



**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
ÅBO YRKESHÖGSKOLA**

**Opinnäytetyö**

**Modifioitujen nanopartikkelien  
erottelumenetelmät**

**Marika Ibrahim**

**Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma  
2012**

Koulutusohjelma:	
Bio- ja elintarviketekniikka	
Tekijä: Marika Ibrahim	
Työn nimi: Modifioitujen nanopartikkelien erottelumenetelmät	
Suuntautumisvaihtoehto: Biotekniikka	Ohjaajat: FM Johanna Vuojola TkT Mika Jokinen
Opinnäytetyön valmistumisajankohta: Maaliskuu 2012	Sivumäärä 32
<p>Turun yliopiston Elintarvikekemian ja Biokemian laitoksella on ollut käytössä pääasiassa kaupallisia, ylöskonvertoivia fosforipartikkeleita. Kaupallisten partikkelien koko, useita mikrometrejä, on ollut kuitenkin liian suuri useimpiin sovelluksiin. Tämän vuoksi partikkeleita on jauhettu pienemmiksi planeettakuulamylyllä. Planeettakuulamylyllä jauhetuilla partikkeleilla ongelmana on ollut suuri kokojakauma sekä partikkelien epäsäännöllinen muoto. Liian pieneksi jauhautuneet partikkelit ja liian suuret partikkelit eivät ole soveltuneet diagnostisiin analyyseihin. Tästä johtuen kokeiltiin eri menetelmiä jauhettujen partikkelien erottamiseksi eri kokoluokkiin. Tavoiteltava kokojakauma oli 20-100 nm. Laitoksella yleisimmin käytetyt partikkelit koostuvat epäorgaanisesta materiaalista, kuten NaYF<sub>4</sub>:sta sekä pohja-aineeseen seostetuista herkistin- ja aktivaattori-ioneista. Ytterbium-ioni (Yb<sup>3+</sup>) toimii energian vastaanottajana eli herkistimenä ja toinen trivalenttinen lantanidi-ioni (Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup> tai Ho<sup>3+</sup>) emittoi säteilyn. Partikkeleita voidaan myös modifioida piidioksidipinnoitteella, jotta niiden dispergoituminen veteen sekä biomolekyylien konjugaatio pintaan onnistuu. Joidenkin partikkelien piidioksidipinnoitteeseen voidaan konjugoida esimerkiksi streptavidiinia, vasta-aineita tai oligonukleotidejä.</p> <p>Työssä testattiin kalvosuodatusta, geelisuodatusta ja asymmetristä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointia partikkelien fraktiointiin. Tarkoituksena oli erotella partikkelit eri fraktioihin. Partikkelien pitoisuuden määrittämiseksi mitattiin fraktioiden fluoresenssi-intensiteettiä. Toimivuutta testattiin heterogeenisellä bio-BSA-määrityksellä. Partikkelikokoa mitattiin Coulter® N4 plus submicron-partikkelikokoanalyysointilaituksella. Partikkelikoko haluttiin myös tarkistaa visuaalisesti kuvaamalla näytteitä läpäisyelektronimikroskooppikuvauksella. Työssä käytettiin pääasiassa pintakäsittlemättömiä partikkeleita sekä piidioksidipinnoitettuja partikkeleita.</p> <p>Tavoitteita ei täysin saavutettu. Parhaimmalta vaihtoehdolta näyttää kuitenkin geelisuodatus, jossa suuren tilavuuden suodatuksessa saatiin lupaavia tuloksia.</p>	
Hakusanat: ylöskonversio, UCP, partikkeli, nanopartikkeli, kalvosuodatus, geelisuodatus	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto	

Degree Programme	
Biotechnology and Food Technology	
Author: Marika Ibrahim	
Title: Separation methods for modified nano-sized particles	
Specialization line: Biotechnology	Instructors: Mika Jokinen, D.Sc. Johanna Vuojola, M.Sc.
Date: March 2012	Total number of pages 32
<p>The Department of Biochemistry and Food Chemistry at the University of Turku has mainly used commercial upconverting phosphor particles. The commercial particles, however, have been several micrometers in size, which is too much for several applications. Therefore, the particles have been ground into smaller particles with a planetary ball mill. This has resulted in problems such as a wide size distribution and irregular particle shape. Some of the particles have not been suited for analysis due to their size. In this thesis project, different methods were tested for separating the particles to different fractions based on their size. The desirable size distribution was 20-100 nm. The most commonly used particles in the department consisted of an inorganic material such as NaYF<sub>4</sub>, as well as the base material alloyed with sensitizer and activator ions. Ytterbium ions (Yb<sup>3+</sup>) were used as energy receiver, i.e., sensitizer, and the other trivalent lanthanide ions (Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup> and Pr<sup>3+</sup>) emitted the radiation. They could also be modified by coating them with silica so as to facilitate their dispersion in water and the conjugation of biomolecules on the surface. Some of the silica coated particles were conjugated with streptavidin.</p> <p>The particle fractionation was performed by membrane filtration, gel filtration, and asymmetrical field flow fractionation. The purpose was to separate the various fractions of different particle sizes. The concentration of the particles was determined by measuring the fluorescence intensity of the fractions and confirmed by the heterogeneous bio-BSA method. Particle size was determined by means of a particle-size analyzer (Coulter® N4 plus submicron). In addition, the particles were visually checked by using a transmission electron microscope. In this study, both bare and silica-coated nanoparticles were investigated.</p> <p>The goals were not fully achieved. The best results were obtained by gel filtration which appears to be the most promising alternative.</p>	
Keywords: upconversion, UCP, particle, nanoparticle, membrane filtration, gel filtration	
Deposit at: Turku University of Applied Sciences library	

# SISÄLTÖ

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>YLÖSKONVERTOIVAT FOSFORIT</b>	<b>7</b>
2.1	Partikkelit	7
2.1.1	Kolloidaaliset partikkelit	7
2.1.2	Dispersiot	7
2.1.3	Kolloidien stabiilisuus	8
2.1.4	Ylöskonvertoivat nanopartikkelit	9
2.1.5	Ylöskonvertoivien fluoresoivien nanopartikkelien käyttö biolääketieteen sovelluksissa	11
<b>3</b>	<b>MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>12</b>
3.1	Materiaalit	12
3.1.1	Liuokset	12
3.1.2	UCP-Partikkelit ja näytteen valmistus	12
3.1.3	Matriisit	13
3.2	Erottelumenetelmät	14
3.2.1	Kalvosuodatus	14
3.2.2	Geelisuodatus	15
3.2.3	Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (AFFFF)	16
3.3	Mittausmenetelmät	17
3.3.1	Fluoresenssi-intensiteetin määrittäminen kalvosuodatetuille fraktioille	17
3.3.2	Fluoresenssi-intensiteetin määrittäminen geelisuodatetuille fraktioille	18
3.3.3	Pitoisuuden määrittäminen	18
3.3.4	Heterogeeninen bio-BSA-määrittäminen	19
3.3.5	Partikkelikoon määrittäminen	19
3.3.6	Läpäisyelektronimikroskooppikuvaus	20
<b>4</b>	<b>TULOKSET</b>	<b>21</b>
4.1.1	Kalvosuodatus	21
4.1.2	Geelisuodatus	24
4.1.3	Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (AFFFF)	27

<b>5</b>	<b>POHDINTA</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>LÄHTEET</b>	<b>30</b>

## **LIITTEET**

LIITE 1 Partikkelien rakenne.

LIITE 2 AFFFF-ajojen tiedot.

LIITE 3 Partikkelikokomittaukset kalvosuodatuksille.

LIITE 4 Partikkelikokomittaukset geelisuodatuksille.

## **KUVAT**

Kuva 1. Kaaviokuva suodatusjärjestelmän kokoonpanosta. Kalvosuodattimien tyypit ja huokoskoot on esitetty vasemmalla.	15
Kuva 2. AFFFF-laitteen toimintaperiaate (25).	17
Kuva 3. Heterogeenisen bio-BSA-määrityksen periaatekuva.	19
Kuva 4. Ajoj 1-4: fluoresenssin mittausta sekoitetuista fraktioista ja 30 minuuttia seisotetuista fraktioista. X-akselilla on kerrottu suodattimen koko, jonka alta fraktio on kerätty.	21
Kuva 5. Ajo 2: Heterogeenisen bio-BSA-määrityksen signaalit ja signaalin suhde määrityksen taustaan.	22
Kuva 6. TEM-kuva, LL262-SA (40 mM EDC & 60 mM NHS), kalvosuodatus, mennyt 50 nm kalvosuodattimen läpi, Näyte ajoliuoksessa A, pesty MQ:lla	23
Kuva 7. Geelisuodatusfraktioiden intensiteetit.	24
Kuva 8. Arvioitu saantoprosentti geelisuodatuksen jälkeen.	25
Kuva 9. Ajo 3: Heterogeeninen bio-BSA määritys. Signaalit ja signaalin suhde taustaan.	26
Kuva 10. TEM-kuva, LL262-SA (40 mM EDC & 60 mM NHS), Geelisuodatus, F2-fraktio (pääpiikki), Näyte ajoliuoksessa A, pesty MQ:lla.	27
Kuva 11. Ajo 1: dynaaminen sironta. A: retentioaika (s), 90: musta käyrä, sironta 90°, 60: sininen käyrä, sironta 60°.	28

## **TAULUKOT**

Taulukko 1. Kolloidaalisia dispersioita (2)	8
Taulukko 2. AFFFF-laitteen ajossa käytetty perusohjelma.	17

## 1 JOHDANTO

Turun yliopiston Biokemian ja Elintarvikekemian laitoksella on käytetty ylöskonvertoivia (UCP) fosforeita jo pitkään. Ylöskonversioksi kutsutaan sitä, kun matalaenergisen valo muuntuu korkeampienergiseksi valoksi. Laitoksella käytetyillä UCP-partikkeleilla viritys tapahtuu 980 nm:ssä eli infrapunataajuudella ja pääemissiopiikit saadaan ~550 ja ~660 nm:ssä eli näkyvän valon taajuuksilla. UCP-partikkelit ovat ainutlaatuisia tässä ominaisuudessaan, eikä tätä ominaisuutta esiinny millään muulla materiaalilla perinteisillä viritysväliainetehtävillä.

UCP-fosforit ovat siis partikkelimaisia leimoja, joita käytetään diagnostiikan eri sovelluksissa. Niitä voidaan valmistaa syntetisoimalla epäorgaanisesta pohja-aineesta, kuten oksisulfidista tai fluoridista. Laitoksella yleisimmin käytetty materiaali on NaYF<sub>4</sub>. Pohja-aineeseen seostetaan myös niin kutsuttuja herkistin- ja aktivaattori-ioneja. Yleisesti energian vastaanottajana eli herkistimenä käytetään ytterbium-ioni (Yb<sup>3+</sup>) ja toinen trivalenttinen lantanidi-ioni (Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup> tai Ho<sup>3+</sup>) emittoi säteilyä. Partikkeleita voidaan myös modifioida piidioksidipinnoitteella, jotta niiden dispergointi veteen sekä biomolekyylien konjugaatio pintaan saadaan mahdolliseksi. Joidenkin partikkelien piioksidipinnoitteeseen voidaan konjugoida esimerkiksi streptavidiniä, vasta-aineita tai oligonukleotideja. Tässä työssä käytettiin kuitenkin pääasiassa pintakäsittelymättömiä ja piioksidipinnoitettuja partikkeleita.

Bio- ja Elintarvikekemian laitoksella on käytettyä pääasiassa kaupallisia UCP-partikkeleita, joiden koko on ollut kuitenkin liian suuri useimpiin sovelluksiin. Niitä on siksi jauhettu pienemmäksi planeettakuulamylyllä. Jauhaminen tuottaa kuitenkin muita ongelmia, kuten liian suuren partikkelikokojakauman ja epäsäännöllisen muotoisia partikkeleita. Yli 400 nm halkaisijaltaan olevien partikkelien ongelmana on ollut nopea sedimentoituminen astian pohjalle. Suuren koon takia joissakin määrityksissä biomolekyylien väliselle sitoutumiselle on muodostunut steerisiä esteitä, kinetiikan hidastumista sekä epäspesifistä määritystaustaa. Alle 10 nm partikkeleilla ongelmana on taas ollut se, että ne fluoresoivat heikosti ja siksi nekin eivät ole toivottuja.

Tässä työssä oli tarkoituksena tutkia erilaisten fraktiointimenetelmien toimivuutta erikokoisten partikkelien erotukseen planeettakuulamylyllä jauhamalla tuotetuille UCP-partikkeleille. Tavoitteena oli saada 20-100 nm kokoiset partikkelit omaan fraktioon, koska se oli analyysien kannalta toimivin kokojakauma.

