmän luominen:

- Valitse *Method: New method (LC parameters)*
- Valitse *Method: Edit entire method*
 - Max paine valitaan käytettävän kolonnin mukaan (esim. 350 bar), min paine (esim. 0 tai 10 bar) (Opinnäytetyön ajon aikana toimivan kolonnin paine tavallisesti n. 60 bar)

- Ajoaika (esim. + 30 min)
- Käytettävät ajoliuokset (ajo- ja pesuliuosten tiedot)
- Injektiotilavuus (vaihdellen 5 – 10 µl, esim. 5 µl, 8 µl ja 10 µl, pystytään säätämään piikin korkeuksia)
- Mitattava aallonpituus: esim. 280 nm *wavelength* (*peak width, responsetime*: > 0,1 min (2 s))
- Kolonnin lämmitysasetukset: 40 °C

Menetelmän tallennus työn alussa:

- Tallennuspaikkavalinta: *Method: Save method as, Save method*

Menetelmän asetusten muutostenteko (tallennettuun menetelmään)

- *Set up Pump*: Gradientin teko: *Timetable*
- *Set up Injector*: Injektioasetukset ja parametrit
- *Set up Column Thermostat*: Kolonnin lämpöasetukset
- *Set up WVD Signal*: Mitattava aallonpituus
- Samoihin asetuksiin pääsee myös valitsemalla *Method: Edit entire method*

Ajon/ajojen tallennus

- Ajon tallennus ja tiedot: *Sequence parameters* HUOM! Muista nimetä jokainen ajo ennen ajon alkua! Muuten ajon tiedot tallentuvat vanhojen päälle!
 - Nimeäminen: etuliite, esim. GFP ja nimikirjaimet SV ja loppuliite: numerokoodi yksittäisille ajoille alkaen esim. 001, 002... jne,
 - HUOM! Numerointi muutettava ja tallennettava jokaisen ajon yhteydessä!
- Tallennus ensimmäisen kerran: *Save sequence as* (ensimmäisen kerran valitaan tallennuspaikka)
- Tallennus ennen uusien ajojen suorittamista: *Save sequence* (tallentuu aikaisemmin valittuun tallennuspaikkaan)

Ajomenetelmän tekeminen

- *Sequence table*
 - *Line*: 1
 - *Location*: esim. Vial 1 (Valitse vialin paikka injektio paikasta)
 - *Sample name* (Näytenimi)
 - *Method name* (Valitse luomasi menetelmä, esim. GFP-SV)
 - *Injection/ Location*: 1 (Rinnakkaisajokertojen valinta)
 - *Sample type* (Valitse ajotyyppi: *Sample/ Control sample/ Calibration*)
- *Save Sequence as/ Save sequence*

Kolonnin tasapainotus

- Tasapainota vähintään 20 – 30 min, kunnes *baseline* on suora
- Valitse virtaukseksi esim. 1 ml/min (*flow*)
 - *Purge*-venttiili kevyesti kiinni, ajoliuokset virtaavat kolonniin
 - Valitse *Balance/Adjust*, jotta *baseline* suoristuu

Näytteen ajo

- Valmista laimennokset mitattavasta näytteestäsi (tarvittava määrä näytettä vialiin min 0,5 ml – 1,5 ml)
- Suodata näytteet ruiskusuodattimella (45 µm tai 22 µm riippuen tutkittavasta näytteestä) vialiin, sulje viali ja aseta paikalleen
- Käynnistä ajo *START* napista
- kun ajo on valmis (valittuna lopetusaika esim. 30 min) kone antaa tulokset automaattisesti

Pesuohjelman tekeminen

- Menetelmään voi liittää myös pesuohjelman suoraan tekemällä kaksi erillistä menetelmää (ajomenetelmän ja pesumenetelmän) ja liittämällä ne *Sequence table*:en tai pesuohjelman voi myös tehdä suoraan gradienttitaulukkaan

Lopetus

- Huuhtele laitteisto pesuliuoksella (C-liuos) tarvittava määrä esim. 30 min, *flow* 1 ml/min
- Tasapainota kolonni ajoliuoksillasi vähintään esim. 15 min, *flow* 1 ml/min
- Sulje laitteiston kaikki osat

Menetelmäohje & ohjeistus

Opinnäytetyön tutkimustyön perusteella GFP-liuoksen HPLC-ajosta selkeimmät signaalit ja toistettavimmat tulokset saatiin käyttäen taulukossa 1 esiteltyjä parametriasetuksia.

Taulukko 1

Gradientti	Aika (min)	A-liuos (%)	B-liuos (%)	C-liuos (%)
	0	65	35	0
	1,0	55	45	0
	1,4	45	55	0
	2	35	65	0
(Pesu)	10,0	0	0	100
Ajon pituus (min)	30 min			
Virtausnopeus	1,0 ml/min	Aallonpituus	280 nm	
Kolonnin lämpötila	40 °C	Injektiotilavuus	10 µl	

Tutkimustyössä huomattiin, ettei ajon pituus ja/tai B-liuoksen pitoisuus ajon aikana ole riittävä eluoimaan kolonniin mahdollisesti retentoituneita komponenttijäännöksiä. Lisäksi huomattiin, että käytettävä pesuliuos ei ollut riittävä kolonnin pesuun ajojen jälkeen. Säättämällä ajon pituutta esimerkiksi 40 min ja lisäämällä esimerkiksi B-liuoksen pitoisuutta ajon ja pesuohjelman loppuun, GFP:n piikit voisivat olla tarkempia ja eroteltuja.

Tutkimustyössä muita huomattuja asioita liittyen GFP-liuoksen ajoon:

- Tris-puskuri (0,05 M, pH 7.4 37 °C:ssa) ei anna taustaa menetelmäajossa
- Ajon päätyttyä *baselinen* tasapainotusasetukset (käytetty: A-liuos 40 %, B-liuos 40 % ja C-liuos 20 %) eluoi tehokkaasti komponenttijäännökset kolonnista
- Mikäli ajon ja/tai pesuajon pituus ei ole riittävä, tulokset eivät ole toistettavia (tasapainotus tällöin erittäin tärkeää!)
- Melko korkea lämpötila (esim. 40 °C) tehostaa komponenttien eluointia