

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2013

Joonas Terävä

MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN PROTEIINIADSORPTION TUTKIMISEEN NANOPARTIKKELEISTA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2013 | 44 sivua

Ohjaajat: FT Sari Pihlasalo, FT Ilari Suominen

Joonas Terävä

MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN PROTEIINIADSORPTION TUTKIMISEEN NANOPARTIKKELEISTA

Opinnäytetyö suoritettiin Turun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan Biofysiikan laboratoriossa. Työ edisti osaltaan laboratorion tavoitteita kehittää uusia menetelmiä biomolekyylien vuorovaikutusten tutkimiseen luminesenssiin pohjautuvien menetelmin.

Kehitetyn menetelmän oli tarkoitus määrittää nanopartikkelien pinnoille tapahtuvan proteiiniadsorption täyttöastetta. Menetelmä perustui aikaerotteiseen fluoresenssiin ja resonanssienergian siirtoon (RET) europiumkelaattia sisältävien nanopartikkelien ja leimatun proteiinin välillä. Leimattu proteiini toimi RET-parin akseptorina ja kilpaili adsorboitumisesta näytepartikkeleihin adsorboituneen proteiinin kanssa. Leimatun proteiinin sitoutuminen näytepartikkeleihin heikensi RET-signaalia, joten RET-signaalin ja adsorption asteen välillä oli korrelaatio. Työssä verrattiin kehitettyä menetelmää kirjallisuudessa esitettyyn menetelmään, jossa näyteproteiini leimattiin europiumkelaatilla. Menetelmien havaittiin antavan tietoa proteiiniadsorption täyttöasteesta toisiaan vastaavilla tarkkuuksilla.

Selvitettiin myös näytteen pitoisuuden ja näytepartikkelien koon vaikutusta määrittämiseen. Havaittiin, että näytemäärää säätelemällä voitiin paremmin havaita eroja tietyillä adsorption täyttöasteilla, sillä näytepartikkelien kokonaispinta-ala muuttui määrittämisessä suhteessa näytteen pitoisuuteen. Näytemäärää lisäämällä voitaisiin siis havaita eroja paremmin esimerkiksi lähes saturoituneista partikkeleista. Proteiiniadsorption astetta voitiin mitata eri kokoisista ja hieman erilaisia pinnan ominaisuuksia omaavista partikkeleista.

Yritettiin myös kehittää menetelmä, jossa näytepartikkelien pesuvaihe voitaisiin jättää pois ja mitata adsorpoitumatta jääneen proteiinin pitoisuuden laskua. Menetelmää ei vielä saatu toimimaan ilman pesuvaihetta, mutta tarkempi tutkimus voi osoittaa pesuvaiheen turhaksi.

Kehitetyllä menetelmällä on potentiaalia nopeaksi ja tarkaksi proteiiniadsorption asteen mittaamenetelmäksi. Menetelmän käytettävyyttä rajoittaa vain leimatun proteiinin adsorboituvuus näyttemateriaalin pinnalle.

ASIASANAT:

adsorptio, aikaerotteinen fluorometria, fotoluminesenssi, proteiinit, nanomateriaalit, resonanssienergian siirto

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2013 | 44 pages

Instructors: Sari Pihlasalo, Ph. D.; Ilari Suominen, Ph. D.

Joonas Terävä

DEVELOPMENT OF ASSAY FOR PROTEIN ADSORPTION ONTO NANOPARTICLES

The thesis project was conducted in the Laboratory of Biophysics of the Faculty of Medicine, University of Turku. The study was performed to promote the recent efforts of the Laboratory to develop novel luminescence-based methods for investigating the interactions of biomolecules.

The method was developed for the determination of the degree of protein adsorption onto nanoparticles. It was based on the time-resolved fluorescence and resonance energy transfer (RET) between nanoparticles doped with a europium chelate and a labeled protein. The labeled protein acted as the acceptor of the RET pair and competed in adsorption with the protein adsorbed onto the particles in the sample. The adsorption of the labeled protein onto the sample decreased the RET signal. Thus, there was a correlation between the degree of adsorption and the RET signal. The developed method was compared to a literature method in which the sample protein was labeled with a europium chelate. Both methods were observed to give information on the degree of protein adsorption with similar accuracy.

The effects of sample concentration and the size of sample particles on the method were also assessed. It was observed that the alteration of the sample concentrations enabled improved distinction of the degree of adsorption at certain surface coverages as the sample concentration is relative to the total surface area in the sample. Alteration of the sample concentration could thus provide more detailed information, for example, on the slight differences near saturation. The degree of protein adsorption was also found to be measurable from particles of different sizes and slightly different surface properties.

A method was also investigated to measure the decrease in non-adsorbed protein due to adsorption leaving out the washing steps of samples. The results of this test were preliminary, but further studies may prove the sample washing step unnecessary.

The developed method is potentially a fast and accurate assay for studying the degree of protein adsorption on an extensive range of sample materials. The range of sample materials is limited to those adsorbing the labeled protein.

KEYWORDS:

adsorption, nanomaterials, photoluminescence, proteins, resonance energy transfer, time-resolved fluorometry

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	8
2 PROTEIINIT JA PEPTIDIT	9
2.1 Proteiinien synteesi ja rakenne	9
2.2 Naudan seerumin albumiini	10
3 PROTEIINIEN ADSORPTIO	11
3.1 Adsorptioon vaikuttavat ulkoiset parametrit	11
3.2 Adsorptioon vaikuttavat proteiinin ominaisuudet	12
3.3 Adsorptiopinnan ominaisuudet	13
4 FOTOLUMINESENSSI	14
4.1 Fluoresenssi	14
4.2 Aikaerotteinen fluorometria	16
4.3 Resonanssienergian siirto	17
5 PROTEIINIADSORPTION TUTKIMISEEN KÄYTETTYJÄ MENETELMIÄ	18
5.1 Vapaan proteiinin vähenemiseen liuoksesta perustuvat tekniikat	18
5.2 Gravimetriset menetelmät	19
5.3 Hydrodynaamiset menetelmät	19
5.3.1 Pyöreiden partikkelien diffuusio	19
5.3.2 Kapillaarisuus	20
5.4 Sähköiset menetelmät	20
5.5 Optiset menetelmät	20
5.6 Leimausmenetelmät	21
5.7 Uuden menetelmän tarve	21
6 MATERIAALIT JA LAITTEET	22
6.1 Polystyreenipartikkelit	22
6.2 Europiumpartikkelit	22
6.3 Alexa Fluor 680® –fluoroforilla leimattu gammaglobuliini	23
6.4 BSA	23
6.5 Victor ² -monileimalaite	24

7 MENETELMÄT JA TÖIDEN SUORITUS	25
7.1 Adsorptio PS-partikkeleihin	26
7.2 Adsorptiopuskurin valinta	26
7.3 Määrityksen suoritus	26
7.4 Näytepartikkelien määrän vaikutus määrittämisessä	27
7.5 Vertailumenetelmä	27
7.5.1 Proteiinin leimaus Eu-kelaatilla	27
7.5.2 Leimatun proteiinin puhdistus geelisuodattamalla	28
7.5.3 Proteiinipitoisuuden määrittäminen leimatusta BSA:sta	28
7.5.4 Europiumpitoisuuden määrittäminen leimatusta BSA:sta	29
7.6 Proteiinin adsorptio erikokoisiin nanopartikkelien	29
7.6.1 Erikokoisten nanopartikkelien täyttöasteen määrittäminen	29
7.7 Määrittäminen ilman näytepartikkelien pesuvaihetta	30
8 TULOKSET JA TARKASTELU	31
8.1 Adsorptiopuskurin valinta	31
8.2 Partikkelipitoisuuden vaikutus määrittämisessä	32
8.3 Kehitetty menetelmä	34
8.4 Vertailumenetelmä	35
8.5 Nanopartikkelien koon vaikutus määrittämisessä	38
8.6 Määrittäminen ilman näytepartikkelien pesuvaihetta	39
9 YHTEENVETO	41
LÄHTEET	43

KUVAT

Kuva 1. Stokesin siirtymä.	15
Kuva 2. Periaatekuva näytteen täyttöasteen määrittämisestä. a. Näyteproteiinia ei ole adsorboitunut, signaali heikko. b. Näytteeseen on adsorboitunut proteiinia kohtalaisesti, signaali kohonnut. c. Adsorboitunut näyteproteiini täyttäneen PS-partikkelin, signaali korkea.	26

KUVIOT

Kuvio 1. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.	16
Kuvio 2. Adsorptiopuskurin vaikutus signaaliin.	32
Kuvio 3. Partikkelipitoisuuden (1/200-1/2) vaikutus signaaliin.	33
Kuvio 4. Partikkelipitoisuuden (1/60000-1/200) vaikutus signaaliin.	33
Kuvio 5. Kehitetyn määrittämenetelmän signaali adsorptioliuoksen BSA-pitoisuuden funktiona. Mittapisteet yhdistetty 4 kontrollipisteen avulla piirretyllä Bézier-käyrällä.	34
Kuvio 6. BSA-näytteiden RET-signaali lineaarisella alueella proteiinkonsentraation määrittäksessä. Kuvaajaan on mittapisteiden avulla piirretty suora, jonka yhtälön avulla lasketaan signaalia vastaava proteiinipitoisuus. Suoran kulmakerroin $-400 \cdot 10^6$ l/g, pystyakselin leikkauspiste 12000 ja korrelaatiokertoimen neliö 0,991.	36
Kuvio 7. Leimatun ja leimaamattoman BSA:n seoksen europium-signaali Kappaleessa 7.5.4. kuvatulla menetelmällä mitattuna. Kehitetyn menetelmän käyrä on esitetty punaisena..	37
Kuvio 8. Partikkelikoon vaikutus määrittäksessä. Signaali suhteessa proteiinipitoisuuteen ja partikkelien halkaisijoihin.	38
Kuvio 9. Partikkelikoon vaikutus määrittäksessä.	39
Kuvio 10. Ilman pesuvaihetta tehdyn määrittäksen signaali.	40

TAULUKOT

Taulukko 1. Leimatun proteiinin pitoisuus liuoksessa.	36
---	----

KÄYTETYT LYHENTEET

Alexa	Alexa Fluor 680® -fluorofori
Alexa- γ G	Alexa Fluor 680® -fluoroforilla leimattu gammaglobuliini
BSA	bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
EFI	europium fluorescence intensifier -reagenssi
Eu-BSA	Eu-kelaatilla leimattu BSA
γ G	gammaglobuliini
LRET	luminescence RET, luminesenssiresonanssienergian siirto
PBS	phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PS	polystyreeni
RET	resonance energy transfer, resonanssienergian siirto
RT	room temperature, huoneenlämpötila
SA	seerumin albumiini
TR	time-resolved, aikaerotteinen
TRF	time-resolved fluorescence, aikaerotteinen fluoresenssi

1 JOHDANTO

Työ suoritettiin Turun yliopiston Biofysiikan laboratoriossa. Laboratoriossa tutkitaan laajalti lantanidien luminesenssin hyödyntämistä uusien määrittämenetelmien kehittämiseksi erilaisiin biokemian ja kemian alan sovelluksiin.

Proteiiniadsorptio on laajalti tutkittu ilmiö, josta on esitetty monia hypoteeseja (Brash & Horbett, 1995; Quiquampoix, 2000; Rabe *et al.*, 2011; Adamczyk, 2011). Proteiinien adsorptio voi olla haluttu tai epäsuotava tapahtuma, sitä voidaan esimerkiksi käyttää hyödyksi uusien lääketieteellisten sovellusten kehityksessä tai se voi johtaa suodattimien tukkeutumiseen prosessiteollisuudessa.

Proteiiniadsorption tutkimiseen on kehitetty monia menetelmiä. Monet kehityistä menetelmistä rajoittavat tutkimuskohteen ominaisuuksia, pinnan, johon adsorptio tapahtuu, tulee esimerkiksi olla läpinäkyvä tai sähköä johtava. Useat menetelmät myös vaativat kalliita laitteita, joita ei useimmista laboratorioista löydy.

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia ja kehittää luotettavaa ja nopeaa luminesenssiin ja resonanssienergian siirtoon perustuvaa määrittämenetelmää nanopartikkelien pinnan täyttöasteen selvittämiseksi.

