

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2016

Heidi Sundström

# VIRUSTEN KALTAISTEN PARTIKKELIEN KAPSELOINTI

Heidi Sundström

## VIRUSTEN KALTAISTEN PARTIKKELIEN KAPSELOINTI

Virusten kaltaisilla partikkeleilla (VLP) on potentiaalisia käyttömahdollisuuksia diagnostiikassa sekä lääketieteellisyydessä, sillä ne ovat turvallisempia kuin esimerkiksi heikennetyt varsinaiset virukset. Kuoren proteiinirakenne on samanlainen kuin vastaavalla viruksella, mutta VLP:t eivät sisällä virusgenomia, DNA- tai RNA-rihmastoa, joka on edellytyksenä replikoitumiselle ja infektion synnylle. Virusten kaltaiset partikkelit sitovat niille spesifisiä vasta-aineita samalla tavoin kuin varsinaisetkin virukset, joten niitä voidaan hyödyntää monen tärkeän viruksen, kuten noro- ja enteroviruskannan rokotteiden sekä diagnostisten menetelmien kehittämiseen.

Viruksien, bakteerien ja niiden osien kapselointiin voidaan käyttää erilaisia biomateriaaleja, joiden tarkoituksena on ylläpitää kapseloitavien aineiden biologista aktiivisuutta. Käytettävän biomateriaalin tulee olla biohajoavaa ja -yhteensopivaa, helposti muokattavaa ja myrkytöntä. Sooli-geeli -prosessilla valmistettu amorfainen silikapohjainen hydrogeeli täyttää nämä ominaisuudet. Sitä on turvallista käyttää elävään kudokseen, sillä se on myrkytön eikä aiheuta tulehduksia.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia silikapohjaisen hydrogeelin soveltuvuutta virusten kaltaisten partikkelien kapseloinnissa. Aluksi valittiin kolme erilaista lähestymistapaa, joiden avulla tutkimustyö aloitettiin. VLP:ta sisältävää geelikapselia liuotettiin puskuriin, jota analysoimalla saataisiin selville liuennon silikan ja vapautuneiden viruspartikkelien määrä ajan funktiona sekä biologisen aktiivisuuden säilyminen. Proteiinipesumenetelmää alettiin kehittää diagnostisia testejä varten niin, että antigeenin todennuksessa käytettävät epäspesifisesti sitoutuneet vasta-aineet saadaan pestyä pois geelimateriaalista. Lisäksi kapselointiin käytettävän geelin reseptiä alettiin kehittää sellaiseksi, että materiaali säilyisi helposti muokattavana ja injektoitavana, mutta samalla materiaalin tulisi pitää kapseloidut VLP:t sisällä.

Solumassasta puhdistetulle VLP:lle eli lysaatille suoritettiin aktiivisuusmittauksia 37 °C:ssa. Tulosten perusteella VLP-aktiivisuus laskee nopeasti (lämpötila on keskeinen tekijä dissoluutio-olosuhteissa, joten tämä pitää huomioida dissoluution jatkosuunnittelussa). Epäspesifisesti sitoutuneiden vasta-aineiden pesua tutkittiin käyttämällä useita eri liuoksia ja parametreja. Tutkimusmateriaaleina käytettiin silikahydrogeelejä ja silikaimplanteja, joiden silikaformulaatioita kehitettiin sekä käytön että proteiinipesun optimoimiseksi. Käytetyille vasta-aineille ei kuitenkaan löytynyt sopivaa menetelmää, joten pesun optimointia pitää jatkaa. Hydrogeelin ominaisuudet saatiin optimoitua kuiva-ainepitoisuuden suhteen sopivaksi, mutta viruspartikkelien mahdollista ulosvuotoa erilaisista materiaaleista on vielä tutkittava.

### ASIASANAT:

diagnostiikka, biomateriaali, silikasooli, hydrogeeli, VLP, vasta-aine, kuiva-ainepitoisuus

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2016 | Total number of pages 48

Mika Jokinen, Principal Lecturer ; Jarno Pusa, Laboratory Engineer

Heidi Sundström

## ENCAPSULATION OF VIRUS-LIKE PARTICLES

Virus-like particles (VLP) have the potential to be used in diagnostics and the pharmaceutical industry because they are safer to use than for example attenuated actual viruses. The protein structure of the envelope is similar to that of the corresponding virus but VLPs do not contain the viral genome, a DNA or an RNA genome, which is a prerequisite for the division and infection. Virus-like particles bind themselves to the specific antibodies in the same way as actual viruses; thus they can be used in the development of vaccines for several important viruses, such as noro- and enteroviruses, and diagnostic methods.