Työssä testattiin kalvosuodatusta, geelisuodatusta ja asymmetristä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointia partikkelien fraktiointiin. Tarkoituksena oli erotella erikokoiset partikkelit eri fraktioihin. Partikkelien pitoisuuden määrittämiseksi mitattiin fraktioiden fluoresenssi-intensiteettiä. Toimivuutta testattiin heterogeenisellä bio-BSA-määrityksellä. Partikkelikokoa mitattiin Coulter® N4 plus submicron-partikkelikokoanalysaattorilla. Partikkelikoko haluttiin myös tarkistaa visuaalisesti kuvaamalla näytteitä läpäisyelektronimikroskooppikuvauksella. Työssä käytettiin pääasiassa pintakäsittlemättömiä partikkeleita sekä piioksidipinnoitettuja partikkeleita.

## 2 YLÖSKONVERTOIVAT FOSFORIT

### 2.1 Partikkelit

#### 2.1.1 Kolloidaaliset partikkelit

Kolloidaalinen olomuoto tarkoittaa sitä, että partikkeli/hiukkanen on ainakin yhdessä dimensiossa mittakaavassa 1 nm-1 µm. Kolloideja on kahdenlaisia: lyofiilisiä eli liuotinhakuisia ja lyofobisia eli liuotinpakoisia. Lyofiiliset kolloidit ovat termodynaamisesti stabiileja ja muodostuvat spontaanisti. Lyofobiset kolloidit taas ovat termodynaamisesti epästabiileja. Pieneen kokoon prosessoitu faasi sekoitetaan toiseen ja faasirajalla hylkimisvoimat stabiloivat seoksen homogeeniseksi. Lyofobiset kolloidit voivat destabiloitua ja niitä voidaan destabiloida olosuhteita muuttamalla. (1)

#### 2.1.2 Dispersiot

Kolloidaalinen dispersio on kahden faasin homogeeninen seos, jossa yksi faasi on nimeltään dispergoitu faasi ja toinen on nimeltään jatkuva faasi (Taulukko 1). Dispergoitu faasi voi olla kiinteitä partikkeleita, pieniä pisaroita (=neste) tai kuplia (=kaasu). Partikkelien ollessa kyseessä ne voivat olla muodoltaan pallomaisia, kuutiomaisia, levymäisiä, sauvamaisia, jne. Kolloidaalisten partikkelien halkaisija on



yleensä 1 nm-1 µm. (1) Yleisiä, jokapäiväisiä esimerkkejä kolloidaalisista dispersiosta on annettu Taulukossa 1.

Partikkelien koko ja niiden välillä vaikuttavat vuorovaikutusvoimat ovat avainasemassa ymmärtääksemme, miksi niin monet kolloidaaliset järjestelmät ovat mielenkiintoisia käyttäytymiseltään ja koostumukseltaan. Partikkelien väliset voimat voivat olla joko veto- tai hylkimisvoimia. Van der Waals-voimat ovat attraktiivisia ja ne johtuvat dipolimomenteista tai elektronitiheyden muutoksista. Elektrostaattiset voimat ovat attraktiivisia/repulsiivisia silloin, kun partikkeleilla on sähköinen varaus. Steeriset voimat vaikuttavat silloin, kun partikkeliä ympäröi esimerkiksi pinta-aktiivinen aine tai makromolekyylit. Solvataatiovoimia taas syntyy, kun liutainaine orientoituu tietyllä tavalla partikkelin pinnalla. (1)

Taulukko 1. Kolloidaalisia dispersioita (2)

faasi	Kaasu (kuplat)	Neste (pisarat)	Kiinteä (partikkelit)
Kaasu	Molekyylinen seos	Nesteaerosoli (sumu)	Kiinteä aerosoli (savu)
Neste	Vaahto (shampoo)	Emulsio (Majoneesi)	Suspensio (sooli, muste)
Kiinteä	Kiinteä vaahto (pakkausmateriaali)	Kiinteä emulsio (voi, geeli)	Kiinteä suspensio (komposiitti) (värjätty lasi)

### 2.1.3 Kolloidien stabiilisuus

Dispersiossa partikkelit voivat sitoutua toisiinsa ja muodostaa kooltaan kasvavia aggregaatteja nimeltään flokki. Aggregaatin muodostumista kutsutaan myös flokkulaatioksi. Tämä prosessi on reversiibeli (deflokkulaatio). Jos aggregaatti muuttuu paljon tiiviimpään muotoon, sen sanotaan koaguloituvan. Tämä prosessi on palautumaton (irreversiibeli). DVLO-teorian (nimistä Derjaguin, Landau, Verwey ja Overbeek) mukaan kolloidaalisen systeemin stabiilisuus määräytyy sähköisen kaksoiskerroksen hylkimisvoimien, elektrostaattisten voimien, van der Waalsin

vetovoiman ja liuottimesta aiheutuvan potentiaalienergian summasta, jonka partikkelit kokevat lähestyessä toisiaan (3). Energiakynnys muodostuu, kun hylkimisvoima estää kahta partikkelia saavuttamasta toisiaan ja sitoutumasta yhteen. Jos partikkelit törmäävät riittävällä energialla päästäkseen yli esteestä, lähentävä voima vetää ne lähekkäin, jolloin ne sitoutuvat voimakkaasti ja palautumattomasti yhteen. (4)

Kolloidaaliselle stabiilisuudelle on tärkeää, että hylkimisvoima partikkelien välillä on riittävän suuri. Kaksi olennaista mekanismia, jotka vaikuttavat kolloidaaliseen stabiilisuuteen, ovat steerinen hylkiminen ja elektrostaattinen hylkiminen. Steerinen stabiilisuus koskee muun muassa partikkeleita, joiden pintaan on kiinnitetty polymeerejä, jotka aiheuttavat hylkimistä. Elektrostaattinen stabilisaatio puolestaan perustuu sähköisiin varauksiin/varautuneisiin ryhmiin. Systemin stabilisaatiota tai flokkulaatiota voidaan muuttaa muuttamalla ionien konsentraatiota systeemissä. Se on palautuva (reversiibeli) prosessi. (4)

#### 2.1.4 Ylöskonvertoivat nanopartikkelit

Ylöskonversio (eng. upconversion) viittaa epälineaariseen optiseen prosessiin, jossa kahden tai useamman fotonin peräkkäinen absorptio johtaa valon lyhyemmän aallonpituuden emissioon verrattuna viritysaallonpituuteen (anti-Stokes -tyyppinen emissio). Yksi esimerkki tästä on infrapunavalon muuntuminen näkyväksi valoksi (5). Normaalitilassa emittoituva valo on pienempienergistä kuin viritysväli, eli energiaa häviää prosessissa. Ylöskonversiossa poikkeuksellisesti tilanne on päinvastainen, sillä siinä yhdistetään useamman fotonin energia (5, 6). Materiaalit, joissa ylöskonversio voi tapahtua, sisältävät d- ja f-lohkon alkuaineioneja (7). Esimerkkejä näistä ioneista ovat  $Ti^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mo^{3+}$ ,  $Re^{4+}$  ja  $Os^{4+}$  (8). Vastakohtana muille emissioprosesseille, jotka perustuvat monifotoniabsorptioon, ylöskonversio voi olla tehokkaasti virittynyt matalammallakin viritystiheydellä. Tehokkain ylöskonversiomekanismi löytyy puolijohdemateriaaleista, jotka on seostettu lantanidioksidi-ioneilla (9).

Ylöskonvertoivat nanopartikkelit (UCP) ovat epäorgaanisia partikkeleita, jotka virittyvät infrapuna-alueella ja emittoivat näkyvän valon aallonpituuksilla. Tämä ominaisuus on hyvin ainutlaatuinen, eikä sitä esiinny luonnossa. Tämä tekee näiden partikkelien käytöstä houkuttelevan biologisessa kuvantamisessa, sillä infrapuna-alueen lähellä oleva valo voi läpäistä kudoksen paremmin minimaalisella

absorbtiolla/sironnalla. UCP-nanopartikkelit koostuvat epäorgaanisesta pohja-aineesta (kuten  $\text{NaYF}_4$ ), johon on seostettu lantanidi-ioneja (esimerkiksi  $\text{Yb}^{3+}$  ja  $\text{Er}^{3+}$  tai  $\text{Yb}^{3+}$  ja  $\text{Tm}^{3+}$ ). Näitä partikkeleita voidaan syntetisoida kemiallisesti ja ne voidaan modifioida piidioksidipinnoitteella, jotta niiden dispergointi veteen sekä biomolekyylien konjugaatio pintaan onnistuu.

UCP-nanopartikkelien luminesenssiominaisuudet riippuvat muun muassa partikkelin rakenteesta (heksagonaalisen rakenteen on todettu tuottavan  $\text{NaYF}_4$ -pohjaisilla materiaaleilla parhaan luminesenssitehokkuuden) ja partikkelin koosta (partikkelikoon pienenytessä luminesenssitehokkuus heikkenee, kun pinta-ala kasvaa suhteessa tilavuuteen) (10). Luminesenssin tehostamiseksi on yleisesti pyrittävä energiahäviöiden minimointiin nanopartikkelin pinnalla. Lantanidi-ioneilla seostetuilla nanopartikkeleilla kuoren materiaalin ei pitäisi sallia mitään energian siirtoa partikkelin ytimeltä sen ulkopinnalle. (11)

Suuri määrä erilaisia kolloidaalisia nanomateriaaleja on pinnoitettu amorfisella piioksidilla (12). Tällaiset pinnoitteet on yleensä muodostettu Stöber – tyyppisillä reaktioilla, jotka perustuvat tetra-alkoksisilaanien kontrolloituun hydrolyysiin ja kondensatioon. Piioksidi pinnoitemateriaalina on suositeltava monella tapaa. Piioksidi  $\text{SiO}_2$  voi olla tietyissä muodoissa kemiallisesti epäaktiivinen (inerti) ja optisesti läpinäkyvä. Piioksidin pinnalle on mahdollista kiinnittää funktionaalisia molekyyliä usealla eri menetelmällä (13). Nanopartikkelin biofunktionalisointi on mahdollista ankkuroimalla sopivia molekyyliä piioksidikerroksen pintaan (14-16).

Nanopartikkelien synteesejä on viime aikoina kehitetty paljon, jotta saataisiin syntetisoitua hyvin tehokkaasti luminoivia, pienikokoisia UCP-partikkeleita kapealla kokojakaumalla, jotka muodostaisivat läpinäkyviä seoksia useiden eri liuottimien kanssa. Synteesimenetelmien kehityksessä pyritään korkeaan laatuun ja rutiininomaiseen synteesimenetelmään sekä kontrolloituun liukoisuuteen, partikkelikokoon, kiteiseen faasiin, optisiin ominaisuuksiin ja muotoon. Viime vuosina UCP-partikkeleista on keskusteltu lupaavina vaihtoehtoina orgaanisille fluorofosforeille ja kvanttipisteille lääketieteellisen kuvantamisen alalla (17).

### 2.1.5 Ylöskonvertoivien fluoresoivien nanopartikkelien käyttö biolääketieteen sovelluksissa

Fluoresoivia leimoja on käytetty laajalti biologisissa sovelluksissa, ensisijaisesti kuvantamisessa ja analyyseissä. Perinteiset loisteaineet, kuten fluoresoivat leimat ovat pääasiassa perustuneet alaskonversiofluoresenssiin (alaskonversiofluoresenssi on prosessi, jossa korkeampienergisellä valolla viritetty partikkeli emittoi matalaenergisempää valoa). Sillä on useita haittapuolia, kuten ”photobleaching” eli häipymisilmiö (häipymisilmiö tarkoittaa sitä, kun fluorofori pysyvästi menettää kyvyn fluoresoida fotonien aiheuttaman kemiallisen vaurion ja kovalenttisen muuntautumisen vuoksi (18)) sekä autofluoresenssista [autofluoresenssi (primääri fluoresenssi) tarkoittaa useimmissa kasvisolukoissa ja eläinkudoksissa ilmenevää luontaista fluoresenssia UV-valolla säteilytettäessä (19)] johtuva korkea tausta ja haittaavat valovauriot biologisille materiaaleille. (20) UCP-nanopartikkeleita käyttämällä vältetään edellä mainitut haitat. UCP-nanopartikkelien ominaisuudet tekevätkin niistä ideaalisia fluoresoivia leimoja biologisiin sovelluksiin (21). Etuja määrittäessä tehtäessä ovat myös suuri Stokesin siirtymä, kapeat emissiopiikit, emissioon pitkä elinikä ja se, että partikkelit mahdollistavat yksinkertaisen ja edullisen laitteiston käytön. Esimerkkejä näistä sovelluksista ovat (10, 22-24):

- Immunomääritykset,
- Nukleiinihappojen hybridisaatiomääritykset
- Syöpäseulonta ja kuvantaminen
- Geenien kuljetus solun sisään ja lääkeaineiden kuljetus elimistöön
- Biokemiallisten prosessien kuvantaminen molekyylitasolla
- Diagnostinen kuvantaminen
- Proteiinien erotus
- Käyttö biosensoreina (esim. happisensorit, pH-sensorit ja vastaavat)

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 3.1 Materiaalit

##### 3.1.1 Liuokset

Kalvosuodatuksissa ja geelisuodatuksissa käytetty pääasiallinen puskuri oli ajoliuos A (10 mM boraattipuskuri pH 8.5, 0,05 % Polyakryylihapo MW 8000, 0,1 % Tween 20). Sellaisille streptavidiini (SA) -pinnoitetuille UCP-partikkeleille, joita jouduttiin säilyttämään yön yli jääkaapissa ennen karakterisointien tekoa, käytettiin säilytyspuskuria (100 mM boraattipuskuri pH 8.5, 1 % Tween 20, 10 % BSA:ta, 1 %  $\text{NaN}_3$ ). Partikkelikoon mittauksessa (Coulter N4 plus submicron particle size analyzer, valmistaja Beckman Coulter, Inc), käytettiin mittauspuskuria (MP, 10 mM boraattipuskuri pH 8.5, 0,1 % Tween 20). IB-puskuria (Innotrac Buffer, Innotrac Diagnostics Oy), käytettiin puskurina fluoresenssi-intensiteetin määrittämisessä. AFFFF-ajossa käytettiin puskurina Natriumatsidi-puskuria (3 mM  $\text{NaN}_3$ , 0,17 mM SDS) sekä Boraattipuskuria (10 mM boraattipuskuri pH 8.5, 0,1 % Tween 20).