2 PROTEIINIT JA PEPTIDIT

Proteiinit ovat monimuotoinen biopolymeerien ryhmä. Tässä kappaleessa pyritään selvittämään niiden monimuotoisuuden taustalla olevia syitä ja kartoittamaan työssä käytetyn malliproteiinin ominaisuuksia.

2.1 Proteiinien synteesi ja rakenne

Proteiinit ovat biopolymeerejä, jotka muodostuvat eliöissä luonnollisesti DNA:n ohjaamassa proteiinisynteesissä. Tiettyjä DNA:n koodaamia sekvenssejä, geenejä, käännetään RNA:ksi transkriptioksi kutsutussa prosessissa. DNA:sta transkriptoitua RNA:ta muokataan usein silmukoinnissa. Silmukoinnissa voidaan poistaa RNA:sta tiettyjä osia, introneja, josta seurauksena yksi geeni voi koodata useampaa kuin yhtä proteiinia, selittäen osaltaan proteiinien monimuotoisuuden. Silmukoinnissa syntyneen valmiin mRNA:n nukleotidijärjestys määrää ribosomeilla syntyvän proteiinin primäärisen rakenteen eli aminohappojärjestyksen. Proteiini syntetisoidaan 21 eri aminohaposta. Yhtä aminohappoa vastaa mRNA:ssa, ja siten myös DNA:ssa, kolmen nukleotidin sekvenssi, kodoni. Proteiinien molekyylimassa vaihtelee ja on tyypillisesti 10-100 kDa. (Heino & Vuento, 2010)

Proteiinisynteesissä käytettävät aminohapot ovat kaikki α -aminohappoja eli niiden karboksyyliiryhmästä seuraavaan hiileen, α -hiileen, on kiinnittyneenä aminoryhmä. Aminohappojen ominaisuudet määräytyvät niiden α -hiileen liittyneen sivuryhmän mukaan. Proteiineissa amino- ja karboksyyliiryhmät liittyvät toisiinsa kovalenttisilla, sidoksilla. Nämä peptisidoksiksi kutsutut sidokset voivat kiertyä α -hiilen ja typpiatomin sekä α -hiilen ja karbonyylihiilen suhteen, josta seurauksena proteiineilla on valtava määrä mahdollisia konformaatioita. Usein vain yksi konformaatio on proteiinille luonnollinen, natiivi konformaatio. Proteiinin konformaatio voi kuitenkin muuttua natiivista konformaatiosta olosuhteiden mukaan. Vesiliuoksissa proteiinien hydrofobiset

osat pyrkivät sijoittumaan proteiinimolekyylin sisäosiin. Aminohappoketju voi proteiineissa kiertyä ja laskostua paikallisesti muodostaen sekundäärirakenteita. Tertiäärirakenteella tarkoitetaan kysteiiniaminohappojen välille muodostuneita disulfididoksia ja muita aminohappoketjujen välillä vallitsevia heikompiä vuorovaikutuksia. Proteiinilla voi olla vielä neljäs rakennetaso, kvaternäärirakennetaso. Kvaternäärirakenne käsittää useammasta kuin yhdestä polypeptidiketjusta muodostuneen proteiinin rakenteen. (Heino & Vuento, 2010)

2.2 Naudan seerumin albumiini

Seerumin albumiinit (SA) ovat nisäkkäiden veressä runsaimmin esiintyvä proteiiniyryhmä (de Wolff & Brett, 2000). Seerumin albumiineilla on monia luonnollisia tehtäviä, kuten pH:n ylläpito, typpioksidin varastointi (Stamler *et al.*, 1992) ja kalsiumin varastointi, ne voivat sitoa lääkkeitä ja aromeja sekä muita kaupallisiin tarkoituksiin käytettäviä yhdisteitä (de Wolff & Brett, 2000).

Naudan, hevosen ja jäniksen seerumin albumiinien on havaittu muistuttavan suuresti sekä toisiaan, että ihmisen seerumin albumiinia. Edellä mainitut seerumin albumiinit ovat muodoltaan sydämenmuotoisia ja koostuvat kolmesta samankaltaisesta kierteisestä domeenista. (Majorek *et al.*, 2012)

SA:t sisältävät runsaasti kysteiiniä, aminohappoa jonka tioli-sivuryhmä kykenee muodostamaan disulfididoksen toisen tioliryhmän kanssa. SA:eissa disulfididokset muodostuvat pääasiassa kierteisten domeenien välillä. Tämä saattaa osaltaan selittää SA:en korkeaa stabiliteettia. SA:lla on hyvä liukoisuus, mikä tekee niistä helppokäyttöisiä eri sovelluksiin. Naudan seerumin albumiini (BSA) voi sitoa monia molekyyliä, mm. ibuprofeenia ja asetyyliäsalisyylisäilyhappoa. (de Wolff & Brett, 2000)

3 PROTEIINIEN ADSORPTIO

Proteiineilla on vahva taipumus hakeutua neste-kaasu- ja neste-kiinteä aine - rajapinnoille. Tämä on pohjimmiltaan seurausta proteiinien rakenteesta, sen monomeerien, aminohappojen, sivuryhmien ominaisuuksista. Aminohappojen sivuryhmät voivat olla polaarisia, ei-polaarisia, varauksellisia tai varauksettomia. (Quiquampoix, 2000) Proteiiniadsorptioon vaikuttavat proteiinin ominaisuuksien lisäksi myös rajapinnan ominaisuudet sekä ulkoiset parametrit (Rabe *et al.*, 2011)

3.1 Adsorptioon vaikuttavat ulkoiset parametrit

Ulkoisia proteiiniadsorptioon vaikuttavia tekijöitä ovat lämpötila, ionivahvuus, pH ja liuosta puskuroivat komponentit (Rabe *et al.*, 2011).

Lämpötila vaikuttaa sekä adsorption nopeuteen, että tasapainotilaan. Korkeimmissa lämpötiloissa proteiinien diffuusio on yleensä nopeampaa, joten proteiinit saavuttavat pinnat nopeammin ja adsorptio kiihtyy. Adsorptio kasvattaa järjestelmän entropiaa syrjäyttämällä pinoilta järjestäytyneitä vettä ja ioneja sekä muuttamalla proteiinien konformaatiota. Näin ollen lämpötilan nousu kasvattaa proteiinien adsorption nopeutta ja määrää. (Rabe *et al.*, 2011)

Proteiinien ulkoinen nettovaraus muuttuu pH:n muuttuessa. Sitä pH:n arvoa, jossa proteiinin nettovaraus on nolla, kutsutaan isoelektriseksi pisteeksi. Isoelektrisen pisteen alapuolella proteiinin nettovaraus on positiivinen ja yläpuolella negatiivinen. Isoelektrisessä pisteessä saavutetaan yleensä massallisesti paras proteiiniadsorptio, proteiinien hylkiessä toisiaan mahdollisimman vähän. (Rabe *et al.*, 2011)

Ionivahvuus kuvaa liuenneiden ionien määrää liuoksessa. Ionivahvuuden noustessa tarpeeksi, proteiinien ja pintojen väliset sähköiset vuorovaikutukset muuttuvat, yleensä tämän seurauksena vastakkaismerkkisen varauksen

omaavien pintojen adsorptio vaikeutuu ja samanmerkkisten varausten omaavien pintojen adsorptio helpottuu. (Rabe *et al.*, 2011)

3.2 Adsorptioon vaikuttavat proteiinin ominaisuudet

Proteiinin adsorptioon vaikuttavia ominaisuuksia ovat muun muassa proteiinin koko, stabiilisuus ja rakenne.

Pienet proteiinit diffundoituvat liuoksessa nopeammin, mutta suuremmat proteiinit sitoutuvat yleensä voimakkaammin suuremman kontaktipinta-alan vuoksi. Proteiiniseoksissa suurten proteiinien on havaittu syrjäyttävän aiemmin adsorboituneita, pienempiä, proteiineja. (Rabe *et al.*, 2011)

Proteiinin adsorptio-orientaatio ja –konformaatio voi muuttua liuoksen proteiinkonsentraation mukaan. Proteiinien konformaation muutos vaikuttaa adsorptiossa proteiinin peittämään pinta-alaan. Esimerkiksi albumiineilla on taipumusta muuttaa konformaatiota adsorptiossa (Rabe *et al.*, 2011). Proteiinin adsorptiopinta-alan suuretessa, sen levittäytyessä pinnalle, laimeassa liuoksessa sen konformaatio voi muuttua niin paljon, että se denaturoituu (Norde & Lyklema, 1978). Eriasteista denaturoitumista on havaittu ainakin kalorimetristen tutkimusten perusteella, jotkin proteiinit eivät adsorption jälkeen luovuttaneet tutkimuksissa yhtä paljon energiaa kuin natiivit, oikein laskostuneet proteiinit (Brash & Horbett, 1995).

Proteiinin kolmiulotteiseen rakenteeseen vaikuttavat sen aminohappojen lisäksi siihen translaation jälkeen liitetyt komponentit. Proteiiniin voidaan translaation jälkeen liittää esim. fosfaatteja, oligosakkarideja ja lipidejä. Translaation jälkeiset muutokset proteiinin rakenteeseen tekevät proteiineista vieläkin monimutkaisempia kokonaisuuksia joiden adsorboitumista pinnoille on hyvin vaikeaa ennustaa. Suurten glyko- ja lipoproteiinien adsorptio-ominaisuudet määrittää suurimmaksi osaksi sen oligosakkaridi- tai lipidiketjut. (Rabe *et al.*, 2011)

3.3 Adsorptiopinnan ominaisuudet

Adsorptioon vaikuttavia pintojen ominaisuuksia ovat mm. polaarisuus, pinnan varaus ja sen muoto. Usein, valittu tutkimustapa rajoittaa tutkittavan pinnan ominaisuuksia; pinnan tulee esimerkiksi olla sähköä johtava. (Rabe *et al.*, 2011)

Pintojen polaarisuuden vaikutusta on tutkittu laajalti. Proteiinien adsorption on yleensä havaittu tapahtuvan voimakkaammin hydrofobisille, ei-polaarisille, pinnoille. Hydrofobisuuden vaikutusta voidaan tutkia pinnoilla joilla on tai joille on muodostettu gradientti hydrofobisuuden suhteen. Näillä pinnoilla adsorption on huomattu tapahtuvan voimakkaammin hydrofobisemmalle alueelle useilla erilaisilla malliproteiineilla. (Brash & Horbett, 1995)

Proteiinit sisältävät usein sähköisesti erimerkkisen varauksen omaavia alueita, silloinkin kun proteiinien nettovarauksen katsotaan olevan nolla. Usein proteiinin havaitaan adsorboituvan paremmin pinnoille, joiden varaus on vastakkaismerkkinen proteiinin nettovaraukseen nähden (Brash & Horbett, 1995).

4 FOTOLUMINESSENSI

Fotoluminesenssi voidaan jakaa kolmeen kategoriaan: fluoresenssiin, viivästyneeseen fluoresenssiin ja fosforesenssiin. Luminoivat yhdisteet voivat olla orgaanisia, epäorgaanisia tai niissä voi yhdistyä epäorgaanisia ja orgaanisia rakenteita. Fotoluminesenssissa luminoiva yhdiste absorboi fotonin virittäen elektronin ja emittoi alempienergisen fotonin elektronin virittymisen purkautuessa. (Valeur, 2001)

Elektronin viritystila, jonka johdosta fotonin emissio tapahtuu, määrittää mihin fotoluminesenssin kategoriaan tapahtuma kuuluu. Fluoresenssissa elektronin viritystila on ns. singlettitila, josta se purkautuu nopeasti, alle nanosekunnista 10 nanosekuntiin eksitaatiosta. Fosforesenssissa elektroni on virittynyt triplettitilaan, josta se palautuu hitaasti. Fosforesenssin elinikä eli kesto on millisekunneista sekunteihin. (Lakowicz, 2006)

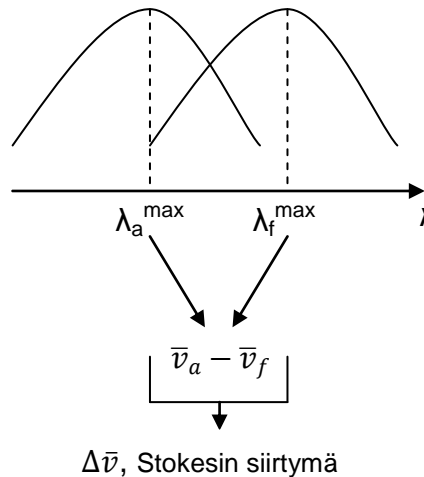
Viivästyneessä fluoresenssissa tapahtuu elektronin siirtyminen triplettitilasta singlettitilaan (Valeur, 2001) pidentäen viivästyneen fluoresenssin elinikää normaaliin fluoresenssiin nähden.