A variety of biomaterials can be used for encapsulation of viruses, bacteria and their components, whereby the main purpose of using biomaterials is to maintain the biological activity of the encapsulated substance. The biomaterial used must be biodegradable, biocompatible, non-toxic and easy to mould. Amorphous silica based hydrogel produced by a sol-gel process has those qualities. It is safe to use on living tissue because it is non-toxic and does not cause inflammations.

The aim of this study was to examine the compatibility of silica based hydrogel for the encapsulation of virus-like particles. To begin the research three different kinds of approaches were chosen. Gel capsules containing VLP were dissolved in buffer which was analyzed to determine the amount of dissolved silica and released virus particles as a function of time and the remaining of the biological activity. Improvement of the protein wash method was started to enable removal of the non-specifically bound antibodies used for detection of antigens from the gel material by washing. Furthermore, development work on the formula of the gel used for encapsulation was started so that it would remain easily mouldable and injectable but at the same time the material should be able to keep the encapsulated VLPs inside.

The activity of the VLP lysate was measured at a temperature of 37 °C and the results showed that the activity of VLP decreases quickly. This is to be taken into account when the dissolution method is planned out in the future because temperature is one of the crucial factors in dissolution circumstances. Washing out the non-specifically bound antibodies was researched by using several different kinds of solutions and parameters. Silica based hydrogels and silica implants were used as research material and their silica formulation was developed to optimize the use and the protein wash method. No suitable method was found for the antibodies used in this study so the optimization of the protein wash needs to be continued. When processing the silica-based hydrogel, the suitable dry matter content and functional properties were optimized but the possibility of virus particles leaking out from different gel materials still requires more study.

**KEYWORDS:**

diagnostics, biomaterial, silica sol, hydrogel, VLP, antibody, dry matter content

# SISÄLTÖ

<b>SANASTO</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 BIOMATERIAALIT</b>	<b>9</b>
2.1 Biomateriaalien käyttö	9
2.2 Hydrogeelit	10
2.3 Antigeenien kapselointi biomateriaaleihin	12
<b>3 DIAGNOSTIIKKA</b>	<b>14</b>
3.1 Vasta-aine	14
<b>4 VIRUKSET JA VIRUSTEN KALTAISET PARTIKKELIT</b>	<b>17</b>
4.1 Aiempi tutkimustyö	18
<b>5 SOOLI-GEELI -PROSESSI</b>	<b>20</b>
<b>6 VASTA-AINEMÄÄRITYS AIKAEROTTEISELLA FLUORESENSSIMITTAUKSELLA</b>	<b>22</b>
<b>7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>23</b>
7.1 Virusten kaltaisten partikkelien erotus ja puhdistus	23
7.2 Soolin valmistus	24
7.3 Silikahydrogeelin valmistus	25
7.4 Proteiinipuhdistus	25
7.5 VLP-aktiivisuusmittaus	26
7.6 Silikahydrogeelin dissoluutio	27
7.7 Silikaimplantit proteiinipesuun	28
7.8 VLP-kapseloinnissa käytetyn silikahydrogeelin resepti	30
<b>8 TULOKSET JA YHTEENVETO</b>	<b>33</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>36</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Aiempi tutkimustyö
- Liite 2. Soolin ja geelin kuiva-ainepitoisuuden laskeminen
- Liite 3. Esimerkki soolin valmistuksesta ja työssä käytetyt soolit
- Liite 4. Aikaerotteisen fluoresoivan vasta-ainemäärityksen ohje
- Liite 5. TRFIA – kuoppalevyjen päällystysohje
- Liite 6. Geelin sisältämän silikan (SiO<sub>2</sub>) määrän laskeminen
- Liite 7. Esimerkki partikkelikokojakauman mittaustuloksista

## KUVAT

Kuva 1. Geelin rakenne	11
Kuva 2. Immunoglobuliinin perusrakenne	15
Kuva 3. Viruksen kapsidin eri muotoja	17
Kuva 4. Viruspartikkeliin sitoutuneet vasta-aineet sekä värjäävä reagenssi silikahydrogeelissä	19
Kuva 5. Aikaerotteisen fluoresenssimittauksen periaate	22
Kuva 6. TRFIA - periaatekuva	27
Kuva 7. a) Silikaimplanteja b) Silikaimplanttien säilytys vedessä	29
Kuva 8. TRFIA - VLP aktiivisuus 37 asteessa	33