##### 3.1.2 UCP-Partikkelit ja näytteiden valmistus

UCP-fosforit (ylöskonvertoivat fosforit, eng.: upconverting phosphors) ovat partikkelimaisia leimoja, jotka koostuvat epäorgaanisesta pohja-aineesta, kuten oksisulfidista tai fluoridista (laitoksella yleisimmin käytetty materiaali  $\text{NaYF}_4$ ) sekä pohja-aineeseen seostetuista niin kutsutuista herkistin- ja aktivaattori-ioneista. Ytterbium-ioni ( $\text{Yb}^{3+}$ ) toimii yleisesti energian vastaanottajana eli herkistimenä ja toinen trivalenttinen lantanidi-ioni (kuten  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  tai  $\text{Ho}^{3+}$ ) emittoi säteilyä.

Työn aikana käytettiin useita erilaisia UCP-partikkeleita. Osa partikkeleista oli kaupallista materiaalia, joka oli laitoksella itse jauhettu pienemmäksi planeettakuulamylyllä (Valmistaja Fritch GmbH-Milling and Sizing). Osa partikkeleista oli puolestaan syntetisoitu Turun yliopiston materiaalikemian ja kemiallisen analyysin laboratoriossa. Käytetyistä partikkeleista osa oli pintakäsittelymättömiä ja osan pinnassa oli ohut piioksidipohjainen kerros, jonka välityksellä partikkelien pintaan oli sidottu streptavidiinimolekyylejä (LIITE 1). Partikkeleita käytettiin kalvosuodatuksessa, geelisuodatuksessa ja asymmetrisessä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioinnissa (AFFFF).

Kalvosuodatuksissa käytettiin planeettakuulamylyllä jauhettua pintakäsittelmätöntä sekä piioksidipinnoitettua/SA-pinnoitettua UCP-partikkelia (Johanna Vuojola, Turun yliopisto). Pintakäsittelmättömästä partikkelista tehtiin 0,2 mg/ml laimennos ja SA-pinnoitetusta partikkelista 0,13 mg/ml laimennos ajoliuos A:han (näytetilavuus 15 ml). Lisäksi kalvosuodatuksessa käytettiin materiaalikemian ja kemiallisen analyysin laboratoriossa syntetisoitua partikkelia (Laura Pihlgren, Turun yliopisto), josta tehtiin 0,1 mg/ml laimennus ajoliuos A:han (näytetilavuus 10 ml). Partikkelit olivat piioksidipinnoitettuja ja niiden pintaan oli konjugoitu streptavidiniä (SA).

Geelisuodatuksessa käytettiin planeettakuulamylyllä jauhettua pintakäsittelmätöntä UCP-partikkelia, josta tehtiin 10 mg/ml laimennos puskuriin ajoliuos A (näytetilavuus 400 µl). Lisäksi geelisuodatuksessa käytettiin materiaalikemian ja kemiallisen analyysin laboratoriossa syntetisoitua piioksidi-/SA-pinnoitettua partikkelia, josta tehtiin 5 mg/ml laimennus puskuriin ajoliuos A (näytetilavuus 400 µl). Geelisuodatuksessa käytettävät UCP-partikkelit olivat partikkelipitoisuudeltaan korkeampia kuin kalvosuodatuksessa käytetyt partikkelit, koska näytetilavuus oli geelisuodatuksessa paljon pienempi kuin kalvosuodatuksessa.

AFFFF-ajoissa näytteenä käytettiin planeettakuulamylyllä jauhettua SA-pinnoitettua UCP-partikkelia sekä planeettakuulamylyllä jauhettua karboksyloitua UCP-partikkelia (LIITE 1), joista tehtiin 0,3 mg/ml laimennos puskuriin Ajoliuos A (näytetilavuus 50 µl).

### 3.1.3 Matriisit

Geelisuodatuksissa matriisina käytettiin XK 16 sepharose 6b-matriisia (Pharmacia Biotech). Sepharose 6b matriisi koostuu huokoisesta 6 % agarosista ja sen partikkelikoko on 45-165 µm. Fraktiointiväli pyöreän muotoisille proteiineille:  $1 \times 10^4$  -  $4 \times 10^6$ .

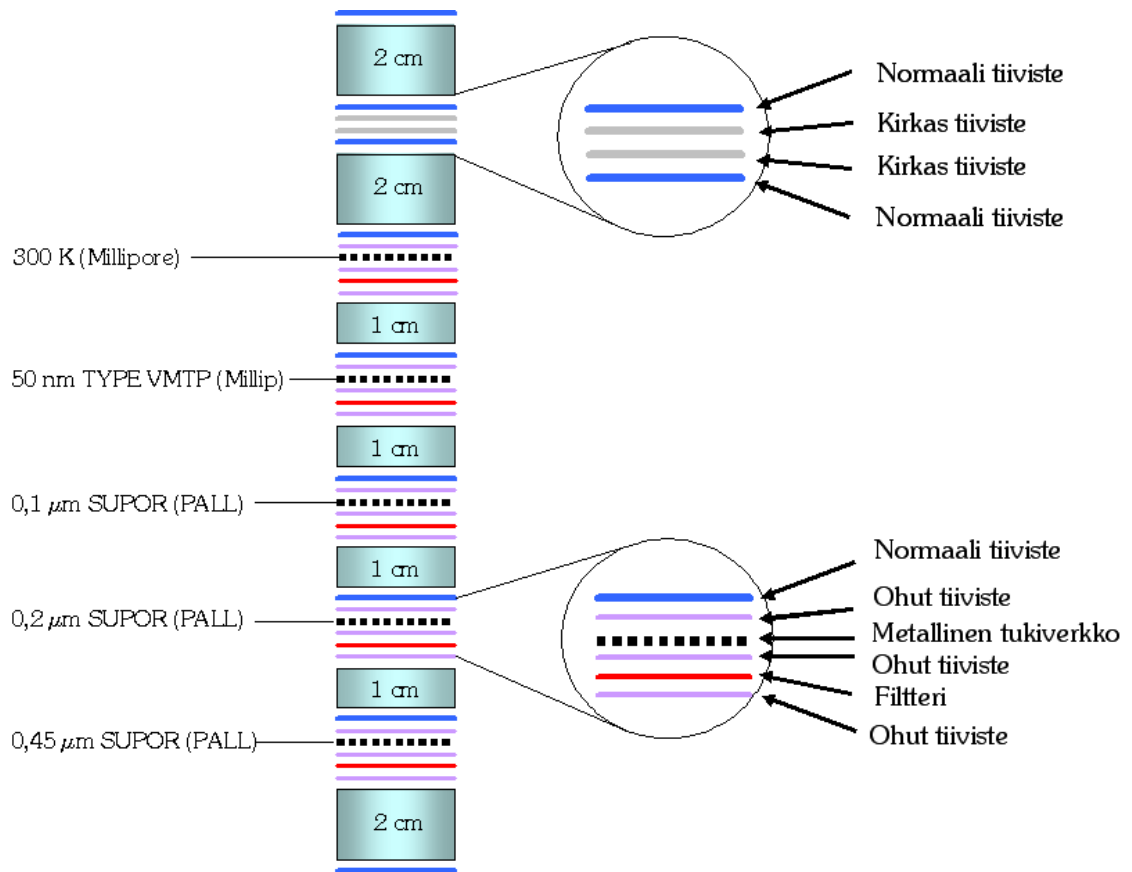
## 3.2 Erottelumenetelmät

### 3.2.1 Kalvosuodatus

Nesteeseen suspensoituja partikkeleita ajettiin nestevirtauksen avulla onton muovipylvään sisälle. Pylvääseen oli etukäteen asetettu tietyin välimatkoin levymäisiä kalvosuodattimia, joiden läpi liuos kulki. Suodattimet oli asetettu pienenevään huokoskokojärjestykseen 0,45 µm [SUPOR (PALL)], 0,2 µm [SUPOR (PALL)], 0,1 µm [SUPOR (PALL)], 50 nm [TYPE VMTP (Millipore)] ja 300/500 kDa (Millipore) ja tarkoituksena oli fraktioida halutun kokoluokan partikkelit suodattimien väliin jäävään nestetilaan. Nesteen virtausta kalvosuodattimien ohi pyrittiin estämään asettamalla rengasmaisia tiivisteitä suodattimien molemmin puolin (Kuva 1). Ajoliuksena käytettiin ajoliuos A:ta. Muovipylvääseen oli liitetty epäkeskomoottorista rakennettu tärustin, jonka tarkoituksena oli estää suodattimien tukkiutuminen vähentämällä partikkelien kasautumista. Nestevirtaus oli ajossa alhaalta ylöspäin ja virtausnopeus oli 0,8 ml/min (Pumppu: Series 200 Ic pump, Perkin Elmer).

Piirturi (LKB Bromma, 2210 Recorder 2-channel) seurasi yhtäaikaaisesti sekä luminesenssia 550 nm:ssä (Anti-stokes fotoluminesenssidetektor, LKB Wallac Luminometer 1250) että absorbanssia 280 nm:ssä (UV-detektor, Spectra Series UV100, Spectra-Physics).

Pylvään tasapainotus tapahtui ajamalla ajoliuosta pylvään läpi, kunnes detektorien lukemat tasoittuivat. Tämän jälkeen kytkettiin tärustin päälle ja injektorin laitettiin load-asentoon. UCP-liuosta injektoidiin kolmesti 5 ml:n erä 30 minuutin välein. Partikkelien kulkeutumista tolpassa seurattiin visuaalisesti. Nestevirtaus pysäytettiin 50 minuutin päästä kolmannesta injektioista, mutta tärustin jätettiin vielä päälle noin 10 minuutiksi. Lopuksi tolppa purettiin varovasti ja fraktiot kerättiin nimettyihin säilytysputkiin.



Kuva 1. Kaaviokuva suodatusjärjestelmän kokoonpanosta. Kalvosuodattimien tyypit ja huokoskoot on esitetty vasemmalla.

### 3.2.2 Geelisuodatus

Geelisuodatuksessa käytettiin onttoa muovipylvästä, joka oli pakattu täyteen huokoista materiaalia olevaa sepharose 6b-matriisia (XK 16 Pharmacia Biotech, tilavuus noin 60 ml), jonka läpi UCP-suspensio ajettiin nestevirtauksen avulla (Pumppu: Series 200 Ic pump, Perkin Elmer). Partikkelien oletettiin tulevan pylvästä ulos eri aikoina partikkelien koosta riippuen.

Piirturi (LKB Bromma, 2210 Recorder 2-channel) seurasi yhtäaikaaisesti sekä luminesenssia 550 nm:ssä (Anti-stokes fotoluminesenssidetektor, LKB Wallac Luminometer 1250) että absorbanssia 280 nm:ssä (UV-detektor, Spectra Series UV100, Spectra-Physics).