4.1 Fluoresenssi

Fluorometriset määritysmenetelmät ovat herkkiä ja spesifisiä (Valeur, 2001) esimerkiksi spektrofotometriin menetelmiin nähden. Menetelmillä saadaan siis yleensä hyvin vähän vääriä negatiivisia ja vääriä positiivisia tuloksia.

Fluoresoivalle molekyylille, fluoroforille, voidaan määrittää niille ominaisia ominaisuuksia, kuten eksitaatio- ja emissioaallonpituudet sekä fluoresenssin elinikä. Emissiospektrissä emission intensiteetti esitetään aallonpituuden (nm) tai aallonumeron (cm^{-1}) funktiona. Fluoroforin emissiospektri ei riipu eksitaatioaallonpituudesta. (Lakowicz, 2006)

Stokesin siirtymäksi kutsutaan ensimmäisen eksitaatiojuovan maksimin (λ_a^{\max}) ja emissiomaksimin (λ_f^{\max}) erotusta aallonumeroina laskettuna (Valeur, 2001). Kuviossa 1 on esitetty periaatekuva Stokesin siirtymästä.



Kuva 1. Stokesin siirtymä.

Stokesin siirtymä havaitaan kaikilla fluoroforeilla liuoksessa. Stokesin siirtymä johtuu eksitaatiotilan energian purkautumisesta muiksi energian muodoiksi ennen fotonin emissiota. Näin ollen emittoituneen valon aallonpituus on useimmiten pidempi ja sen energia alhaisempi kuin eksitaatioaallonpituus. (Lakowicz, 2006)

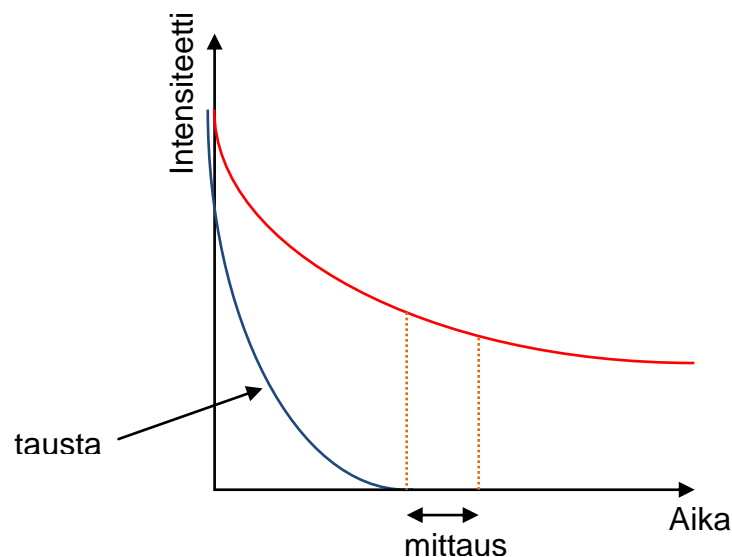
Fluoroforin elinikä ja kvanttisaanto ovat tärkeitä ominaisuuksia arvioitaessa fluoroforin käytännöllisyyttä määrittämissä menetelmissä. Fluoresenssin elinikä on se aika joka keskimäärin kuluu fluoroforin eksitaation palautumiseen perustilaan. Fluoresenssin elinikä siis kertoo kuinka pitkän ajan päästä fluoroforin emissio voidaan vielä havaita (Lakowicz, 2006).

Kvanttisaanto ilmoittaa emittoituneiden ja absorboituneiden fotonien lukumäärän suhteen, kertoen näin fluoresenssi-ilmiön valon tuoton voimakkuudesta (Lakowicz, 2006). Suuren kvanttisaannon omaavat fluoroforit on näin ollen helpompi erottaa taustasta kuin pienen kvanttisaannon omaavat.

Fluoresenssin emissioon liuksessa vaikuttavat myös monet liuksen parametrit, muuttaen joko Stokesin siirtymää, fluoresenssin elinikää ja/tai kvanttisaantoa. Näihin parametreihin lukeutuu esimerkiksi pH, lämpötila, viskositeetti, ionit ja paine. Monet orgaaniset ja epäorgaaniset liuksen komponentit, kuten aina läsnäoleva molekulaarinen happi, voivat toimia fluoresenssin sammuttajina vaimentaen ilmiön voimakkuutta. (Valeur, 2001)

4.2 Aikaerotteinen fluorometria

Fluoroforien elinikä vaihtelee fluoroforista ja olosuhteista riippuen. Biologiset näytteet sisältävät usein lyhyen eliniän omaavia fluoroforeja. Tämän vuoksi biologisia näytteitä fluoresenssiin perustuvien menetelmien analysoitaessa käytetään usein aikaerotteisia menetelmiä. Aikaerotteisissa menetelmissä käytetään pitkän fluoresenssin eliniän omaavia fluoroforeja ja emissio mitataan sen jälkeen kun tausta on laskenut eli lyhytikäisten fluoroforien eksitaatio on purkautunut tyypillisesti 0,01-1 μ s:n kuluttua, kuten Kuviossa 2. on esitetty. (Gudgin Dickson *et al.*, 1995)



Kuvio 1. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.

Aikaerotteisessa fluorometriassa käytettyjen fluoroforien on edullista, pitkän eliniän lisäksi, omata suuri Stokesin siirtymä ja kapea emissiopeikki. Tällaisia fluoroforeja ovat mm. useat lantanidikelaatit. Näissä kelaateissa lantanidi-ioni on usein sitoutuneena aromaattiseen ligandiin. Ligandi siirtää eksitaatioenergian lantanidi-ionille jonka eksitaatio-tila purkautuu monen välitason kautta perustilaan ja emissio havaitaan paljon absorboitunutta aallonpituutta pidemmällä aallonpituudella. Lantanidien luminesenssi ei tarkkaan ottaen vastaa fluoresenssin eikä fosforesenssin määritelmää. (Gudgin Dickson *et al.*, 1995)

4.3 Resonanssienergian siirto

RET-ilmiön edellytyksenä on, että ensimmäisen fluoroforin, donorin, emissioaallonpituuden spektri osuu samalle alueelle kuin toisen fluoroforin, akseptorin, eksitaatioaallonpituus (Valeur, 2001). Ilmiö tapahtuu kun tällaisen molekyyliparin osapuolet pääsevät sopivan etäisyyden, tyypillisesti 1,5-6,0 nm:n, päähän toisistaan, jolloin donorin eksitaatioenergia pääsee siirtymään akseptorille (Lakowicz, 2006). Olosuhteissa, joissa RET-ilmiö tapahtuu havaitaan siis akseptorin emissiota donorin eksitaation seurauksena. RET-ilmiötä apuna käyttäen tutkitaan mm. makromolekyylien vuorovaikutusta ja määritetään niiden osien etäisyyksiä toisistaan (Lakowicz, 2006).

RET:a kutsutaan myös fluoresenssin resonanssienergian siirroksi (FRET). Tämä nimitys on kuitenkin harhaanjohtava, koska ilmiössä siirtyy eksitaation sähköinen energia, eikä fluoresenssi. (Valeur, 2001)

5 PROTEIINIADSORPTION TUTKIMISEEN KÄYTETTYJÄ MENETELMIÄ

Proteiiniadsorptio on runsaasti tutkittu ilmiö. Proteiiniadsorptio on yksi ensimmäisistä tapahtumista kun vieras materiaali ja biologinen liuos saatetaan yhteen ja se voi, sovelluksesta riippuen, olla joko haluttu tai epäsuotava ilmiö. Proteiiniadsorptiota on tutkittu jo 1960-luvulta lähtien. Ensimmäisiä havaintoja proteiiniadsorptiosta tehtiin verellä, joka ei hyytynytkään samalla lailla silikaattilasien pinnalla samoin kuin tavallisen lasin pinnalla. (Vroman, 1966; Andrade & Hlady, 1986)

Proteiiniadsorption tutkimiseen on kehitetty useita eri periaattein toimivia menetelmiä, joista eniten kehitysmahdollisuuksia omaavia ovat optiset menetelmät (Ramsden, 1993). Tässä kappaleessa käsitellään proteiiniadsorption mittausten menetelmien hyviä ja huonoja puolia sekä niiden sovellettavuutta mittauksiin nanopartikkeleihin tapahtuvasta proteiiniadsorptiosta.

5.1 Vapaan proteiinin vähenemiseen liuksesta perustuvat tekniikat

Proteiinin vähenemiseen liuksesta perustuvat tekniikat voivat olla toteutukseltaan hyvin yksinkertaisia. Tutkittava adsorbentti hienonnetaan sopivaksi suspensointia varten. Liukseen johon tutkittavaa adsorbenttia on suspensoituna lisätään tunnettu määrä tutkittavaa proteiinia jatkuvasti sekoittaen ja halutun ajanjakson jälkeen adsorbentti erotetaan liuksesta. Usein erotukseen käytetään painovoimaan perustuvia menetelmiä. Tämän jälkeen mitataan liuksen proteiinipitoisuus. Liuksen alku- ja loppukonsentraatioiden avulla voidaan määrittää adsorboituneen proteiinin määrä. (Ramsden, 1993)

Tällaisissa menetelmissä voidaan adsorbenttina käyttää miltei mitä tahansa materiaalia ja proteiinkonsentraation mittausta voidaan suorittaa millä tahansa liuksen proteiinipitoisuuden mittaamiseen käytetyllä tekniikalla. Haittapuolia

ovat mm. heikko soveltuvuus kinetiikan mittaukseen, koska adsorbentti pitää erottaa liuksesta ennen mittausta, erotuksessa mahdollisesti tapahtuva desorptio sekä adsorbentissa mahdollisesti tapahtuvat muutokset sitä hienonnettaessa. (Ramsden, 1993)

5.2 Gravimetriset menetelmät

Gravimetriset menetelmät, mukaan lukien kvartsikidemikrovaaka, perustuvat kvartsikiteiden värähtelyyn sähkökentässä. Kiteisiin adsorboituva proteiini vaikuttaa kääntäen verrannollisesti värähtelytaajuuteen. Adsorboituneen proteiinin määrän laskemista hankaloittavat adsorptioliuoksen ominaisuudet. Tutkittavan adsorptiopinnan tulee olla liitettävissä kvartsikiteeseen, mikä rajoittaa eri materiaalien tutkimista. (Ramsden, 1993)

5.3 Hydrodynaamiset menetelmät

Hydrodynaamiset menetelmät perustuvat kahden faasin, kiinteän ja nestemäisen, liikkeeseen toistensa suhteen. Proteiinien adsorptio kiinteä-neste-rajapinnalle lisää kitkakerrointa. Kiihdytysjakson jälkeen mitataan hiukkasten tai nesteen nopeus, jonka avulla adsorboidun proteiinin määrä lasketaan. (Ramsden, 1993)

5.3.1 Pyöreiden partikkelien diffuusio

Partikkelien diffuusiokerroin muuttuu kun niiden pintaan adsorboituvat proteiinit kasvattavat niiden halkaisijaa. Diffuusion muutosta mittaavat menetelmät vaativat paljon yksinkertaistamista, laskelmia ja ne ovat herkkiä virheille. Tutkittavien partikkelien tulee olla identtisiä. Adsorboituneen proteiinerroksen tulee myös olla paljon partikkelien sädettä pienempi läpimitaltaan. (Ramsden, 1993)

5.3.2 Kapillaarisuus

Kapillaarit ovat ohuita putkia, joissa neste liikkuu pintajännityksen vaikutuksesta (Inkinen & Tuohi, 2006). Pouseillen lain mukaan nesteen virtausnopeus ja viskositeetti ovat suhteessa putken säteen neljänteen potenssiin. Proteiinien adsorboituessa kapillaariin, kapillaariputken sisäosan säde muuttuu, muuttaen liuoksen virtausnopeutta putkessa. Käytännössä käytetään useiden kapillaarien järjestelmiä. (Ramsden, 1993)

Kapillaarimenetelmän käyttö on käytännössä hankalaa. Kapillaarit voivat olla vaihtelevan kokoisia ja tutkittavan pinnan saaminen kapillaaripinnoille voi olla hankalaa. Adsorptiota partikkeleihin ei voida tällä menetelmällä tutkia.