## KUVIOT

Kuvio 1. Soolin kuiva-aineen määrän ja R-arvon korrelaatio	21
--	----

## TAULUKOT

Taulukko 1. Immunoglobuliinien isotyypit	16
--	----

# SANASTO

Lyhenne/termi	Lyhenteen selitys
AP	Emäksinen fosfataasi, alkaline phosphatase
HCl	Vetykloridi, suolahappo
<i>In vitro</i>	Elävän organismin ulkopuolella, esimerkiksi koeputkessa tai muulla alustalla
<i>In vivo</i>	Elävässä organismissa
Lysaatti	Soluhajotuksen jälkeen on sentrifugoimalla eroteltu tarpeeton solumassa pois, jolloin VLP:ta sisältävä supernatantti on saatu talteen sekä suodatettu ja tämä puskuriliuos on tutkimuksissa käytetty lysaatti
MES	2-(N-morfoliini-)etaanisulfonihappo
NaOH	Natriumhydroksidi
PBS	Fosfaattisuolapuskuri, phosphate buffered saline
SiO <sub>2</sub>	Piiksididi, silika
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
TR-FIA	Time-resolved fluorescence immunoassay Aikaerotteinen fluoresenssivasta-ainemääritys
TRIS	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani
VLP	Virus-like particle Virusen kaltainen partikkeli

# 1 JOHDANTO

Viruksen kaltaisia partikkeleita (VLP) käytetään laajalti erilaisissa tutkimuksissa varsinainen virusten sijasta, sillä ne eivät sisällä geneettistä materiaalia, jolloin ne eivät pysty replikoitumaan eivätkä aiheuttamaan infektiota. Kun viruksen kaltaisia partikkeleita injektoidaan elimistöön, elimistö alkaa tuottaa kyseiselle virukselle vasta-ainetta. Myöhemmin varsinaisen tartunnan tapahtuessa immuunijärjestelmä käynnistyy ja osaa tuottaa oikeanlaisia vasta-aineita puolustautuessaan virusta vastaan. Erilaiset rokotteet, kuten jäykkäkouristusrokote, toimivat kyseisellä periaatteella. VLP-kapseloinnilla voidaan saavuttaa erilaisia etuja. Kapseloinnissa käytettävä biomateriaali voi parantaa virusten kaltaisten partikkelien termostabiilisuutta ja hitaasti vapautuva VLP voi korvata esimerkiksi tehosterokotteen.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin silikapohjaisen hydrogeelin ominaisuuksia ja toimivuutta VLP-kapseloinnissa. Tarkoituksena oli selvittää, minkälainen silikahydrogeeli sopisi parhaiten biomateriaaliksi virusten kaltaisille partikkeleille, jotta niiden biologiset ominaisuudet pystyttäisiin säilyttämään mahdollisimman tehokkaasti. Tutkimuksen tavoitteena oli myös parantaa VLP-valmisteen termostabiilisuutta niin, että valmistetta voisi säilyttää 4-25 °C:ssa normaalin pakastamisen sijaan.

Opinnäytetyö tehtiin Turun ammattikorkeakoulun Biomateriaalit ja diagnostiikka -tutkimusryhmän projektissa, jonka tavoitteena on kehittää solukapselointiin sopiva hydrogeeleihin pohjautuva biomateriaali. Tarkoituksena on pystyä valmistamaan diagnostiisiin menetelmiin sopiva VLP:ta sisältävä geelikapseli, jonka avulla voidaan todentaa *Influenza-B*-viruksen aiheuttamaa infektiota ja muodostaa analyyseihin sopivat standardit tai vertailuarvot sekä mahdollisesti hyödyntää myös raketustarkoituksiin.

Työssä käytetyn biomateriaalin pohjana toimii kaksivaiheisella sooli-geeliprosessilla valmistettu silikahydrogeeli. Prosessin ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin hapan silika-sooli, jonka pH:ta nostamalla käynnistettiin geelityminen sekä neutraloitiin materiaali kapseloitaville VLP:lle sopivammaksi. Toinen vaihe oli siis geelin muodostaminen, jonka yhteydessä kapseloitiin myös VLP. Geelikapselia liuottamalla tutkittiin sekä silikan liukenemistä että VLP-vapautumista.

Kyseistä opinnäytetyötä edeltävässä tutkimuksessa käytettiin vasta-aineita todentamaan silikahydrogeelin sisälle kapseloituja viruksen kaltaisia partikkeleita. Tässä työssä

erillisten silikaimplanttien avulla puolestaan kehitettiin proteiinipesua, eli tutkittiin millaisella pesuprosessilla saataisiin VLP:hin sitoutumattomat vasta-aineet irrotettua silika-hydrogeelimateriaalista.