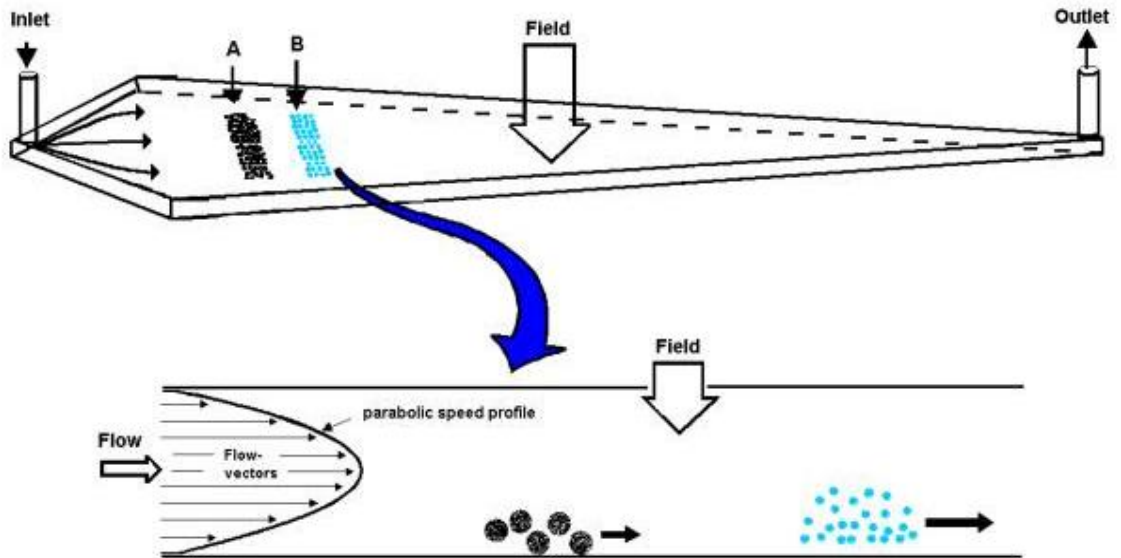
Letkuista poistettiin aluksi ilmakuplat virtausnopeudella 2 ml/min ja sen jälkeen huuhdeltiin letkuja 12 minuuttia, virtausnopeudella 1 ml/min ajopuskuri A:lla (10 ml:n



silmukka). Painerajan maksimiarvoksi asetettiin 20 baaria. Letkut kiinnitettiin tolppaan siten että virtaus oli ylhäältä alas. Tolppaa tasapainotettiin 140 minuutin ajan, virtausnopeus 0,5 ml/min ajopuskuri A:lla, kunnes pylvään ja silmukan tilavuus (noin 70 ml) oli vaihtunut ja piirturin käyrät tasaantuneet. Nestevirtauksen nopeus ajon aikana oli 0,5 ml/min ja piirturin paperin nopeus 0,5 mm/min. Näytettä injektoidiin 400 µl. Piirturin käyrien alkaessa nousta, aloitettiin fraktioiden kerääminen 96-kuoppalevyille (noin 310 µl/kaivo). Kuoppalevyn kaivoihin lisättiin lopuksi 16 µl säilytyspuskuria ja kuoppalevyä säilytettiin jääkaapissa yön yli.

### 3.2.3 Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (AFFFF)

Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (engl. Asymmetrical Field Flow Fractionation, AFFFF) perustuu partikkelien diffuusiokertoimien eroihin. AFFFF-laitteessa (ConSensus GmbH) on kanava, jonka toinen seinämä on kiinteä ja läpinäkyvä. Ultrasuodatuskalvosta (huokoskoko 10 kDa) päällystetystä huokoisesta levystä valmistettu kanavan akkumulaatioseinä päästää lävitseen poikittaisen virtauksen eluutin, mutta ei tutkittavia partikkeleita. Nesteen viskositeetista johtuvan kitkan vaikutuksesta virtaus hidastuu kanavan reunoja kohden, kun taas kanavan keskellä virtaus on nopeinta. Näin ollen seinämien väliin muodostuu paraabelin muotoinen laminaarinen nestevirtaus. Kanavaan tuleva virtaus jakaantuu paineen vaikutuksesta poikittaisvirtaukseen, joka poistuu akkumulaatioseinämän läpi ja pitkittäisvirtaukseen, joka kuljettaa näytekomponentteja detektorille (Detektorit: UV-detektori, ei kuulu alkuperäiseen ConSensus-laitteistoon ja Valonsirontadetektori, Multi angle Lightscatterer DARK III, laserin aallonpituus 532 nm, teho 50 mW, mittaa samanaikaisesti sirontaa 1-24 kulmasta, detektio valomonistinputkella sekä Fotoluminesenssidetektori, ei kuulu alkuperäiseen ConSensus-laitteistoon). Näyttemolekyylit painuvat poikittaisvirtauksen vaikutuksesta kohti akkumulaatioseinämää. Vastakkainen voima aiheutuu diffuusiosta. Pienet partikkelit ulottuvat keskemälle kanavaa, nopeammin kulkevaan virtaukseen suuren diffuusiokertoimen ansiosta. Partikkelit, jotka eroavat toisistaan joko muodoltaan tai kooltaan, pystytään näin ollen erottamaan toisistaan diffuusiokertoimien erojen perusteella. Poikittaisvirtauksen ja lateraalivirtauksen suhde vaikuttaa retentioaikaan. (Kuva 2).



Kuva 2. AFFFF-laitteen toimintaperiaate (25).

Laitteen ajossa käytetty perusohjelma on esitetty Taulukossa 2. AFFFF-ajojen tiedot on esitetty Liitteessä 2.

Taulukko 2. AFFFF-laitteen ajossa käytetty perusohjelma.

	Aika (s)	Pumppu (ml/min)	Poikittaisvirtaus (ml/min)
Huuhtelu	1	1,0	0,00
Kohdennus	10	3,5	2,50
Kohdennus injektori päällä	40	3,5	2,50
Kohdennus injektori pois päältä	80	3,5	2,50
Eluutio	130	2,5	0,15
Huuhtelu II + inj	3600	1,0	0,00
Huuhtelu II	3720	0,5	0,00

### 3.3 Mittausmenetelmät

#### 3.3.1 Fluoresenssi-intensiteetin määrittäminen kalvosuodatetuille fraktioille

Kalvosuodatetuista fraktioista tehtiin ensimmäiset 1:50 laimennokset ajopuskuri A:han (näytteen kokonaistilavuus 400 µl). Sen jälkeen tehtiin toiset vastaavanlaiset laimennokset 30 min seisotetuista fraktioista ajopuskuri A:han ottamalla näyte nesteen pinnasta. Laimennoksia käsiteltiin ultraäänihautessa noin 3 minuuttia, jonka jälkeen

näytteitä siirrettiin 100 µl / kaivo kolmena rinnakkaisena mustalle puolipinta-ala eli ”half-area” -levylle (Corning Incorporated). Levyä ravisteltiin lyhyesti levyravistelijassa, jonka jälkeen näytteiden fluoresenssi mitattiin modifioidulla Chameleon-levylukijalla (26) (Hidex Oy, viritysväliolosuhteeksi vaihdettu 980 nm laser) 550 nanometrissä. Mikäli signaalit menivät yli detektorina käytetyn valomonistinputken saturaatorajan, lisättiin vaimennusta harmaasuotimien avulla.

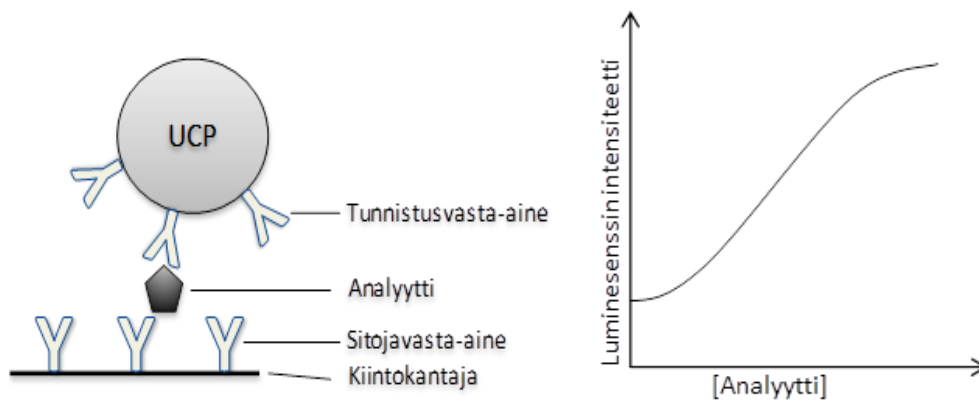
### 3.3.2 Fluoresenssi-intensiteetin määrittäminen geelisuodatetuille fraktioille

Geelisuodatettujen fraktioiden fluoresenssi-intensiteetit määritettiin, jotta osattiin yhdistää halutut fraktiot. Seisyyttä levyä ravisteltiin lyhyesti levyravistelijassa, jonka jälkeen jokaisesta näytelevyn kaivosta siirrettiin 20 µl standardikokoisen mustan 96-kuoppalevyn (Nunc) kaivoihin. Näytteiden päälle lisättiin 180 µl IB-puskuria ja kuoppalevyä ravisteltiin hetki levyravistelijassa. Näytteiden fluoresenssi mitattiin modifioidulla Chameleon-levylukijalla 550 nanometrissä. Osa fraktioista yhdistettiin siirtämällä neste kaivoista säilytysastiaan.

### 3.3.3 Pitoisuuden määrittäminen

UCP-partikkelien pitoisuuden määrittäminen tehtiin vertaamalla tuntemattoman pitoisuuden omaavan näytteen fluoresenssia tunnetun pitoisuuden omaavan standardiliuoksen fluoresenssiin. Määrittämistä varten näytteestä tehtiin neljänä rinnakkaisena 1:225-laimennos (kokonaistilavuus 450 µl) mittauspuskuriin. Väli-laimennoksia käsiteltiin ultraäänihäuteessä noin minuutti, jonka jälkeen UCP-laimennosta lisättiin 150 µl per kaivo (Kirkas MaxiSorp-levy, Nunc). Levyä ravisteltiin lyhyesti ja fluoresenssisignaali mitattiin modifioidulla Chameleon-levylukijalla 550 nanometrissä.

### 3.3.4 Heterogeeninen bio-BSA-määritys



Kuva 3. Heterogeenisen bio-BSA-määrityksen periaatekuva.

Heterogeenisessä bio-BSA-määrityksessä UCP-konjugaatti on sidottu kiintokantajaan analyytin välityksellä ja voileipäkompleksi on muodostunut (Kuva 3). Sitoutuneiden UCP-partikkelien määrä kasvaa analyyttikonsentraation mukana. (27)

Kirkas ”normal capacity SA”-levy (Innotrac Diagnostics Oy) esipestiin kertaalleen levypesurilla. Biotinyloidusta BSA:sta tehtiin 0, 0,08, 0,4, 2, 10, 50, 250 ja 625 ng/50 $\mu$ l laimennokset IB-puskuriin ja laimennoksia lisättiin 50  $\mu$ l/kaivo kolmena rinnakkaisena SA-levyn kaivoihin. Näytettä inkuboitii 20 min hitaassa ravistelussa huoneenlämmössä. Tämän jälkeen levy pestiin kertaalleen sitoutumattoman bio-BSA:n poistamiseksi. Kaivoihin lisättiin seuraavaksi 75  $\mu$ l SA-pintaista UCP-partikkelia. (UCP-pitoisuus kaivossa 0,015 mg/ml) ja näytettä inkuboitii 30 min hitaassa ravistelussa huoneenlämmössä. Inkuboinnin aikana tehtiin liuosmittaus Chameleon-levylukijalla 550 ja 660 nanometrissä, jotta voitiin mitata sekä sitoutuneen että sitoutumattoman bio-BSA:n signaali. Levy pestiin neljästi sitoutumattomien partikkelien poistamiseksi ja levy kuivattiin huoneilmassa. Lopuksi tehtiin pintamittaus Chameleon-levylukijalla 550 ja 660 nanometrissä.

### 3.3.5 Partikkelikoon määrittäminen

Partikkelikoko määritettiin N4 Plus partikkelikokoanalysaattorilla (Coulter® N4 plus submicron particle size analyzer). Menetelmä perustuu dynaamiseen valonsirontaan, jota kutsutaan myös fotonikorrelaatio-spektroskopiaksi. Dynaamisessa valonsironnassa mitataan kolloidaalisten partikkelien liikettä laservalon avulla. Laite mittaa partikkeleista siroavan valon intensiteettiä. Valon intensiteetti vaihtelee liikkeen ja koon

mukaan. Isot partikkelit liikkuvat hitaammin ja intensiteetti vaihtelee hitaammin kuin pienillä partikkeleilla. Nämä intensiteettivaihtelut voidaan korreloida partikkelien kokoon. Mainittu laite käyttää kuutta kiinteää mittauskulmaa. Kuusi optista kuitua on sijoitettuna seuraaviin geometrisiin kulmiin: 14.9°, 20.6°, 30.4°, 40.2°, 50.4°, and 90°, jotka ovat valmisasetuksia, mutta joita käyttäjä voi myös halutessaan säätää. Useimmissa valonsirontalaitteissa käytetään vain 90 asteen kulmaa. Koska partikkelit sirottavat valoa riippuen partikkelin koosta, suurempia partikkeleita voi olla vaikeaa havaita 90 asteen kulmassa, jos näyte sisältää suuren määrän pienempiä partikkeleita. Mitkä tahansa partikkelit, jotka sirottavat heikosti, voivat peittyä vahvasti sirottavista partikkeleista tietyssä kulmassa. Tästä syystä yhtä tai kahta kulmaa käyttävä laite antaa ainoastaan osittaisen kuvan näytteestä. Mainittu laite käyttää voimakasta 10 mW laseria. (28)

Partikkeleista tehtiin 0,006 mg/ml laimennos mittauspuskuriin ja näytteet käsiteltiin hyvin VialTweeter-putkisonikaattorilla (Hielscher Ultrasonics) sekä sekoitettiin vortex-sekoittimella. Näyte kaadettiin muovikyvetiin ja näytteen intensiteetti tarkistettiin mittalaitteella, tasapainotus 5 min, mittaus 2.5 min, kokoalue 20–1000 nm. Sama kyveti mitattiin tuloksen varmistamiseksi kahdesti tai useammin, jos rinnakkaisissa mittauksissa oli suuri ero (käsittely VialTweeterillä mittausten välissä). Tuloksista otettiin ylös partikkelien kokojakauma, keskihalkaisija, keskihajonta, intensiteetti sekä epäpuhtauksien määrää kuvastava prosenttiosuus ("dust %").