5.4 Sähköiset menetelmät

Proteiineilla on liuoksessa nettovaraus kaikilla muilla pH:n arvoilla, paitsi isoelektrisessä pisteessä. Adsorboituneet proteiinit kerryttävät varausta adsorptiopinnalle. Mittaamalla adsorptiopinnan varaus voidaan laskea adsorboituneen proteiinin määrä, jos tiedetään yksittäisen proteiinin nettovaraus kyseisissä olosuhteissa. Adsorptio on kuitenkin monimutkainen prosessi ja saattaa muuttaa proteiinia niin, etteivät laskelmat enää pidä paikkaansa. Sähköisten menetelmien kanssa kannattaakin käyttää myös muita menetelmiä adsorptiotapahtuman sähköstatiikan selvittämiseksi. Adsorption pitää tapahtua elektrodeilla, mikä tekee partikkelien adsorption tutkimisen tällä menetelmällä hankalaksi, mutta hapettumis-pelkistymisreaktion vaikutusta adsorptioon on helpompi tutkia. (Ramsden, 1993)

5.5 Optiset menetelmät

Polarisoidun ja polarisoimattoman valon käyttäytyminen rajapinnoilla on hyvin tunnettua ja mitattavissa tarkasti. Proteiinin adsorboituminen rajapinnoille muuttaa valon taittumista tai polarisaation kulmaa. Tulosten laskemiseen

tarkoitettut yhtälöt ovat monimutkaisia ja laskelmia hankaloittaa edelleen proteiinien heterogeeninen jakautuminen pinnoille, adsorptiokerroksen varaus ja johtavuus sekä pintojen epätasaisuus. (Ramsden, 1993)

5.6 Leimausmenetelmät

Leimausmenetelmät hyödyntävät erilaisia leima-aineita. Tutkittava molekyyli käsitellään niin, että siihen kiinnittyy leima-ainetta, joka voidaan havaita esimerkiksi sen radioaktiivisuuden, luminesenssin, kromogeenisyyden tai entsyymiaktiivisuuden kautta.

Leimauksen seurauksena tutkittavan proteiinin rakenne voi muuttua, eikä se enää käyttyädy adsorptiossa kuten natiivi proteiini. Leimaaminen ja leimatun proteiinin puhdistaminen ovat myös aikaa vieviä toimenpiteitä. Lisäksi on mahdollista, että leima irtoaa ennen kuin määrittys saadaan suoritettua. (Ramsden, 1993)

Leimausmenetelmät soveltuvat kaikenlaisten pintojen tutkimiseen ja niiden avulla voidaan tutkia proteiiniseosten kilpailevaa adsorptiota sekä adsorptiota partikkeleihin. (Ramsden, 1993)

5.7 Uuden menetelmän tarve

Uutta menetelmää alettiin kehittämään, koska vanhoilla menetelmillä on hankalaa tai kallista mitata proteiiniadsorption seurauksena tapahtuvaa partikkelien pintojen täyttöasteen muutosta. Vertailumenetelmäksi valitaan leimausmenetelmä, jolla päästään lähimmäksi partikkelien pinnan täyttöasteen mittausta. Vertailumenetelmän ei tosin odoteta olevan yhtä tarkka täyttöasteen määrittymiseen, koska se antaa tiedon vain adsorboituneen proteiinin massasta ja tämä adsorboitunut proteiini voi olla leimauksen takia muuttunut ja myös adsorptiokonformaation muutos voi vaikeuttaa näytteen pinnan saturaation havaitsemista.

6 MATERIAALIT JA LAITTEET

Tässä kappaleessa on esitelty työn kannalta keskeiset reagenssit ja laitteet. Mikrosentrifugiputket olivat kertakäyttöisiä ja lasitavaroiden puhtaudesta vastasi välinehuoltohenkilökunta. Töissä käytetty vesi oli Milliporen laitteistolla puhdistettua ionivaihdettua vettä.

6.1 Polystyreenipartikkelit

Adsorbenttina käytettiin Spherotechin valmistamia 240 nm:n halkaisijan omaavia polystyreenipartikkeleja (PS-partikkeleja) joihin oli konjugoitu aminoryhmiä (tuotenumero: AP-025-10, eränumero: W01, Spherotech Inc., USA). Aminoryhmät kiinnitetään partikkelien valmistuksen loppuvaiheessa osaan partikkelien karboksyyliiryhmistä. Aminoryhmät saavat neutraalin pH:n vesiliuoksessa positiivisen varauksen, mutta valmiin partikkelin nettovaraus on siihen valmistuksessa jääneiden vapaiden karboksyyliiryhmien ansiosta negatiivinen neutraalissa pH:ssa (Thermo Fisher, 2005). Proteiinit adsorboituvat tehokkaasti karboksyyliiryhmillä päällystetyille pinnoille (Seradyn, Inc., 2005 [viitattu 27.5.2013]).

6.2 Europiumpartikkelit

RET-parin donorina käytettiin karboksylaattimodifioituja Eukelaattimikropartikkeleja (0,1 % natriumatsidia, partikkelinumero: 84470291010251, materiaali: CMEu, kiintoaineen osuus: 1 %, halkaisija: 0,068 µm, MFG erä: 1209, PKG erä: 030022, valmistanut Seradyn Inc., USA). Karboksylaattimodifioidut partikkelit sitovat hyvin proteiineja (Thermo Scientific, 2012). Eu on lantanidi, jonka kelaatin absorptiomaksimi näissä partikkeleissa on 333 nm ja emissiomaksimi n. 613 nm (Thermo Scientific, 2012).

Karboksyyliryhmät saavat aikaan negatiivisen nettovarauksen partikkeleille (Thermo Fisher, 2005).

6.3 Alexa Fluor 680® –fluoroforilla leimattu gammaglobuliini

Gammaglobuliinit ovat veren seerumin proteiineja. Elektroforeesissa ne vaeltavat gamma-alueelle eli kaikkein positiivisimmin varautuneelle alueelle (National Library of Medicine, 2011 [viitattu 8.5. 2013]) eli ne saavat neutraalissa pH:ssa negatiivisen nettovarauksen, isoelektrisen pisteen on ilmoitettu olevan välillä 6,4-8,8 (Condie, 1981). Suurin osa gammaglobuliineista on immunoglobuliineja

Alexa Fluor 680® on Life Technologiesin kehittämä fluoresoiva leimausaine. Sen eksitaatio on tehokkainta n. 679 nm:n aallonpituudella ja emittoi tehokkaimmin 702 nm:n aallonpituudella. Sen emissio havaitaan siis lähes infrapuna-alueella, mikä tekee siitä hyvin soveltuvan moniväri- ja RET-sovelluksiin. Alexa Fluor 680®:aa myydään valmiina kittinä proteiinien, erityisesti gammaglobuliineihin kuuluvan IgG:n, leimaukseen. (Molecular Probes, 2007)

Gammaglobuliini oli leimattu Turun yopiston Biofysiikan laboratoriossa, pitoisuus liuoksessa oli 1,6 g/l ja leimausaste 3,7. Alexa Fluor 680® -leimattua gammaglobuliinia (Alexa-γG) käytettiin RET-parin akseptorina.

6.4 BSA

Adsorptiossa käytetty proteiini oli Sigma-Aldrichin valmistamaa kylmäkuivattua BSA-jauhetta (tuotenumero A3059, erä 108K1295, Sigma-Aldrich, USA). Käytetyn BSA:n molekyyli­massa oli n. 66 kDa ja isoelektrinen piste 4,7-5,3 (Sigma-Aldrich, 2000).

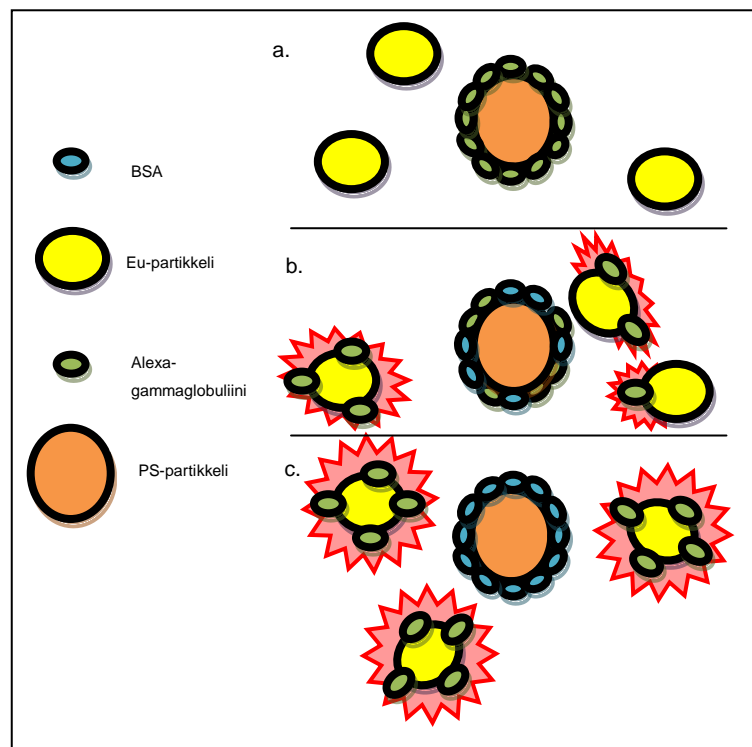
6.5 Victor²-monileimalaite

Luminesenssi mitattiin Victor²-monileimalaitteella (Wallac, PerkinElmer Analytical Life Sciences, Turku, Suomi). Laitteeseen sopivat standardikokoiset mikrotiiterilevyt. Laite soveltuu absorbanssin, luminesenssin ja fluoresenssin mittauksen lisäksi hyvin aikaerotteiseen fluorometriaan.

7 MENETELMÄT JA TÖIDEN SUORITUS

Kehitetty menetelmä perustui RET-parien muodostumisen detektioon aikaerotteisesti. Kuvassa 2 on esitetty menetelmän periaate. RET-pareina toimivat edellisessä kappaleessa mainitut Eu-partikkelit ja Alexa- γ G. Eu-partikkelien pinnalla on paljon vapaita karboksyyliiryhmiä, joiden happamuus edesauttaa proteiinien adsorptiota (Seradyn, Inc., 2005 [viitattu 27.5.2013]) adsorboiden Alexa- γ G:n ja kun näytettä viritetään Eu-partikkelien eksitaatioaallonpituudella, voidaan Alexan emissio havaita mikäli RET-pari on muodostunut.

Menetelmällä tutkittiin PS-nanopartikkeleita joiden pinnalle oli adsorboitu BSA:ta. Kun tällaisiin näytteisiin lisättiin Alexa- γ G:a, adsorboituivat nämä leimatut proteiinimolekyylit PS-partikkeleiden pinnoille niihin kohtiin, joihin ei ollut adsorboitunut BSA:ta, estäen näin mahdollisen RET-parin muodostumisen. Näin ollen kun Eu-partikkeleja lisättiin näytteisiin saatiin suurempi signaali, jos PS-partikkeleihin oli adsorboitunut BSA:ta.



Kuva 2. Periaatekuva näytteen täyttöasteen määrittämisestä. a. Näyteproteiinia ei ole adsorboitunut, signaali heikko. b. Näytteeseen on adsorboitunut proteiinia kohtalaisesti, signaali kohonnut. c. Adsorboitunut näyteproteiini täyttänyt PS-partikkelin, signaali korkea.

7.1 Adsorptio PS-partikkeleihin

Proteiinit adsorboitiin PS-nanopartikkeleihin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkissa. Adsorptio tapahtui 5 mM glysiinipuskurissa, pH:ssa 3. BSA:n konsentraatiota seoksissa vaihdeltiin välillä 3-10000 mg/l. Reaktiivilavuudessa (15-100 µl) nanopartikkelien massaosuus oli 0,25 % ja nanopartikkelit pipetoitiin seokseen viimeisenä. Seoksia inkuboitiin huoneenlämmössä vähintään 10 minuuttia.