## 2 BIOMATERIAALIT

Biomateriaalin ja siitä valmistetun implantin, proteesin tai korvaavan kudoksen tehtävänä on tukea elävän organismin toimintaa. Biomateriaalin ja kohdekudoksen välillä olevaa kontaktipintaa voidaan muokata ja näin vaikuttaa niiden väliseen vuorovaikutukseen. Tuotteiden ominaisuuksissa on otettava huomioon niiden sopeutuminen spesifiseen ympäristöön, suorituskyky sekä toimivuus.

Biomateriaalit voivat olla synteettisiä tai luontoperäisiä. Synteettisiä materiaaleja ovat muun muassa metallit, keraamiset aineet, polymeerit ja komposiitit eli yhdistelmäateriaalit, kun taas luontoperäisiä ovat ihmisen tai eläimen kudoksista (kuten luu, iho, rusto ja sidekudos) valmistetut aineet. Kohdekudokseen ja sitä ympäröiviin nesteisiin sopivan materiaalin lisäksi valintaan vaikuttavat sen fysikaaliset, kemialliset ja biologiset ominaisuudet ja steriilisyys sekä eläinperäisissä materiaaleissa myös laatu, alkuperä ja jäljitettävyys. Näihin ominaisuuksiin perustuvia lakeja säätelee Valvira sekä eurooppalaiset yhdenmukaistetut standardit; keskeisimpinä EN ISO 10993 (kudosten yhteensopivuus), kliinisiä tutkimuksia koskeva standardi ja riskianalyysistandardi (Törmälä et al., 2003; Valvira 2015).

Luontoperäisten materiaalien käytön ongelmia ovat epätasalaatuisuus sekä eläinperäisiin materiaaleihin liittyvät eettiset kysymykset. Toisaalta solujen reagoiminen synteettisiin materiaaleihin voi aiheuttaa ongelmia (Rimann & Graf-Hausner, 2012).

### 2.1 Biomateriaalien käyttö

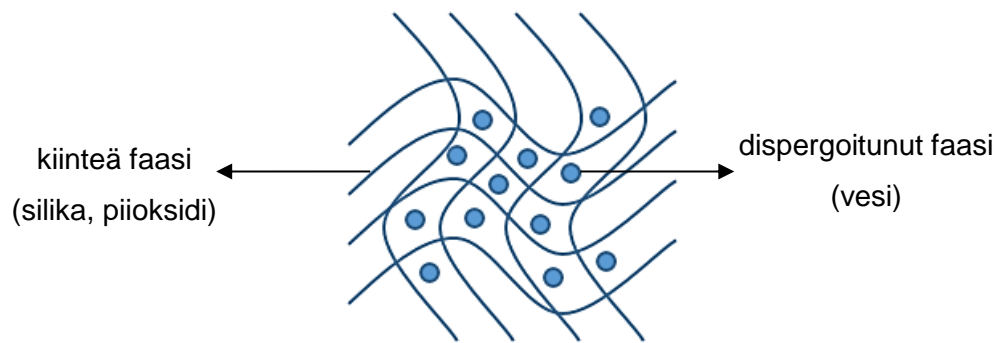
Biologisista materiaaleista yleisimpiä ovat kollageeni ja hyaluronihappo, joita saadaan luonnosta nisäkkäiden elimistöstä ja niitä käytetään muun muassa luusiirrännäisissä, kudosten uusimisessa, nivelrikon, haavojen ja tulehduksien hoidossa sekä terveyttä edistävässä kosmetiikkatuotteissa. Vaikka näiden aineiden biologinen aktiivisuus on hyvä, niin hankalasti kontrolloitavat mekaaniset ominaisuudet, epätasalaatuiset tuotteet ja saatavuus ovat huomattavia heikkoja kohtia (Paakinaho & Kellomäki 2011; Törmälä et al. 2003).