### 3.3.6 Lämpäisyelektronimikroskooppikuvaus

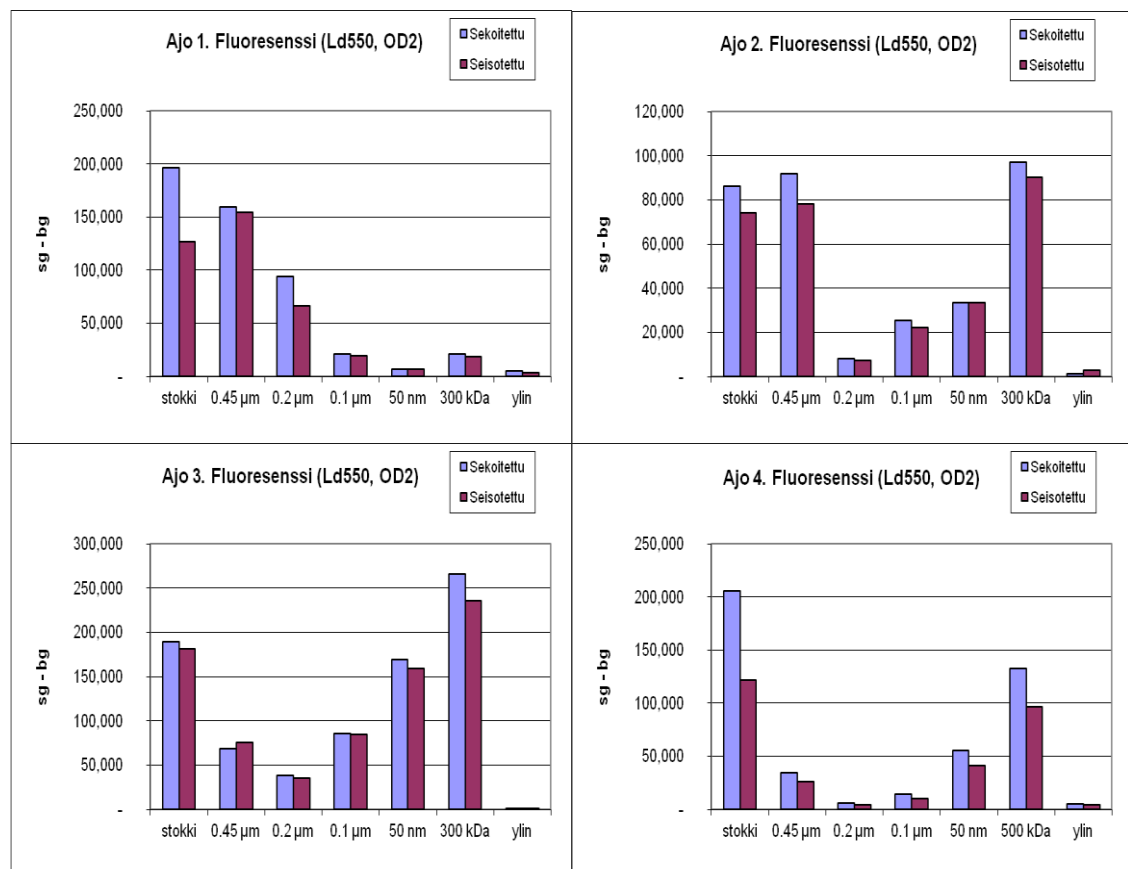
Lämpäisyelektronimikroskooppi (engl. transmission electron microscopy, TEM) –kuvaus tehtiin, jotta varmistuttaisiin siitä minkä kokoisia partikkeleita eri fraktioista löytyy. TEM toimii samalla peruseriaatteella kuin valomikroskooppi, mutta käyttää elektroneja valon sijaan. Se, mitä pystyy näkemään valomikroskoopilla, on rajattua valon aallonpituudesta johtuen, TEM taas käyttää elektronisuihkua valon sijasta ja elektronien matalampi aallonpituus edesauttaa saamaan tuhat kertaa tarkemman resoluution kuin valomikroskoopilla saataisiin. TEM:in avulla voi nähdä jopa parin ångströmin kokoisia kohteita ( $10^{-10}$  m). (29)

UCP-partikkeleista tehtiin 0.3 mg/ml laimennos mittauspuskuriin ja näyte käsiteltiin VialTweeter-putkisonikaattorilla. TEM-hilalle (300 mesh kuparihila hiilimembraanilla,

Tecalemit Flow Oy) lisättiin 5 µl:n näytesisara ja näyte levitettiin tarvittaessa hyvin varovasti koko hilan alueelle. Hilaa kuivattiin 25 minuuttia huoneilmassa. Hilat kuvattiin Turun yliopiston elektronimikroskopian laitoksen läpäisyelektronimikroskoopilla (JEM 1200EX , JEOL Skandinaviska Ab, Sollentuna, Ruotsi).

## 4 TULOKSET

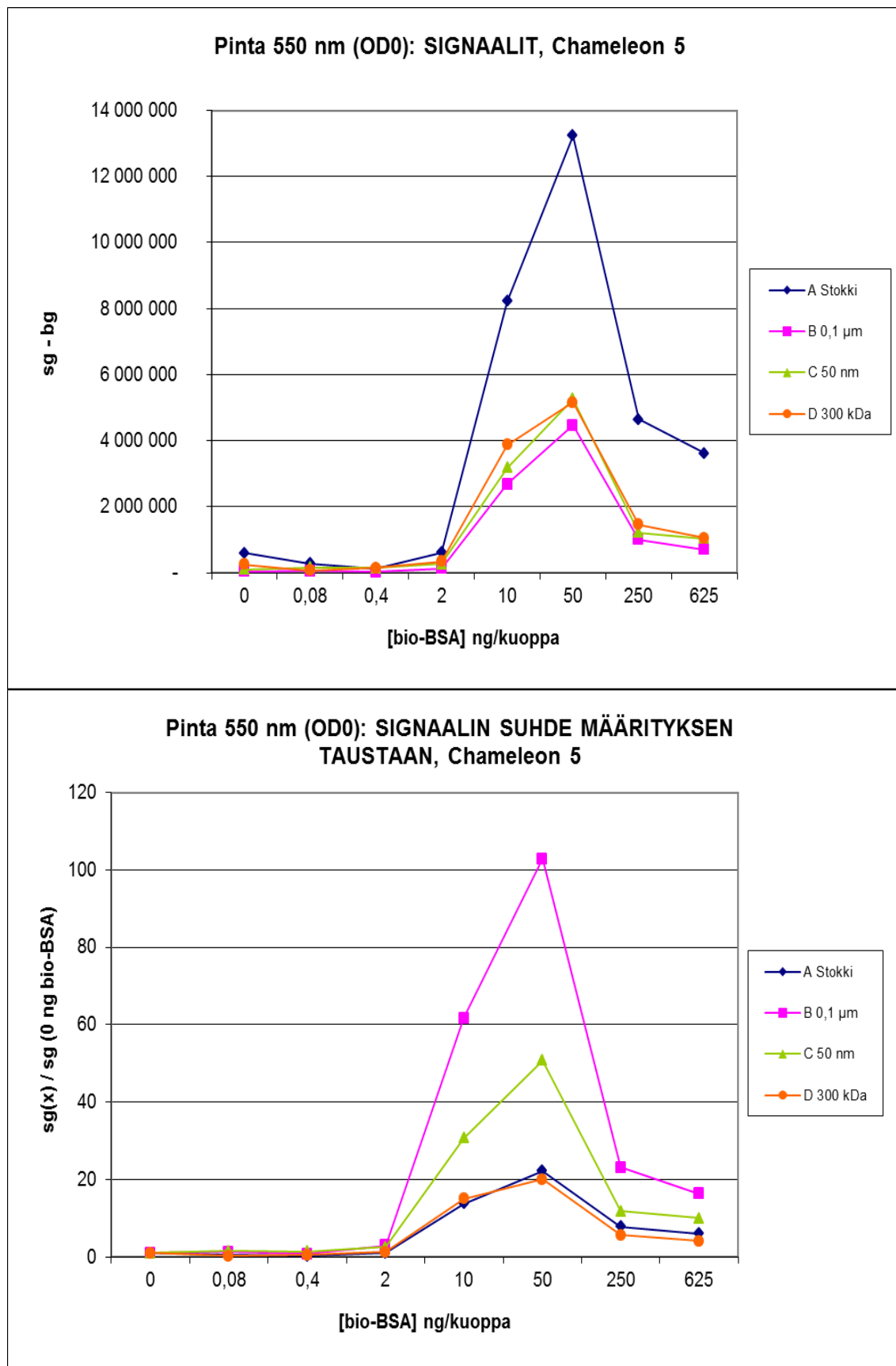
### 4.1.1 Kalvosuodatus



Kuva 4. Ajot 1-4: fluoresenssin mittausta sekoitetuista fraktioista ja 30 minuuttia seisotetuista fraktioista. X-akselilla on kerrottu suodattimen koko, jonka alta fraktio on kerätty.

Fluoresenssin mittauskuvista (Kuva 4) näkyy, että partikkelit ovat ajossa 1 jääneet suurempien huokoskoon suodattimien alle eli 0,45 ja 0,2 µm:n suodattimien alle. Ajossa 2 ensimmäisen 0,45 µm:n suodattimen alle on jäänyt vajaa puolet partikkeleista ja suurin osa on mennyt ylempiin suodattimiin eli 0,1 µm, 50 nm ja 300 kDa suodattimien

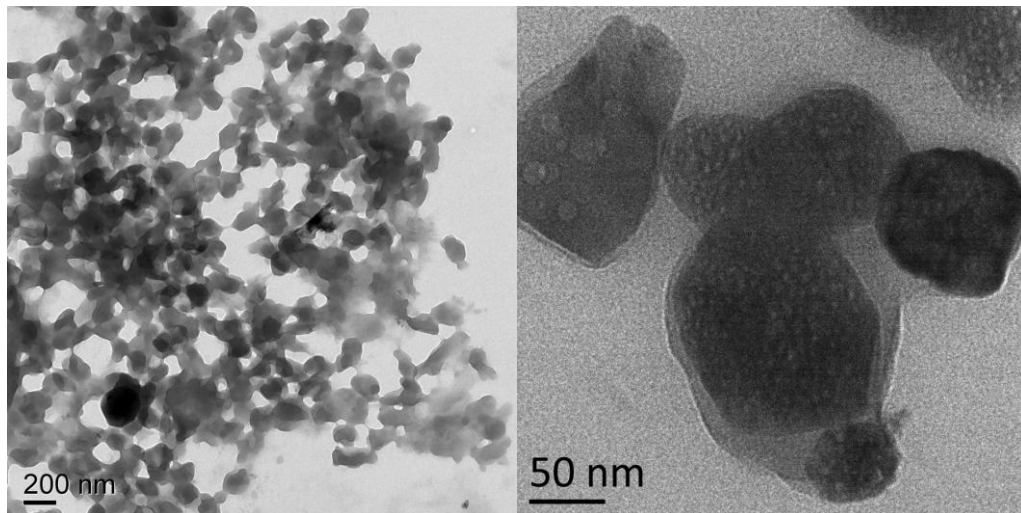
alle. Ajoissa 3 ja 4 huomattava osa partikkeleista on päätyntä ylempiin suodattimiin eli 50 nm ja 300 kDa suodattimien alle.



Kuva 5. Ajo 2: Heterogeenisen bio-BSA-määrityksen signaalit ja signaalin suhde määrityksen taustaan.

Heterogeenisessä bio-BSA -määrityksessä standardiliuoksesta saatiin parhaat signaalit jokaisessa ajossa (Kuva 5). Signaali/taustasuhteessa standardiliuos antaa parempaa signaalia jokaisessa ajossa. Signaali tippuu bio-BSA- konsentraation kasvaessa. Ilmeisesti bio-BSA:ta on ollut niin tiheässä, että partikkelit eivät löytäneet niihin.