Partikkelit erotettiin sentrifugoimalla 18620g:n kiihtyvyydellä 3 min kolmeen kertaan, poistaen supernatantin pipetoimalla erotusten välillä ja pesten partikkelit, vähintään 5-kertaisella määrällä reaktioseokseen nähden, vedellä. Partikkelit resuspensoitiin ultrapuhtaaseen veteen määriksiä varten.

7.2 Adsorptiopuskurin valinta

Adsorptio suoritettiin kuten on kuvattu yllä, mutta adsorptioseoksessa käytettiin vain BSA:n pitoisuuksia 0 ja 0,5 µg/l. Testattiin puskureita: 5 mM sitraatti pH 2,8 tai 4,4, 5 mM glysiini pH 3,0 tai 4,0 sekä 5 mM Tris pH 3,8. Määrittäminen suoritettiin kappaleessa 7.2 kuvatulla tavalla.

7.3 Määrittäksen suoritus

Määrittäykset suoritettiin keltaisilla 96-kaivoisilla mikrotiiterilevyillä (C12 Fluor Maxi, erä 12490, valm. Nunc A/S, Tanska). Pipetoitiin 70 µl 5 mM glysiinipuskuria (pH 4) kaivoihin. Lisättiin 10 µl halutussa suhteessa laimennettuja adsorpoituja partikkelinäytteitä. Sekoitettiin kuoppalevyravistelijassa (Wallac) muutaman sekunnin ajan. Lisättiin 10 µl Alexa-γG:a (0,13 mg/l) vedessä kuhunkin kaivoon. Sekoitettiin

kuoppalevyravistelijassa (Wallac) muutaman sekunnin ajan. Lisättiin 10 µl Eu-partikkeleja ($64,6 \cdot 10^{-6}$ %) vedessä kuhunkin kaivoon enintään 20 minuutin kuluttua Alexa-γG:n lisäyksestä. Sekoitettiin kuoppalevyravistelijassa (Wallac) muutaman sekunnin ajan. Inkuboitiin huoneenlämmössä (RT) noin 15 minuutin ajan ennen mittausta.

Mitattiin Victor²-monileimalaskimella 730 nm:n emissio käyttäen 340 nm:n eksitaatioaallonpituutta. Viive eksitaation jälkeen oli 75 µs ja mittausaika 50 µs.

7.4 Näytepartikkelien määrän vaikutus määrittämisessä

Suoritettiin adsorptio kuten kappaleessa 7.1 PS-nanopartikkeleihin. Adsorptioseoksen proteiinipitoisuus 0; 0,25; 0,5 tai 2,0 g/l. Seosten partikkelien massaosuus oli pesun jälkeen n. 0,25 %. Testattiin partikkelipitoisuuden vaikutusta laimentamalla adsorboidut seokset määrittämisestä (ks. kappale 7.3) massaosuuksiin: $4,17 \cdot 10^{-6}$ -0,125 %

7.5 Vertailumenetelmä

Vertailumenetelmä perustui tutkittavan proteiinin leimaamiseen. Proteiini leimattiin Eu-kelaatilla. Kun Eu-kelaatilla leimattu proteiini oli adsorboitu partikkeliin, altistettiin se happamille olosuhteille, jolloin Eu-ioni irtoaa kelaatista. Eu-ionien irrotuksen seosta käsiteltiin Europium Fluorescence Intensifier – reagenssilla (EFI) ja mitattiin europiumin fluoresenssin intensiteettiä.

7.5.1 Proteiinin leimaus Eu-kelaatilla

Valmistettiin BSA-liuos lisäämällä 15,2 mg BSA:ta 507 µl:an 0,2 M NaHCO₃:a (ph 10,0). Lisättiin 20 µl vettä pariin mg:an 9-hampaista Eu-kelaattia ($\{2,2',2'',2'''\text{-}[4'-(4'''\text{-isotiosyanatofenyyl})-2,2':6,6''\text{-terpyridiini-6,6''-diyyli]bis(metyleeninitriilo)}\}$ tetrakis (asetato)) europium, Harri Härmä, Biofysiikan laboratorio, Turku, Suomi). Sekoitettiin 18 µl kelaattiliuosta 45 µl:an edellä

mainittua BSA-liuosta. Inkuboitiin huoneenlämmössä valolta suojattuna noin tunnin ajan. Siirrettiin seos jääkaappiin ja inkuboitiin noin 14 tunnin ajan ennen geelisuodatusta.

7.5.2 Leimatun proteiinin puhdistus geelisuodattamalla

Eu-kelaatilla leimattua BSA:ta (Eu-BSA) puhdistettiin geelisuodatuspylväällä, jossa oli matriksina ristsidottu dekstraani (GE Healthcare, Sephadex™ G-25, PD-10). Pipetoitiin leimattu BSA kolonniin. Huuhdeltiin kolonni 2,2 ml:lla vettä, jonka jälkeen otettiin talteen 200 µl:n fraktioita, yhteensä 14, tarkkaillen luminesenssia silmämääräisesti UV-valon (Desaga Sarstedt-Gruppe MinUVIS, 302 nm) avulla.

Konsentroidiin geelisuodatuksesta saatu 6. fraktio (200 µl) haihduttamalla alipaineessa (Heto VR-1 ja CT60e) 80 minuutin ajan (lopputilavuus n. 35 µl). Sekoitettiin 20 µl:an konsentroitua fraktiota 20 µl:a BSA-liuosta (20 g/l). Käytettiin seosta proteiiniadsorptiossa (ks. Kappale 7.1).

Sekoitettiin eri laimennoksilla adsorboituja partikkeleja 4 M HCl:än, pipetoimalla 1,5 µl:a partikkeliseosta 0,5 µl:an 4 M HCl:ää, jolloin loppupitoisuudeksi HCl:lle saatiin 1 M, ja sekoitettiin pipetoimalla. Inkuboitiin (RT) n. 20 min., jonka jälkeen laimennettiin seos 1:1000 EFl:in. Käänteispipetoitiin seoksia keltaiselle mikrotiiterilevylle (C12 Fluor Maxi, lot. 12490, valm. Nunc) 200 µl/kaivo. Mitattiin Victor²-monileimalaskimella 30 minuutin inkuboinnin (RT) jälkeen, käyttäen 340 nm:n eksitaatioaallonpituutta, mitaten 615 nm:n emissiota. Mitattiin 400 µs:n viiveellä, 400 µs:n ajan.

7.5.3 Proteiinipitoisuuden määrittäminen leimatusta BSA:sta

Laimennettiin leimattu BSA 5 mM glysiinipuskuriin (pH 2) laimennoskertoimin: 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ ja 10^{-6} . Laimennettiin BSA (20 g/l) konsentraatioihin: 500, 100, 50, 20, 10, 5, 3,5, 2 ja 1 µg/l. Suoritettiin määrittäminen

muuten kuten kappaleessa 7.3 on kuvattu, mutta vaihdettiin Eu-partikkelien ja Alexa- γ G:n lisäämisjärjestystä keskenään.

Mitattiin Victor²-monileimalaskimella 730 nm:n emissio käyttäen 340 nm:n eksitaatioaallonpituutta. Viive eksitaation jälkeen oli 75 μ s ja mittausaika 50 μ s.

7.5.4 Europiumpitoisuuden määrittäminen leimatusta BSA:sta

Pipetoitiin leimauksessa (ks. kappale 7.5.1) käytettyä Eu-kelaattia tai fraktiota 0,5 μ l:aa 500 μ l:aan 1 M HCl-liuosta. Pipetoitiin 10 minuutin inkuboinnin (RT) jälkeen seoksia tai 1 μ M EuCl₃:a 0,5 μ l:aa 500 μ l:aan Europium Fluorescence Intensifieria (EFI)(42-04, lot KG0423, Kaivogen Oy, Suomi). Käänteispipetoitiin seoksia keltaiselle mikrotiiterilevyille 200 μ l/kaivo. Mitattiin Victor²-monileimalaskimella 30 minuutin inkuboinnin (RT) jälkeen, käyttäen 340 nm:n eksitaatioaallonpituutta, 615 nm:n emissio. Mittausviive 400 μ s, mittausaika 400 μ s.

7.6 Proteiinin adsorptio erikokoisiin nanopartikkelien

Suoritettiin adsorptio kappaleessa 7.2 kuvatulla menetelmällä myös erikokoisiin PS-partikkeleihin (Kisker Biotech, Steinfurt, Saksa). Partikkelien halkaisijat: 207 nm (tuotenumero: PPs-0.2), 384 nm (tuotenumero: PPs-0.4) ja 794 nm (tuotenumero: PPs-0.8). Partikkelien massaosuus adsorptiossa oli 0,25 %.

7.6.1 Erikokoisten nanopartikkelien täyttöasteen määrittäminen

Määrittäminen suoritettiin kuten Kappaleessa 7.3 on kuvattu. Käyttäen samaa laimennosta jokaisella partikkelikoolle tai niin, että niille näytteille, joiden valmistamiseen käytettiin suuremman halkaisijan omaavia partikkeleita, laimennettiin vähemmän.

7.7 Määritys ilman näytepartikkelien pesuvaihetta

Ennen määrittystä valmistettiin mikrosentrifugiputkissa pipetoimalla seos, jossa sopivat olosuhteet adsorptiolle: 60 µl 1xPBS (Cat no. BE17-517Q, lot 2MB147, exp 06/2014, valm. Lonza, laimennettuna 1:10 ultrapuhtaaseen veteen) tai glysiinipuskuria (5 mM, pH = 3,0), 6 µl 240 nm:n aminopäällystettyjä polystyreenipartikkeleja tai ultrapuhdasta vettä ja 6 µl BSA-liuosta (0; 0,3; 1,0 tai 3,0 g/l) vedessä. Suoritettiin määrittys muuten kuten kappaleessa 7.3 on kuvattu, mutta vaihdettiin Eu-partikkelien ja Alexa-γG:n lisäämisjärjestystä keskenään sekä valmistettiin Alexa-γG:sta toinenkin laimennos (1,3 mg/l), jolla määrittys suoritettiin myös, samalla tilavuudella (10 µl).

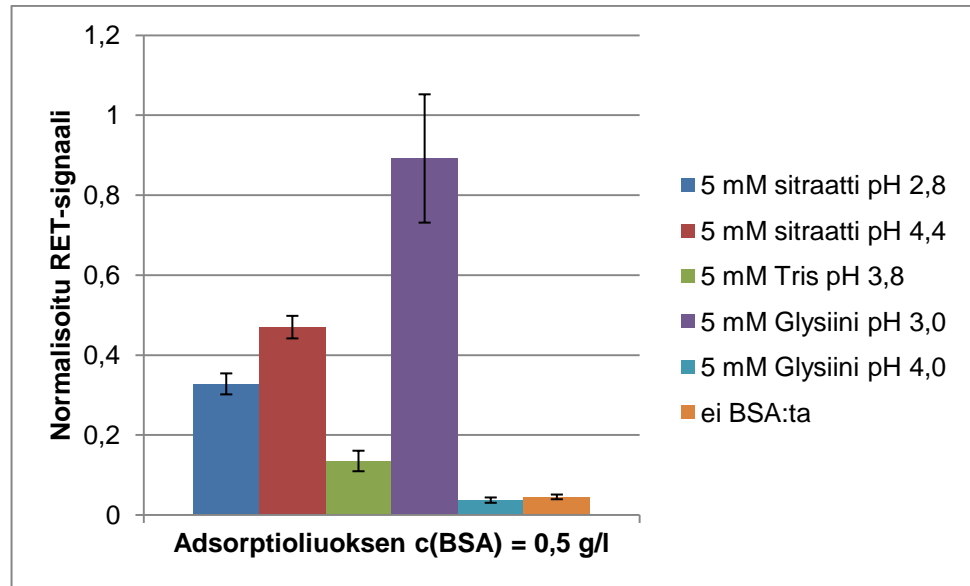
8 TULOKSET JA TARKASTELU

Tässä Kappaleessa on esitetty määritysten tulokset ja niiden arvioinnit. Tulokset on esitetty Excel-taulukkolaskentaohjelmalla piirrettyinä histogrammeina tai käyriä. Määrittelyssä on käytetty kolmea rinnakkaista ellei toisin ole mainittu, ja kuviot on piirretty käyttäen näiden rinnakkaisten näytteiden keskiarvoja. Kuvioissa esitettävät virhepalkit ilmentävät rinnakkaisten näytteiden keskihajontaa. Normalisoitu RET-signaali on määrittelyssä ilman partikkeleja saadun signaalin suhteen laskettu signaali. Tällöin arvo 1 vastaa määrittelyssä RET-parin vastaavissa olosuhteissa saatua maksimisignaalia. Tuloksissa havaitaan usein tätä suurempia signaaleja, mikä johtuu mahdollisesti siitä, että näytteen läsnäollessa Alexa-γG ei adsorboidu yhtä helposti kaivojen reunoille.

8.1 Adsorptiopuskurin valinta

Pyrittiin valitsemaan BSA:n adsorptioon sopiva puskuri, joka sopisi myös leimatun proteiinin adsorptioon ilman huolta Eu-ionin dissosiaatiosta leimasta. Leimana käytetystä Eu-kelaatista voi Eu-ioni irrota kun $\text{pH} < 3$ (Pihlasalo, 2011). BSA:n pI on 4,7 (Norde & Giacomelli, 2000). Proteiinien oletetaan yleensä pakkautuvan pinnoille tiheiden isoelektrisessä pisteessä (Rabe *et al.*, 2011).

Kuviosta 2 nähdään, että määrittelyssä suurin RET-signaali saatiin kun adsorptiossa käytettiin 5 mM glysiinipuskuria pH :ssa 3,0, joten tämä puskuri valittiin käytettäväksi BSA:n adsorptioon. Matalan pH :n glysiinipuskurissa voitaisiin myös mahdollisesta käyttää muita proteiineja ja partikkeleja adsorptiossa. Glysiini puskuroi pH :ssa 3,0 melko hyvin sen ensimmäisen pK_a -arvon ollessa 2,34 (Sigma-aldrich, 2013 [viitattu 26.5.2013]).

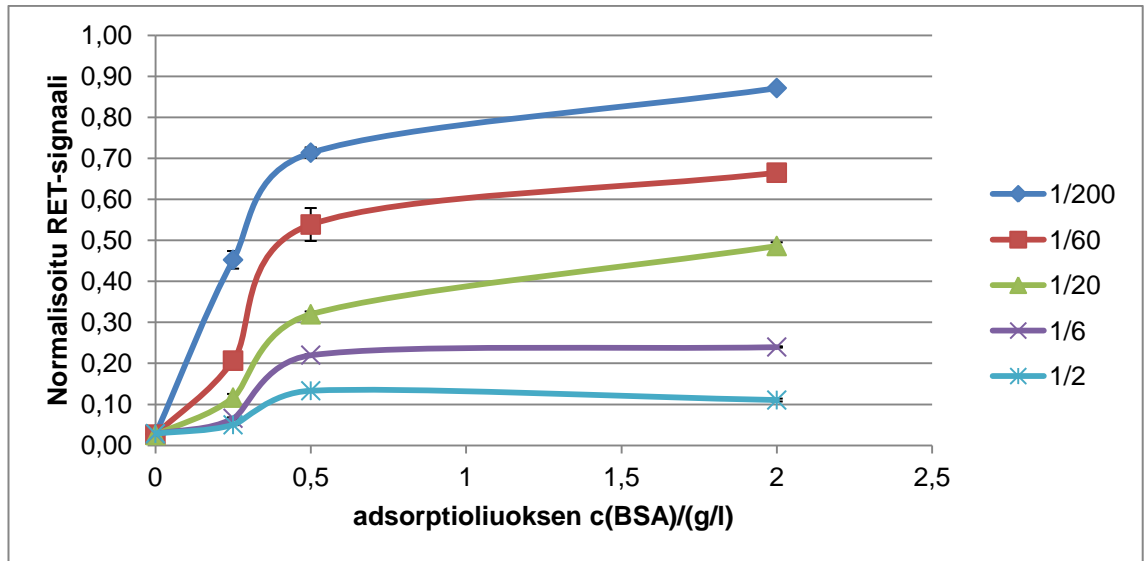


Kuvio 2. Adsorptiopuskurin vaikutus signaaliin.

Havaitaan myös, että partikkelinäytteiden, joita ei käsitelty proteiiniliuoksella, signaali on hyvin matala, mikä tukisi oletusta, jonka mukaan proteiinilla saturoitu partikkeli ei häiritse RET-signaalia.

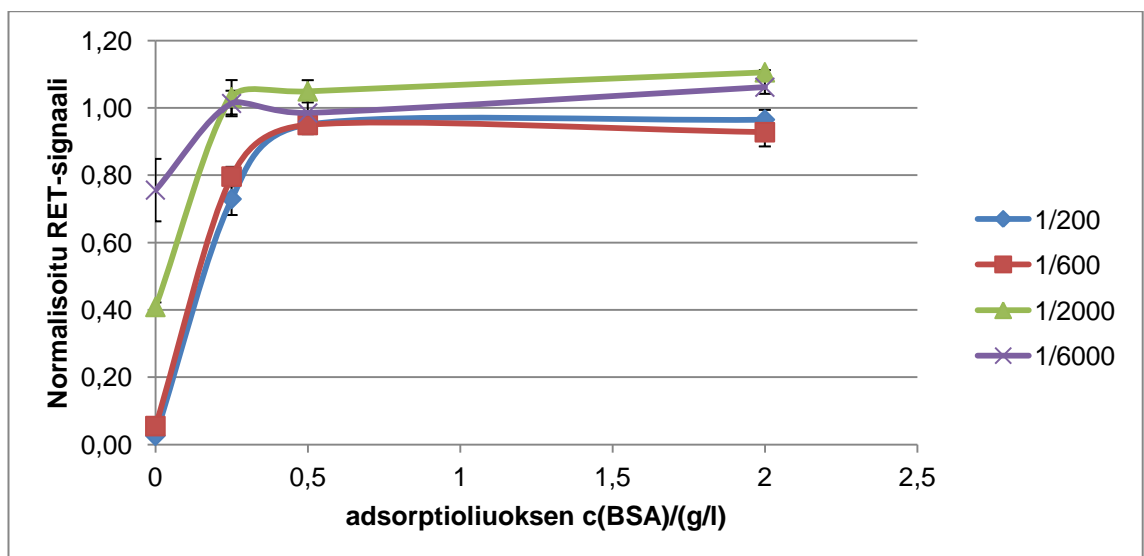
8.2 Partikkelipitoisuuden vaikutus määrittämisessä

Määrittämissä Eu-partikkelien ja Alexa-leimatun gammaglobuliinin pitoisuudet pidettiin vakioina. Käytettiin partikkeleja joihin adsorptio suoritettiin 0; 0,25; 0,5 ja 2,0 g/l –pitoisuuksilla 100 µl:n reaktiutilavuudessa. Partikkelien massaosuus ennen laimennosta oli 0,25 %. Kuviot 3 ja 4 kertovat RET-signaalin muutoksesta kehitetyssä määrittämisessä muutettaessa määrittämisessä käytettyä näytepitoisuutta. Laimennokset 1/2-1/6000 vastaavat näytteen massaosuutta $4,17 \cdot 10^{-6}$ -0,0125 %.



Kuvio 3. Partikkelipitoisuuden (1/200-1/2) vaikutus signaaliin.

Kuviosta 3. nähdään, että partikkelien suurempi pitoisuus pienentää saatua signaalia. Tämä johtuu siitä, että leimatulla gammaglobuliinilla on partikkelien suuren määrän ansiosta enemmän kokonaispinta-alaa sitoutua partikkeleihin, vaikka pinta-alaa partikkeliä kohden olisi hyvin vähän. Jos siis haluttaisiin mitata lähes saturoituneiden partikkeleiden adsorboituneen proteiinin määrien eroja, olisi kannattavaa käyttää tavallista suurempaa massaosuutta, eli yli $1,25 \cdot 10^{-4}$ %:n massaosuutta, vastaavan pinta-alan omaavaa näytettä määrityksessä.

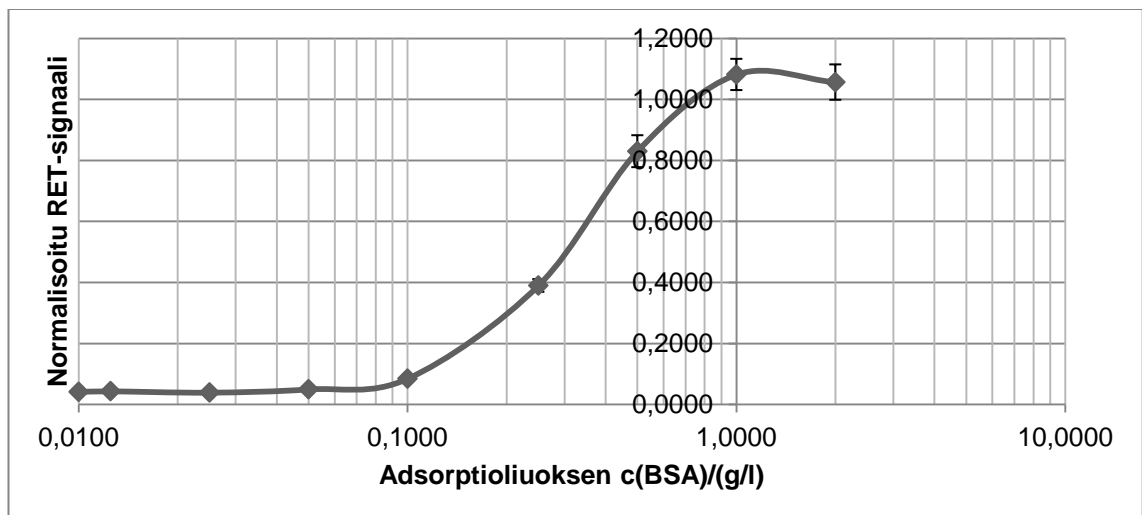


Kuvio 4. Partikkelipitoisuuden (1/60000-1/200) vaikutus signaaliin.

Kuviosta 4 huomataan, että jos näyte on liian laimea, ei pinta-ala partikkeleissa riitä läheskään kaiken leimatun proteiinin adsorptioon ja signaalia saadaan jo näytteellä, jossa proteiiniadsorptiota ei ole tapahtunut. Signaalin maksimi saavutetaan nopeasti, mutta jos näytteissä oletetaan olevan hyvin vähän adsorboitunutta proteiinia, eli paljon vapaata pinta-alaa partikkelia kohden, voidaan laimealla näytemäärällä havaita näiden näytteiden erot adsorptiossa.

8.3 Kehitetty menetelmä

Määrittämisen tarkoituksena oli arvioida se BSA:n pitoisuus adsorptiossa, jolla partikkelien kokonaispinta-ala saadaan täyttymään ja verrata tätä arvoa vertailumenetelmällä saatuun arvoon. Näytteen massaosuus määrittämisessä oli $0,125 \cdot 10^{-3} \%$. Kehitettyssä määrittämenetelmässä tämän arvon pitäisi vastata normalisoidun RET-signaalin arvoa 1. Kuviossa 5 nähdään RET-signaalin arvon 1 ylittävän, kun näytteen valmistuksessa käytetyn liuoksen (adsorptioliuos) BSA-pitoisuus välillä 0,70-0,80 g/l. Arvo kuitenkin nousee vielä 0,9 g/l – pitoisuuteen asti käyrän perusteella. Kuviossa 5 nähdään myös, että signaali alkaa nousta vasta adsorptioliuoksen pitoisuudella 0,10 g/l (BSA).



Kuvio 5. Kehitetyn määrittämenetelmän signaali adsorptioliuoksen BSA-pitoisuuden funktiona. Mittapisteet yhdistetty 4 kontrollipisteen avulla piirrettyä Bézier-käyrällä.

Valmistajan sivuilta (Spherotech, 2013 [viitattu 27.5.2013]) löytyy kaava, jonka mukaan laskettuna 20 µl:lla määrityksessä käytetyllä ja samaan massaosuuteen laimennetulla partikkelisuspensiolla on pinta-alaa 11,90 cm².