Partikkelikokomittauksissa ei keskihalkaisijan suuruudessa näkynyt selkeää pienenemistä tarkasteltaessa fraktioita, jotka olivat kerätty 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,1  $\mu\text{m}$ , 50 nm ja 500 kDa suodattimen alta (LIITE 3). Fraktioiden huokoskoon perusteella olisi partikkelien keskihalkaisijan pitänyt pienentyä jokaisen suodattimen jälkeen ja tämän olisi pitänyt näkyä myös partikkelikoon mittauksessa, mutta keskihalkaisijat eivät pienene odotetusti, mikä näkyy partikkelikokomittauksissa (LIITE 3).

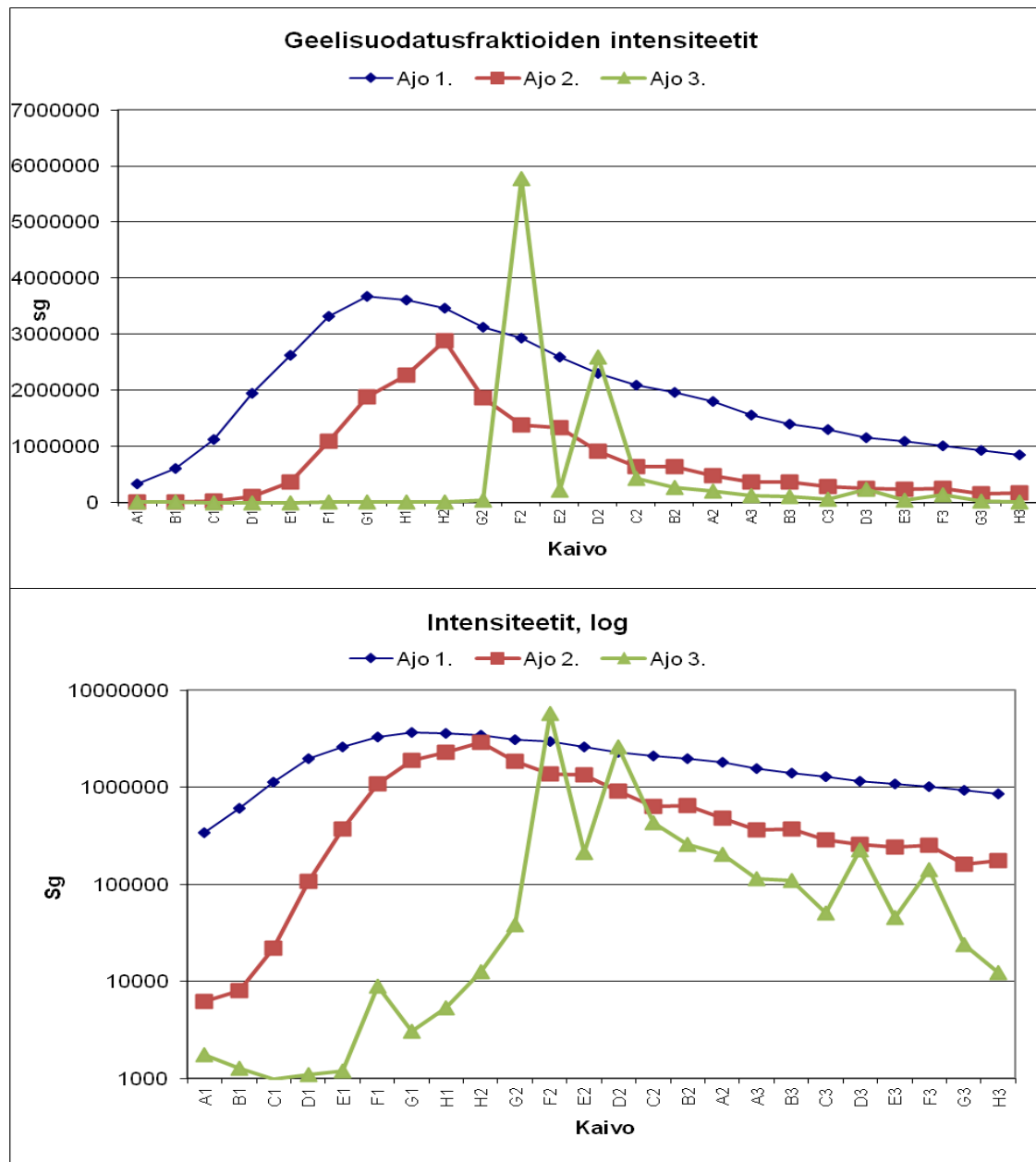


Kuva 6. TEM-kuva, LL262-SA (40 mM EDC & 60 mM NHS), kalvosuodatus, mennyt 50 nm kalvosuodattimen läpi, Näyte ajoliuoksessa A, pesty MQ:lla

TEM-kuvatuissa kalvosuodatetuissa näytteissä näkyi, että suodattimien läpi oli päässyt odotettua suurempikokoisia partikkeleita (Kuva 6, 50 nm:n kuva). Niissä näkyi myös jonkinlaista väliainetta partikkelien välissä, mikä sitoi partikkeleita yhteen TEM-hilalla (Kuva 6, 200 nm:n kuva). Väliaine voi olla myös partikkeleita, jotka ovat useassa kerroksessa.



## 4.1.2 Geelisuodatus

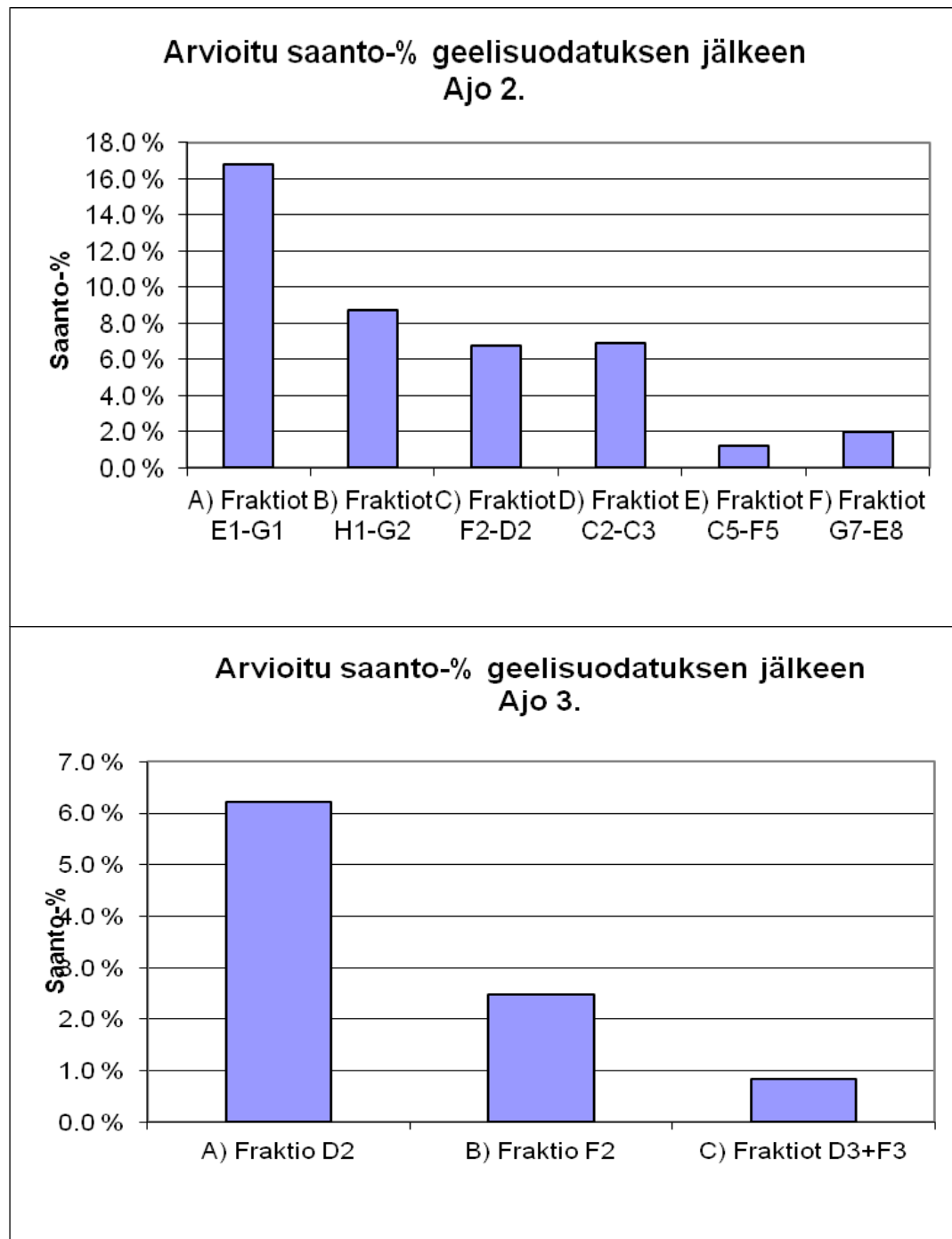


Kuva 7. Geelisuodatusfraktioiden intensiteetit.

Intensiteetin mittausta käytettiin selvittämään, missä kuopissa oli UCP-partikkeleita, ja mitkä fraktiot olivat tulleet samassa piikissä. Esimerkiksi kolmannessa ajossa nähdään yksi piikki kuopassa F2 ja toinen piikki kuopassa D2 (Kuva 7).

Ensimmäisessä ajossa pylväästä tuli ulos yksi loiva piikki. Tästä ajosta ei tehty pitoisuusmittauksia, mutta tehtiin partikkelikokomittaukset. Fraktioista yhdistettiin kaivot: C1-B2 ja A2-D3 (Kuva 7). Toisessa ajossa pylväästä tuli ulos piikki, jossa oli vasemmalla puolella hyvin pieni olkapää ja oikealla puolella hieman selvempi olkapää (Kuva 7). Piikistä ja molemmista olkapäistä tehtiin kolme eri yhdistettyä näytettä E1-

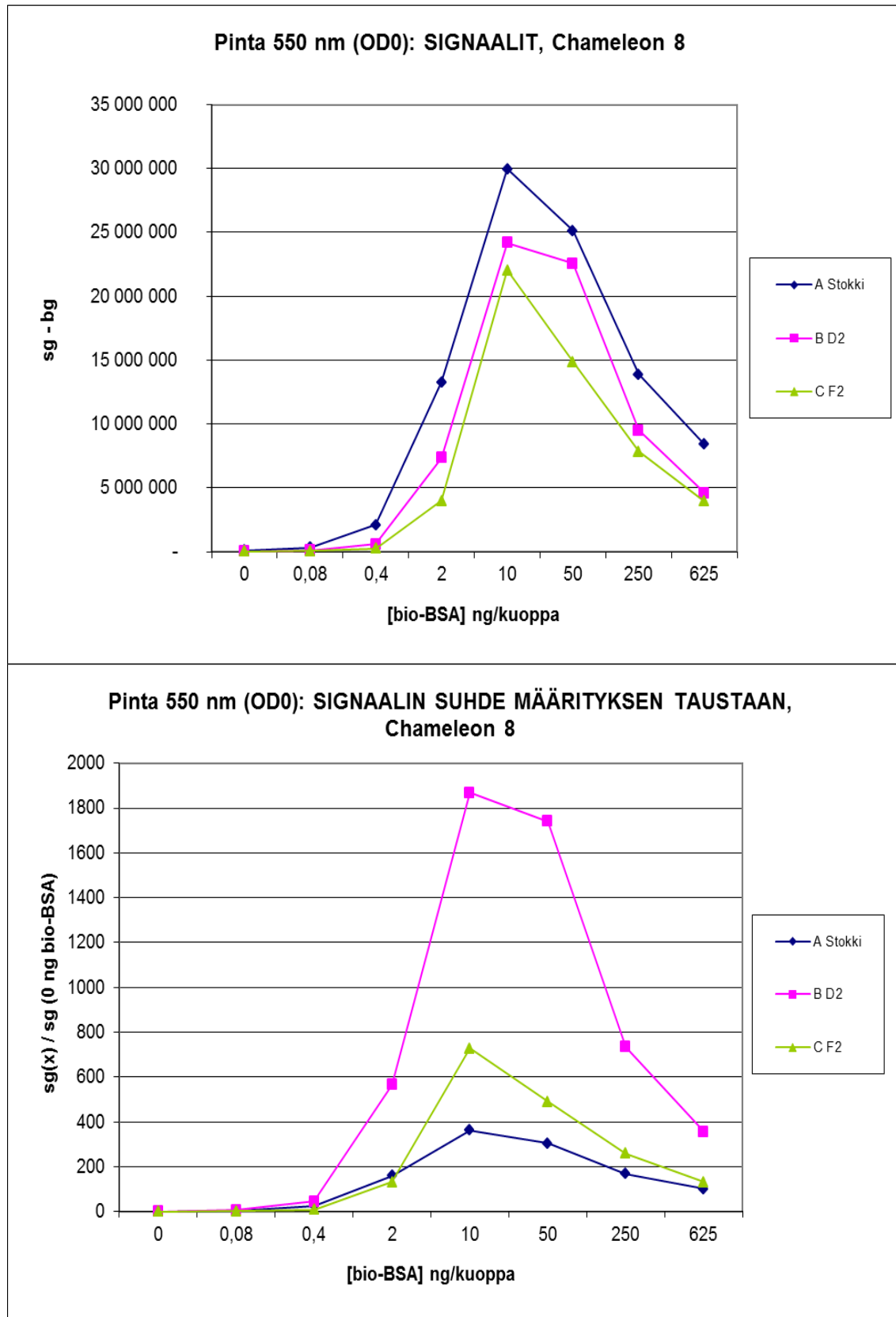
G1, H1-G2, F2-D2 (Kuva 7). Lisäksi tehtiin kolme eri yhdistettyä näytettä loppupään fraktioista C2-C3, C5-F5, G7-E8 (joista kaikki eivät näy kuvassa). Kaikkien yhdistettyjen fraktioiden pitoisuus mitattiin. Kolmannessa ajossa pylväästä tuli ulos suurempi (kuoppa F2) ja pienempi piikki (kuoppa D2) ja myöhemmin kaksi hyvin matalaa piikkiä (kuopat D3 ja F3, jotka yhdistettiin) (Kuva 7).