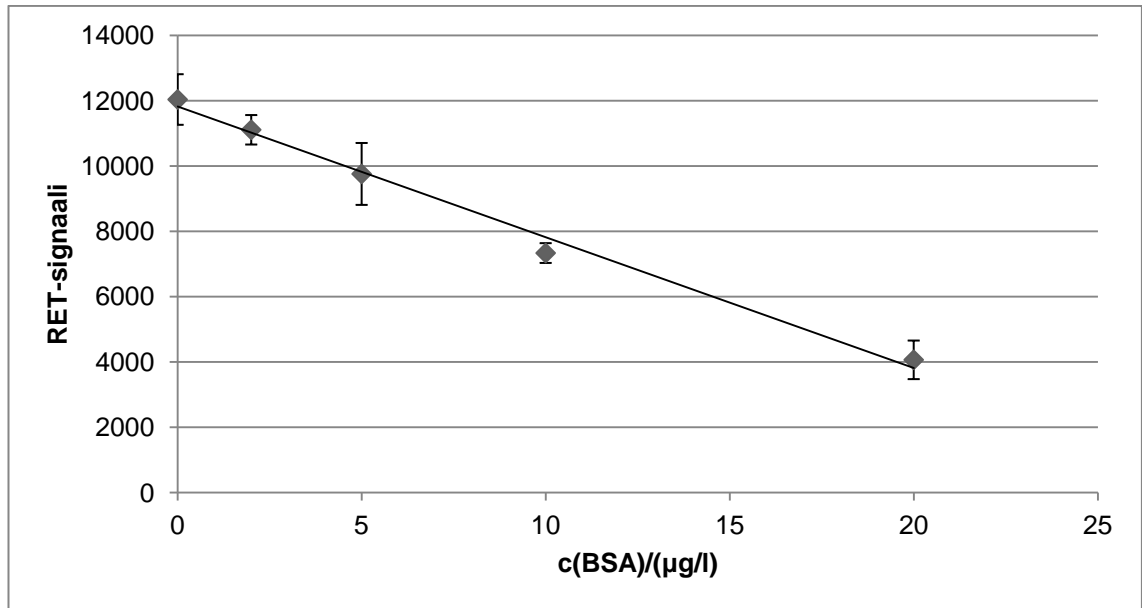
Jos oletetaan, että BSA-molekyylit täyttävät adsorboituessaan pinta-alan, joka on sen Stokesin säteellä (3,48 nm) (Sigma-Aldrich, 2000) lasketun ympyrän ala, vastaa 0,10-0,90 g/l -pitoisuus 20 µl:ssa adsorptioliuosta adsorptiopinta-alaa 6,9-62,5 cm². Huomataan, että näin laskemalla kuvaajasta arvioitu saturaatioon tarvittava BSA-pitoisuus (0,9 g/l) voi saturoida partikkelit. Tällä tavalla laskettuna partikkelien saturaatioon tarvittaisiin BSA:ta noin 0,17 g/l. Tällä tavalla laskettu BSA:n teoriassa täyttämä pinta-ala on tosin vain karkea arvio.

Dynaaminen mitta-alue voidaan laskea partikkelien pinta-alan perusteella. Dynaaminen mitta-alue partikkelien täyttöasteelle on 0,17-1,51 µg/cm² (m(BSA)/A(partikkelit)).

8.4 Vertailumenetelmä

Vertailumenetelmässä käytettiin adsorptiossa samaa partikkelipitoisuutta kuin kehityksessä menetelmässä. Vertailua varten täytyi määrittää adsorptiossa käytetyn leimatun ja leimaamattoman BSA:n seoksen proteiinikonsentraatio (ks. Kappale 7.3.1). Proteiinikonsentraation määrittämiseen käytettiin TR-LRET-signaaliin perustuvaa menetelmää pienin muutoksin (Pihlasalo, 2011).

Kuviossa 6 nähdään BSA-liuosten RET-signaali, jota vertaamalla samassa määrityksessä saatuun leimatun BSA:n laimennoksien RET-signaaliin voidaan määrittää leimatun BSA:n pitoisuus.



Kuvio 6. BSA-näytteiden RET-signaali lineaarisella alueella proteiinkonsentraation määrittämisessä. Kuvaaajaan on mittapisteiden avulla piirretty suora, jonka yhtälön avulla lasketaan signaalia vastaava proteiinipitoisuus. Suoran kulmakerroin $-400 \cdot 10^6$ l/g, pystyakselin leikkauspiste 12000 ja korrelaatiokerroin 0,991.

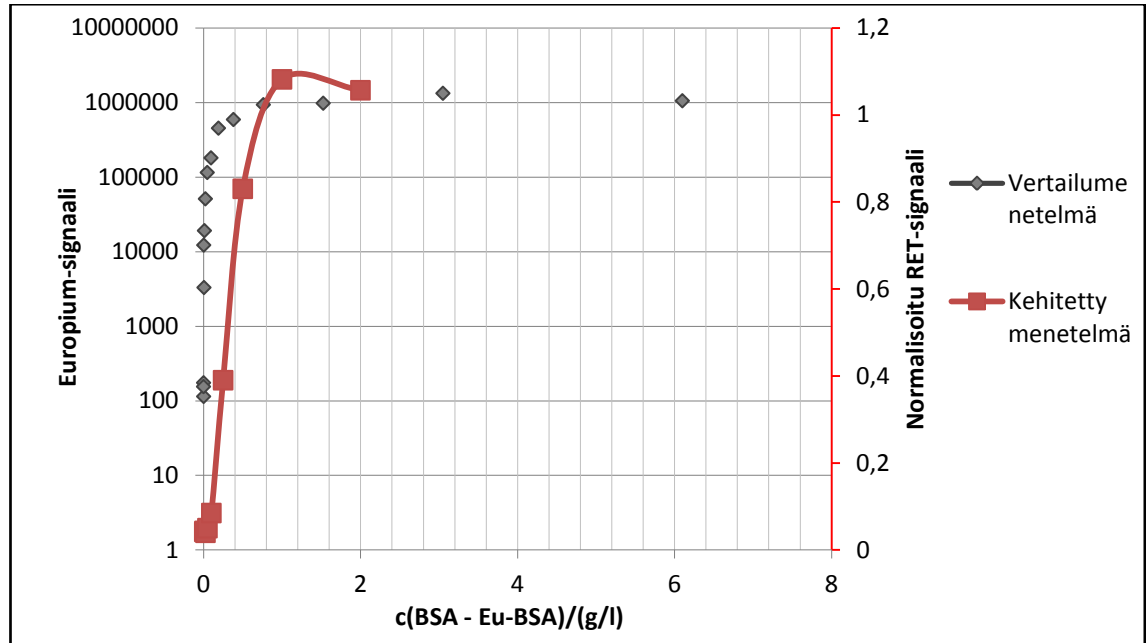
Taulukosta 1 nähdään vertailumenetelmässä käytetyn proteiiniseoksen proteiinipitoisuus. Huomataan, että kahdella eri laimennoksella saadun signaalin perusteella lasketut proteiinipitoisuudet vaihtelevat suuresti keskenään.

Taulukko 1. Leimatun proteiinin pitoisuus liuoksessa.

Laimennos	RET-signaali	c(Eu-BSA)/(g/l)	c(Eu-BSA, keskiarvo)/(g/l)
10^{-6}	6661	13	11
$5 \cdot 10^{-5}$	5326	8,1	

Pitoisuus on laskettu Kuviossa 6 esitetyn yhtälön avulla, jonka korrelaatiokerroin on hyvä. Tähän liuokseen sekoitettiin vielä ennen adsorptiota BSA-liuosta (20 g/l) suhteessa 1:1, jolloin valmiin seoksen pitoisuudeksi saatiin 15 g/l.

PS-partikkeleiden adsorptiossa käytettiin leimatun ja leimaamattoman BSA:n seosta. Tulokset mitattiin monileimalaskimen europium-protokollalla ja tuloksista piirrettiin kuvio 6.

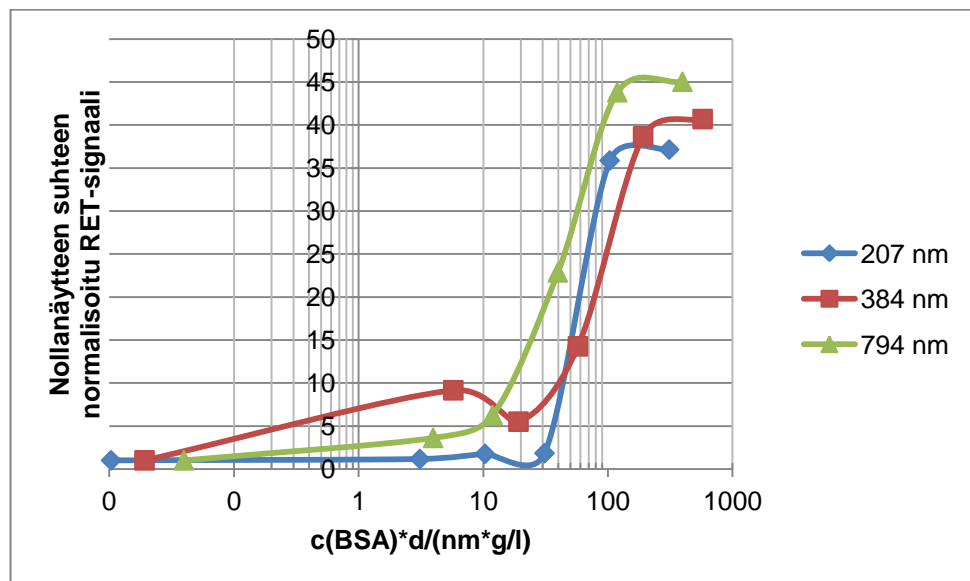


Kuvio 7. Leimatun ja leimaamattoman BSA:n seoksen europium-signaali Kappaleessa 7.5.4. kuvatulla menetelmällä mitattuna. Kehitetyn menetelmän käyrä on esitetty punaisena..

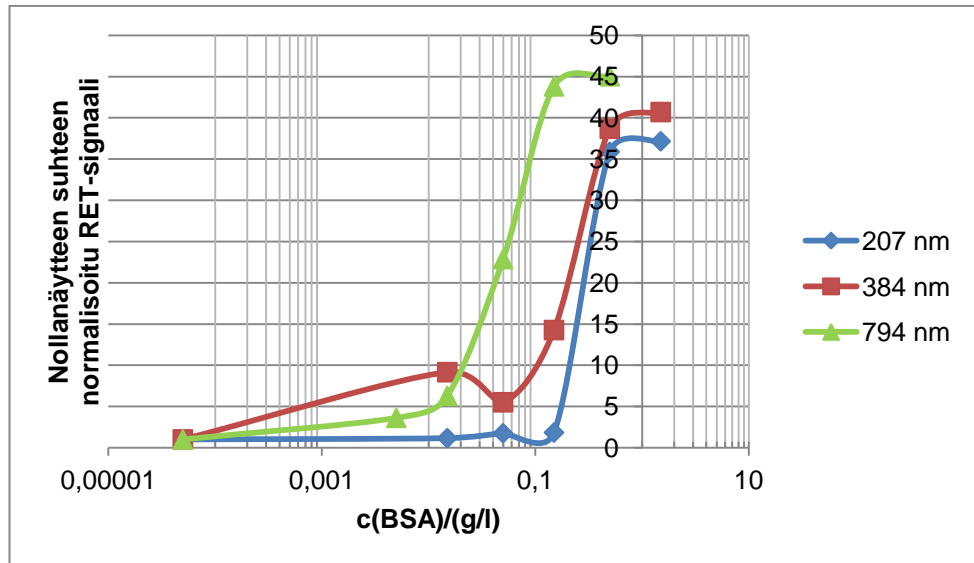
Kuviosta 7 nähdään partikkeleihin adsorboidun leimatun BSA:n signaalin alkavan, partikkeleiden saturaation merkinä, tasaantua BSA:n ja Eu-BSA:n seoksen pitoisuuden 0,8 g/l. Arvo on hyvin lähellä kehitetyllä määritysmenetelmällä saatua. Arvo kuitenkin nousee vielä 3,0 g/l BSA-pitoisuudessa, mikä saattaa proteiinien konformaation muutoksesta adsorption seurauksena. Mittauksissa käytettiin kahta rinnakkaista näytettä, sillä mittaus europium-protokollalla oli pidempi kuin RET-signaalin mittauksissa käytettävällä protokollalla ja tapahtui pidemmän viiveen kuluttua, jolloin hajonta ja tausta jäivät suhteellisesti pienemmiksi.