Kuva 8. Arvioitu saantoprosentti geelisuodatuksen jälkeen.

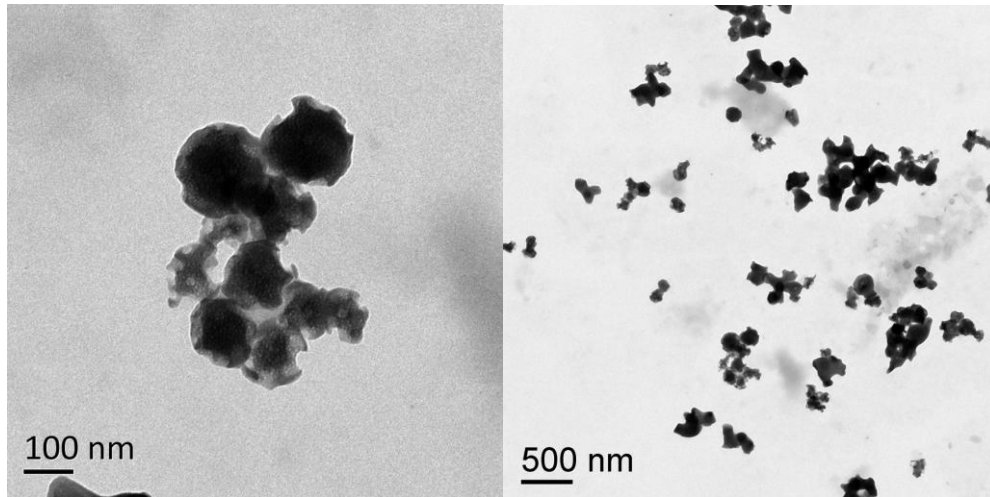
Geelisuodatusajossa 2 saantoprosentti oli korkeampi kuin ajossa 3 (Kuva 8).

Heterogeenisessä bio-BSA –määrityksessä standardiliuos antaa korkeampaa signaalia. Signaali/taustasuhteessa standardiliuos antaa matalampaa signaalia (Kuva 9.)



Kuva 9. Ajo 3: Heterogeeninen bio-BSA määritys. Signaalit ja signaalin suhde taustaan.

Geelisuodatusajossa 2 näkyy partikkelikoon keskihalkaisijan koon pienenemistä mentäessä fraktioissa taulukossa ensin tulleesta fraktiosta E1-G1 kohti viimeisenä tullutta fraktiota G7-E8, eli ensin ovat tulleet ulos hieman suuremmat partikkelit ja sen jälkeen koko ajan pienenevässä kokojärjestyksessä (LIITE 4).



Kuva 10. TEM-kuva, LL262-SA (40 mM EDC & 60 mM NHS), Geelisuodatus, F2-fraktio (pääpiikki), Näyte ajoliuoksessa A, pesty MQ:lla.

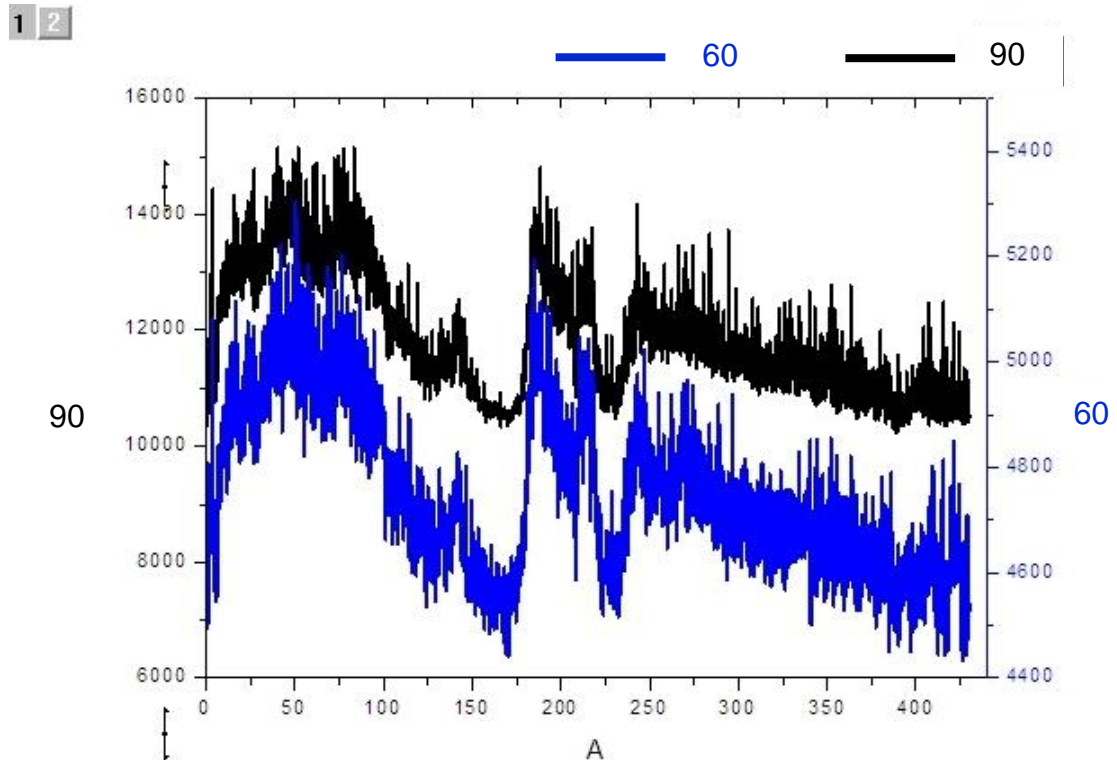
Geelisuodatetuissa SA-pinnoitetuissa partikkeleissa näkyi TEM-kuvauksessa pinnoituksen rikkoutumista (Kuva 10).

#### 4.1.3 Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi (AFFFF)

AFFFF-ajon tarkoituksena oli erotella eri kokoluokan partikkelit niiden diffuusiokertoimien erojen perusteella. Tällöin erikokoiset/erimuotoiset partikkelit tulisivat ulos laitteesta eri aikaan.

AFFFF-ajo tehtiin neljästi. Ensimmäinen ajo onnistui, sironnassa (detektorit: UV-detektorit, valonsirontadetektorit, fotoluminesenssidetektorit) näkyi selvät piikit 50, 200 ja 250 sekunnin kohdissa erikokoisten partikkelien tullessa detektoriin eri aikoina (Kuva 3). Voi olla, että ajolaitteeseen oli jäänyt vanhaa ajoliuosta, mikä on voinut vaikuttaa onnistuneeseen ajoon. Tulos ei kuitenkaan ollut uusittavissa. Toisessa ja kolmannessa ajossa näyte oli mahdollisesti ehtinyt aggregoitua ja siksi ajot epäonnistuivat. Detektorien sironnassa ei näkynyt selvää piikkiä. Kolmannen ajon lopussa vaihdettiin eluointiliuos natriumatsidipuskurista boraattipuskuriin. Eluointiliuoksen vaihdon jälkeen suoritettiin laitteen huuhtelu uudella liuoksella. Tämän jälkeen detektorien sironnassa havaittiin iso piikki. Yhdiste oli mahdollisesti jäänyt kokonaan injektoriin ja

tuli ulos vasta huuhtelun aikana. Koska kolmannessa ajossa tuli piikki eluointiliuoksen vaihdon jälkeen, päätettiin neljännessä ajossa käyttää eluointiliuoksena boraattipuskuria, mutta ajo ei kuitenkaan onnistunut.



Kuva 11. Ajo 1: dynaaminen sironta. A: retentioaika (s), 90: musta käyrä, sironta 90°, 60: sininen käyrä, sironta 60°.

## 5 POHDINTA

Kalvosuodattimet päästävät aina osittain isompiakin partikkeleita lävitse, sillä huokoskoko ei ole tarkkaan määritelty, vaan perustuu vaihteluväliin. Kuitenkin partikkelikomittaukset antavat liian suuren keskihalkaisijan suodattimien huokoskoon verrattuna. TEM-kuvat tukevat käsitystä siitä, että huokoskovaihteluväliä huomattavasti suuremmat partikkelit ovat päässeet suodattimien lävitse. Kalvosuodatuksessa partikkelit ovatkin voineet päästä suodattimien ohi ja sen tähden joukkoon on voinut päästä paljon suuria partikkeleita. Suodattimet ovat myös voineet mennä asennettaessa jostain syystä rikki niin, että

suurempikokoiset partikkelit pääsivät niiden läpi ylempiin fraktioihin. On myös mahdollista, että fraktioita kerättäessä talteen on tapahtunut fraktioiden sekoittumista.

Geelisuodatuksessa suurimmat partikkelit ovat luultavimmin jääneet kokonaan pylvään sisään, eivätkä tulleet lainkaan ulos. Tämä on myös pääteltävissä siitä, että kahdessa ajossa pylväästä tuli ulos vain yksi pääpiikki. Vasta kolmannessa ajossa pylväästä saatiin ulos kaksi selkeää piikkiä. Kolmannessa ajossa saantoprosentti oli hyvin pieni, joten partikkelien aggregaatio on voinut vaikuttaa siihen, että partikkelit ovat muodostaneet aikaisempia ajoja suurempia aggregaatteja ja sen tähden jääneet pylvään sisään.

AFFFF-ajo ei onnistunut kuin kerran, joten on vaikea sanoa voisiko sillä saada fraktioitua eri kokoluokan partikkeleita. Periaatteessa sen pitäisi olla mahdollista, jos optimaaliset olosuhteet saataisiin säädettyä halutuille partikkeleille.

Erotusmenetelmissä on käytetty erilaisia partikkelipitoisuuksia ja eri määrityksissä erilaisia puskureita ja laimennoksia. Nämä olosuhteiden erot voivat myös vaikuttaa partikkelien stabilisaatioon ja näin ollen mittaustuloksiin. Eri partikkelipitoisuuksissa partikkeleilla on erilaiset olosuhteet. Se vaikuttaa siihen, miten partikkelit stabiloituvat nesteeseen. Kuitenkin esimerkiksi kaikki mittaukset partikkelikokoanalyysointorilla on tehty samassa mittauspuskurissa ja samalla laimennoksella, joten partikkelikokoanalyysointorin antamat tulokset ovat vertailukelpoisia.

Tavoitteita ei täysin saavutettu. Parhaimmalta vaihtoehdolta näyttää kuitenkin geelisuodatus, jossa suuren tilavuuden suodatuksessa saatiin lupaavia tuloksia.