8.5 Nanopartikkelien koon vaikutus määrittäksessä

Kokeiltiin määrittästä myös 207 nm:n, 384 nm:n ja 794 nm:n PS-partikkeleilla, joita ei oltu päällystetty aminoryhmillä. Kokeiltiin määrittästä näytteen 0,00125 %:n massaosuudella, koska suuremmat partikkelit omaavat pienemmän ominaispinta-alan massayksikköä kohti (ks. Kappale 8.2). Tulokset on esitetty Kuviossa 8, niin että RET-signaali on suhteutettu jokaisen partikkelikoon ilman proteiinia inkuboituun näytteeseen partikkelikoon signaaliin aiheuttaman vaikutuksen minimoimiseksi. X-akselille on laskettu jokaisen näytteen adsorptioliuoksen proteiinkonsentraatio kerrottuna kyseisten partikkelien halkaisijalla, jotta nähdään menetelmän pystyvän kertovan saturaation asteesta monella eri partikkelikoolla samoissa määrittäsolosuhteissa. Partikkelien suoma kokonaispinta-ala vähenee partikkelien halkaisijan suuretessa ja Kuviossa 8 arvo 119,1 nm*g/l vastaa BSA-pitoisuutta 0,15 g/l adsorptioseoksessa. Kuviossa 9 erot nähdään vielä selkeämmin.



Kuvio 8. Partikkelikoon vaikutus määrittäksessä. Signaali suhteessa proteiinipitoisuuteen ja partikkelien halkaisijoihin.



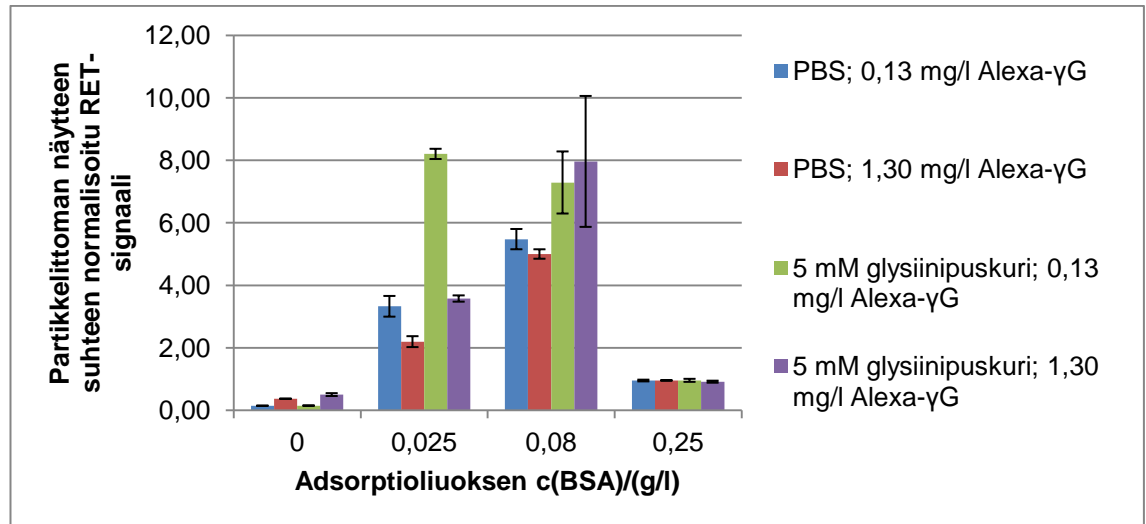
Kuvio 9. Partikkelikoon vaikutus määrittämissä.

Määrittäminen toimii myös näihin pinnan ominaisuuksiltaan ja kooltaan hieman aiemmin testatuista partikkeleista eroavien partikkelien pinnalle tapahtuvan proteiiniadsorption asteen mittauksiin.

8.6 Määrittäminen ilman näytepartikkelien pesuvaihetta

Tässä määrittämissä yritettiin havaita proteiini määrää liuoksesta kuten Eu-BSA:n proteiinipitoisuuden määrittämissä (Kappale 8.4). BSA:lla käsiteltyjen partikkeliseosten RET-signaalia verrattiin ilman partikkeleita valmistettujen seosten (proteiiniliuosten) RET-signaaliin. RET-signaalin ennustettiin olevan pienempi ilman partikkeleita kuin niiden kanssa, koska proteiinit adsorboituisivat niiden sijaan Eu-partikkeleihin.

Kuviosta 10 nähdään muiden seosten, paitsi 5 mM glysiinipuskurissa 0,13 mg/l Alexa-γG:n pitoisuudella määritetyn seoksen, signaalien nousevan suhteessa proteiiniliuosten signaaliin 0,08 g/l BSA-pitoisuuteen asti.



Kuvio 10. Ilman pesuvaihetta tehdyn määrittelyn signaali.

Signaalin lasku BSA-pitoisuudessa 0,25 g/l proteiiniliuoksen signaalin tasolle kertoo liuoksen tarpeeksi runsaasta proteiinien pitoisuudesta signaalin laskuun. Tämän takia määrittely ei kertonut luotettavasti proteiiniadsorption asteesta. Havaittiin kuitenkin, että adsorptio muuttui ennustetulla tavalla joissakin näytteissä, joissa oli sopiva proteiinipitoisuus, joten tämäkin menetelmä voitaisiin saada toimimaan tulevaisuudessa.

9 YHTEENVETO

Kehitetyllä menetelmällä havaitaan eri täyttöasteita proteiiniadsorption seurauksena ja saturaatiopiste, mahdollisesti hyvinkin tarkasti optimoimalla näytteen tai RET-parin pitoisuus määrityksessä.

Vertailumenetelmän avulla arvioitu saturaatiopitoisuus oli hieman kehitetyllä menetelmällä saatua pitoisuutta pienempi, mutta signaali näytti nousevan äkillisesti vielä näennäisen tasaantumisen jälkeen. Tämä johtuu luultavasti siitä, että proteiinit voivat muuttaa konformaatiotaan ja pakkaantua tiheämmin partikkelin pintaan, mikä näkyy vertailumenetelmässä signaalin kohoamisena. Kehitetyllä menetelmällä saadaan näin ollen tietoa näytteen täyttöasteesta proteiiniadsorption seurauksena vähintään vertailumenetelmään verrattavalla tarkkuudella, olettaen etteivät leimatun proteiinin konformaatio ja sitoutumisominaisuudet juurikaan muutu leimauksen seurauksena. Koska kehitetty menetelmä ei vaadi näyteproteiinin muokkausta on se myös vertailumenetelmää nopeampi.

Kehitetyllä menetelmällä ei voida erottaa kuinka paljon proteiinia on saturaation jälkeen konformaation muutosten seurauksena adsorboitunut pinnalle. Vertailumenetelmälläkin konformaation muutosten seuraus on hankalaa, mutta saturaation saavutuksen jälkeen äkillinen nousu signaalissa voisi antaa tästä joissain tapauksissa viitteen.

Menetelmä on nopea suorittaa ja sitä voidaan soveltaa erilaisen kokonaispinta-alan omaavien näytteiden mittaamiseen. Havaittiin myös, että menetelmä toimii erilaisia adsorptiopinnan funktionaalisia ryhmiä omaaviin PS-partikkeleihin ja teoriassa kaikkiin partikkeleihin joihin leimattu gammaglobuliini adsorboituu olosuhteissa jotka eivät aiheuta näytteessä adsorboituneiden proteiinien irtoamista tai leimatun gammaglobuliinin kiinnittymistä näytteessä jo olleeseen proteiiniin.

Kehitetty menetelmä toimii kvantitatiivisesti kertoen partikkelin pinnan täyttymisasteesta proteiiniadsorption seurauksena. Menetelmä ei kuitenkaan anna tietoa proteiinien konformaation muutoksista, orientaatiosta adsorptiopinnan suhteen tai adsorboituneen proteiinkerroksen paksuudesta.

LÄHTEET

- Adamczyk, Z. (2011) Modeling Adsorption of Colloids and Proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17: 173-186.
- Andrade, J.D.; Hlady V. (1986) Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses. *Advances in Polymer Science*, 79: 1-63.
- Brash, J.L.; Horbett, T.A. (1995) Proteins at Interfaces II. *ACS Symposium Series*, 1-23.
- Condie, R.M. (1981) Pure Intravenous Human and Animal Gamma Globulins. US patent number US4296027.
- de Wolf, F.A.; Brett, G.A. (2000) Ligand-Binding Proteins: Their Potential for Application in Systems for Controlled Delivery and Uptake of Ligands, *Pharmacological Reviews*, 52: 207-236.
- Gudgin Dickson, E.F.; Pollak, A.; Diamandis, E.P. (1995) Ultrasensitive Bioanalytical Assays Using Time-Resolved Fluorescence Detection, *Pharmac. Ther.*, 66: 207-235.
- Heino, J.; Vuento, M. (2010) Biokemian ja Solubiologian Perusteet. 2. uudistettu painos. ss. 50–62. Helsinki: WSOYpro Oy.
- Inkinen, P.; Tuohi, J. (2006) Momentti 1: Insinöörifysiikka, 4.-5. painos, ss. 317, Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Otava
- Lakowicz, J.R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3. painos, ss. 1-23, Springer Science+Business Media, LLC, USA.
- Majorek, K.A.; Porebski, P.J.; Dayal, A.; Zimmerman, M.D.; Jablonska, K.; Stewart, A.J.; Chruszcz, M.; Minor, W. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins, *Molecular Immunology*, 52: 174-182.
- Molecular Probes, Inc. (2007) Alexa Fluor® 680 Protein Labeling Kit (A20172), Product Information, ss. 1-4.
- National Library of Medicine (2011) Medical Subject Headings, heading: gamma-Globulins [online, viitattu 8.5.2013]. Saatavilla www.muodossa: http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&index=5487&view=expanded.
- Norde, W.; Giacomelli, C. E. (2000) BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *Journal of Biotechnology*, 79: 259–268.
- Norde, W.; Lyklema, J. (1978) The Adsorption of Human Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Negatively Charged Polystyrene Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 66: 257-265.
- Pihlasalo, S. (2011) Quantification of proteins and cells. Ph. D. thesis. University of Turku, Turku, Suomi.
- Quiquampoix, H. (2000) Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil. *Soil Biochemistry*, 10: 171–206.
- Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. (2011) Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, 162: 87-106.

Ramsden, J.J. (1993) Experimental methods for investigating protein adsorption kinetics at surfaces. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 27: 41-105.

Seradyn, Inc. (2005) OptiBind® Polystyrene and OptiLink® Carboxylate-Modified Microparticles, [online, viitattu 27.5.2013]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.distrilabparticles.com/life_science/pdf/TN-001%20Optibind%20-%20Optilink.pdf](http://www.muodossa: http://www.distrilabparticles.com/life_science/pdf/TN-001%20Optibind%20-%20Optilink.pdf)

Sigma-Aldrich (2000) Albumin from Bovine Serum, Product Information, ss. 1-4.

Sigma-Aldrich (2013) Properties of Common Amino Acids [online, viitattu 26.5.2013]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html](http://www.muodossa: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html)

Spherotech (2013) Characteristics of Polystyrene Particles, [online, viitattu 27.5.2013]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.spherotech.com/particle.html](http://www.muodossa: http://www.spherotech.com/particle.html).

Stamler, J.S.; Jaraki, O.; Osborne, J.; Simon, D.I.; Keaney, J. Vita, J.; Singeli, D.; Valeri, C.R.; Loscalzo, J. (1992) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 7674-7677.

Thermo Fisher (2005) Selecting Microsphere Surface Properties for Diagnostic Applications, Technical Note, ss. 1-3

Thermo Scientific (2012) Thermo Scientific Particle Technology Product Catalog and Technical Reference Guide, ss. 41.

Valeur, B. (2001) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Saksa.

Vroman, L. (1966) *Blood*. Natural History Press. (viitattu Andrade & Hlady, 1986).