## 6 LÄHTEET

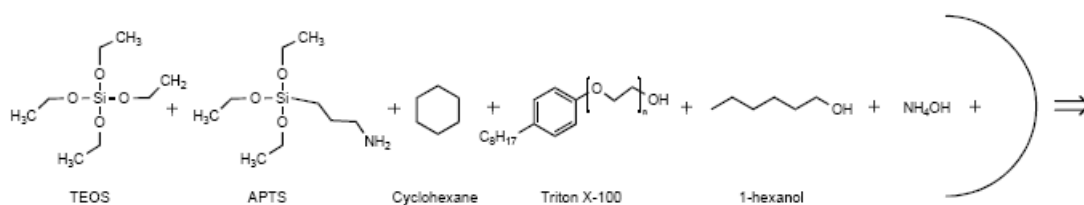
1. Jokinen M. (2008), Prosessitekniikka 2 kurssin oppimateriaali, Turun ammattikorkeakoulu
2. Goodwin JW (2009). Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers. edn. John Wiley & Sons Inc.
3. [www.ymparisto.fi/download.asp?contentid=122316&lan=fi](http://www.ymparisto.fi/download.asp?contentid=122316&lan=fi) [Viitattu 22.11.2011]
4. <http://www.silver-colloids.com/Tutorials/Intro/pcs9.html> [viitattu 10.3.2012]
5. Lucy RF (1972). Infrared to visible parametric upconversion. Applied Optics 11(6): 1329-1336
6. Tkachuk AM, Ivanova SE, Joubert MF, Guyot Y, Isaenko LI, Gapontsev VP (2007). Upconversion processes in Er<sup>3+</sup>: KPb<sub>2</sub>Cl<sub>5</sub> laser crystals. Journal of Luminescence 125(1-2): 271-278.
7. van Dongen M.A., Oomen E.W. and le Gall P.M.T (1991). Upconversion in rare-earth-doped fluoride glasses. Conf on Glasses for Optoelectronics 2; Mar 12-14; The Hague, Netherlands. pp 330-339
8. Auzel F (2004). Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. Chemical Reviews 104(1): 139-173.
9. Kim JW, Mackenzie JJ, Clarkson WA (2009). Influence of energy-transfer-upconversion on threshold pump power in quasi-three-level solid-state lasers. Optics Express 17(14): 11935-11943.
10. Nagarajan S, Zhang Y (2011). Upconversion fluorescent nanoparticles as a potential tool for in-depth imaging. Nanotechnology 22(39).
11. Cho J-H, Bass M, Cassanho A, Jenssen HP, Freisem S, Deppe DG (2011). Properties of Up Conversion Phosphors Necessary for Small Size Emissive Displays. Journal of Display Technology 7(2): 77-83.
12. Selvan ST, Patra PK, Ang CY, Ying JY (2007). Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells. Angewandte Chemie-International Edition 46(14): 2448-2452.
13. Xiao Q, Xiao C (2009). Preparation and Characterization of Silica-Coated Magnetic-Fluorescent Bifunctional Microspheres. Nanoscale Research Letters 4(9): 1078-1084.
14. Selvan ST (2010). Silica-coated quantum dots and magnetic nanoparticles for bioimaging applications (Mini-Review). Biointerphases 5(3): FA110-FA115.

15. Sun L, Zang Y, Sun M, Wang H, Zhu X, Xu S, et al. (2010). Synthesis of magnetic and fluorescent multifunctional hollow silica nanocomposites for live cell imaging. *Journal of Colloid and Interface Science* 350(1): 90-98.
16. Yang H, Zhuang Y, Hu H, Du X, Zhang C, Shi X, et al. (2010). Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles as a Platform for Targeted Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Cancer Cells. *Advanced Functional Materials* 20(11): 1733-1741.
17. Haase M, Schaefer H (2011). Upconverting Nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition* 50(26): 5808-5829.
18. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/photobleaching/> [Viitattu 21.11.2011]
19. Pekka Keränen; 2004; Alitsariinipunainen S (ARS) –väriaineella merkittyjen kalojen otoliittien tulkinta fluoresenssimikroskopiolla [www.rktl.fi/www/uploads/pdf/kt192verkko.pdf](http://www.rktl.fi/www/uploads/pdf/kt192verkko.pdf) [Viitattu 21.11.2011]
20. Chatterjee DK, Gnanasammandhan MK, Zhang Y (2010). Small Upconverting Fluorescent Nanoparticles for Biomedical Applications. *Small* 6(24): 2781-2795.
21. Ong LC, Gnanasammandhan MK, Nagarajan S, Zhang Y (2010). Upconversion: road to El Dorado of the fluorescence world. *Luminescence* 25(4): 290-293.
22. Dong X, Zheng Y, Huang Y, Chen X, Jing X (2010). Synthesis and characterization of multifunctional poly(glycidyl methacrylate) microspheres and their use in cell separation. *Analytical Biochemistry* 405(2): 207-212.
23. Soukka T, Rantanen T, Kuningas K (2008). Photon upconversion in homogeneous fluorescence-based bioanalytical assays. *Fluorescence Methods and Applications: Spectroscopy, Imaging, and Probes* 1130: 188-200.
24. Zhang G, Liu Y, Yuan Q, Zong C, Liu J, Lu L (2011). Dual modal in vivo imaging using upconversion luminescence and enhanced computed tomography properties. *Nanoscale* 3(10): 4365-4371.
25. <http://www.consenxus.com/AFFF-method.htm> AFFFF-laitteen kuva [Viitattu 12.3.2012]
26. T.Soukka, K. Kuningas, T. Rantanen, V. Haaslahti, T. Lovgren, *J Fluoresc*, 15 (2005) 513.
27. <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/71980/AnnalesAI427Riuttamaki.pdf?sequence=1> Heterogeenisen bio-BSA-määrittämisen periaate [Viitattu 10.3.2012]

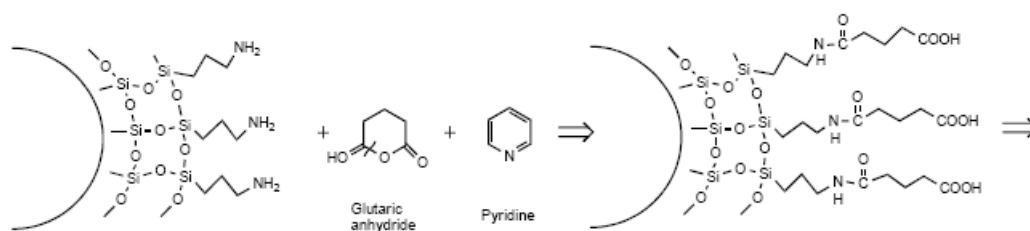


28. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000097.htm> Coulter® N4 Plus Submicron partikkelikokoanalysaattorin toimintaperiaate [Viitattu 10.3.2012]
29. <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/index.html> [Viitattu 27.12.2011]

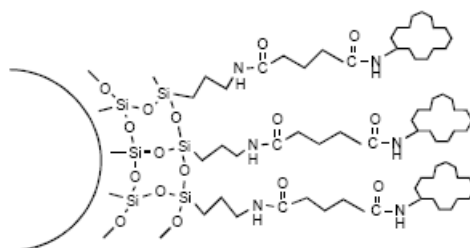
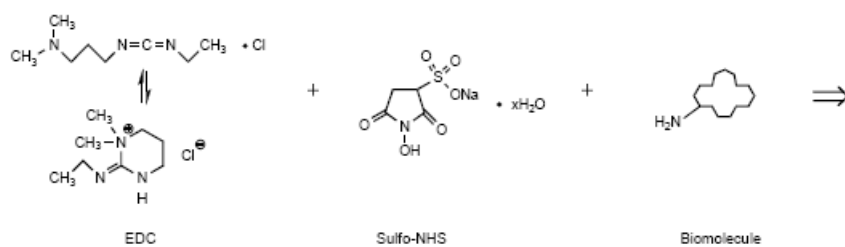
### Silylation



### Carboxylation



### Bioconjugation



	Näyte (tilavuus 50 µl/ajo)	Eluentti	Lateraalivirtaus (ml/min)	Poikittaisvirtaus (ml/min)	Ajon pituus (min)
1.ajo	JV13-SA (1a) 0,3 mg/ml 15.6.09/JV	3 mM NaN <sub>3</sub> , 0,17 mM SDS	2,5	0,15	40
2.ajo	JV13-SA (1a) 0,3 mg/ml 15.6.09/JV	3 mM NaN <sub>3</sub> , 0,17 mM SDS	2,5	0,5	60
3.ajo	JV13-karb.4, 1×AFFFF –b, 0,3 mg/ml, 15.6.09/JV	3 mM NaN <sub>3</sub> , 0,17 mM SDS	2,5	0,15	60
4.ajo	JV13-karb.4, 1×AFFFF –b, 0,3 mg/ml, 15.6.09/JV	10 mM Boraatti-puskuri pH 8,5, 0,1 % Tween 20, 0,45 µm, 15.6.09/MI	2,5	0,15	60

Ajo 1.	Keskihalkaisija (nm)	Keskihajonta (nm)	Intensiteetti	Tomuprosentti (%)
0,2 mg/ml	1064,3	330,8	4.80E+04	24,07
0,2mg/ml	715,6	307,7	9.00E+04	18,31
0.45 µm alta	417,1 nm	152,5	2.20E+06	13,96
0.45 µm alta	346,4	133,8	1.60E+06	17,99
0.2 µm alta	391,9	142,6	1.30E+06	19,73
0.2 µm alta	377,8	138,1	1.40E+06	18,09
0.1 µm alta	601,6	263,3	3.30E+05	15,63
0.1 µm alta	327,6	132,9	3.50E+05	20,19
50 nm alta	1076,0	509,7	1.60E+05	35,29
50 nm alta	1247,1	618,6	1.60E+05	28,75
300 kDa alta	471,5	187,1	5.00E+05	0,00
300 kDa alta	531,8	211,7	4.40E+05	10,18
Ajo 2.	Keskihalkaisija (nm)	Keskihajonta (nm)	Intensiteetti	Tomuprosentti (%)
0.45 µm alta	286,9	127,6	1.30E+05	0,00
0.45 µm alta	269,8	120,6	1.20E+05	0,00
0.2 µm alta	355,2	158,5	3.00E+05	39,53
0.2 µm alta	298,1	131,6	2.50E+05	30,07
0.1 µm alta	257,2	113,9	1.60E+05	82,03
0.1 µm alta	260,1	113,2	1.60E+05	16,62
50 nm alta	300,2	134,6	1.60E+05	0,00
50 nm alta	246,9	105,3	1.70E+05	0,00
300 kDa alta	226,8	99,5	1.60E+05	0,00
300 kDa alta	218,3	95,1	1.70E+05	14,53
Ylin fraktio	496,7	207,0	4.00E+05	28,37
Ylin fraktio	584,2	252,4	4.50E+05	0,00
Ajo 3.	Keskihalkaisija (nm)	Keskihajonta (nm)	Intensiteetti	Tomuprosentti (%)
0.45 µm alta	866,0	388,6	6.40E+04	33,82
0.45 µm alta	356,2	166,9	5.10E+04	0,00
0.2 µm alta	397,8	174,5	2.80E+05	9,65
0.2 µm alta	415,2	181,8	2.90E+05	9,81
0.1 µm alta	340,7	153,9	1.80E+05	0,00
0.1 µm alta	336,8	150,6	1.70E+05	0,00
50 nm alta	232,6	97,8	2.20E+05	18,75
50 nm alta	237,7	99,0	2.30E+05	13,34
300 kDa alta	278,2	122,9	1.50E+05	22,65
300 kDa alta	236,0	105,3	1.40E+05	0,00
Ylin fraktio	883,6	401,4	2.20E+05	27,56
Ylin fraktio	726,6	320,9	2.40E+05	5,90

Ajo 4.	Keskihalkaisija (nm)	Keskihajonta (nm)	Intensiteetti	Tomuprosentti (%)
0.45 µm alta	923,4	446,6	2.10E+05	14,24
0.45 µm alta	637,5	283,4	2.10E+05	20,05
0.2 µm alta	778,0	343,3	3.70E+05	24,02
0.2 µm alta	579,2	248,6	3.00E+05	33,91
0.1 µm alta	671,5	296,8	3.10E+05	23,23
0.1 µm alta	512,5	212,3	3.50E+05	0,00
50 nm alta	420,8	192,6	1.20E+05	16,84
50 nm alta	410,0	184,8	1.30E+05	0,00
500 kDa alta	229,8	104,6	1.40E+05	0,00
500 kDa alta	316,8	143,3	1.40E+05	0,40
Ylin fraktio	585,5	230,2	5.10E+05	13,71
Ylin fraktio	567,0	240,7	5.40E+05	17,82

Ajo 1.	Keskihalkaisija (nm)	Keskihajonta (nm)	Intensiteetti	Tomuprosentti (%)
C1-B2	1325,8	615,5	9,9E4	52,60
C1-B2	2067,0	787,2	6.40E+04	51,02
A2-D3	885,0	402,3	8.30E+04	43,62
A2-D3	23117,6	9515,4	4.20E+04	74,55
Ajo 2.	Keskihalkaisija (nm)	Keskihajonta (nm)	Intensiteetti	Tomuprosentti (%)
E1-G1	187,6	82,0	2.60E+05	1,58
E1-G1	195,6	84,3	2.70E+05	5,39
H1-G2	183,4	76,5	3.60E+05	2,67
H1-G2	190,2	81,3	3.40E+05	0,00
F2-D2	160,5	69,5	3.10E+05	2,27
F2-D2	159,8	69,1	3.10E+05	3,68
C2-C3	151,1	68,6	2.50E+05	8,26
C2-C3	152,8	69,3	2.40E+05	1,74
C5-F5	103,3	48,7	2.00E+05	0,00
C5-F5	102,5	48,3	2.10E+05	0,00
G7-E8	115,4	54,2	2.50E+05	4,22
G7-E8	116,3	54,7	2.30E+05	0,00