Polymeerit, biokeraamit, metallit ja erilaiset komposiitit eli yhdistelmämaterialit ovat käytetyimpiä synteettisiä materiaaleja. Polymeerejä käytetään usein korvaamaan esimerkiksi pehmytkudosta ja jopa luuta muokkaamalla niiden fyysisiä ominaisuuksia. Herkkyys bakteeritartunnoille ja hapettumiselle rajoittavat kuitenkin käyttöä erilaisissa olosuhteissa. Keraameista valmistetaan useimmiten hammasimplanteja tai luun korjaukseen tarvittavia osia, mutta niitä hyödynnetään myös lääkännostelussa. Metalleista tunnetuimpia ovat väliaikaisessa luunkorjauksessa käytetty ruostumaton teräs, proteeseissa käytetty titaani sekä hammaspaikkana käytetty kulta. Komposiiteissa esiintyy kaksi selkeästi toisistaan rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan eroavaa faasia esimerkiksi jatkuva – epäjatkuva. Hyviä esimerkkejä ovat puu, jossa rakennusaineena toimii selluloosa ja sidosaineena ligniini, ja lasikuitu, jossa on yhdistetty keraami ja muovi (Allcock 2008; Törmälä et al. 2003).

Biomateriaaliin kapseloituja soluja, lääkaineita ja monia muita biologisesti aktiivisia aineita voidaan implantoida tai injektoida suoraan kohdekudokseen. Biomateriaali toimii esimerkiksi solujen kiinnitysalustana, suojaa soluja mekaanisilta vaurioilta ja vähentää apoptoosia. Tyypillisiä kapseloinnin tavoitteita ovat biologisesti aktiivisen aineen kontrolloitu annostelu ja suojaaminen. Perinteisessä injektointimallissa solut injektoidaan elimistöön ilman ympäröivää biomateriaalia, jolloin ne leviävät helpommin muuallekin kuin kohdekudokseen. Solujen kapseloinnissa materiaalin, esimerkiksi geelin tulee muodostua mahdollisimman nopeasti kapseloinnin onnistumiseksi, mutta myös hajota tarpeeksi hitaasti, jolloin estetään solujen ennenaikainen vapautuminen elimistöön (Wang, et al., 2010).

## 2.2 Hydrogeelit

Geeli on kolloidinen dispersio, jossa yhdistyy kaksi faasia; jatkuva kiinteä faasi ja dispergoitunut nestefaasi, joita ei kuitenkaan voi silmämääräisesti tarkalleen erottaa. Kiinteä faasi on tyypillisesti nanohuokoinen ja kolmiulotteinen polymeeriverkosto, jonka sisälle on dispergoituneena nestettä (Kuva 1).



Kuva 1. Geelin rakenne

Sana hydro viittaa veteen ja hydrogeeli onkin suurimmaksi osaksi vettä. Hydrogeelin muodostuessa polymeerit rakentavat keskenään sidoksia veden sisällä, joihin vesimolekyylit jäävät kiinni ja näin alkaa muodostua geeli. Materiaali pystyy absorboimaan itseensä jopa > 95 % vettä omaan painoonsa nähden. Veden määrä, paisuminen ja kutistuminen, materiaalin hajoaminen sekä mekaaniset ominaisuudet ovat biomateriaalin käytön kannalta merkittäviä ominaisuuksia. Tunnetuimpia ovat hydrogeeleistä valmistetut pakkauksissa kuivausaineena käytetyt huokoista silikaa olevat geeligranulat, jotka pitävät esimerkiksi vaatteet ja laukut kosteudelta suojattuna varastoinnin ja kuljetuksen aikana. Hydrogeelejä ja niiden muokattuja ominaisuuksia on myös jo pitkään käytetty lääkeannostelussa (Enas M. Ahmed. Journal of Advanced Research, 2015; Jokinen, et al., 2010; Jones & Hench, 2005).

### SiO<sub>2</sub> -hydrogeeli

Opinnäytetyössä käytetty SiO<sub>2</sub>-geeli on hydrogeeli, joka valmistetaan amorfisesta silika-soolista. Silikan käyttö on hyväksytty elintarvike- ja lääketeollisuudessa, sillä se on epä-organinen, myrkytön sekä biohajoava ja -yhteensopiva. Silikaa on sekä luonnossa että sitä voidaan valmistaa myös synteettisesti. Se ei sisällä eläinperäisiä aineita ja sen amorfisen muodon on todettu liukenevan hyvin elimistössä. Kuiva-aineen eli silikan määrää muuttamalla voidaan säädellä geelin kuiva-ainepitoisuutta, joka puolestaan on suoraan verrannollinen geelin käyttöominaisuuksiin. Mitä enemmän materiaalissa on kuiva-ainetta, sitä tiheämpi huokosrakenne ja tiukempi geelin rakenne (Nieto, et al., 2009; Jokinen et al., 2010).

Silikapohjaisia hydrogeelejä käytetään bioyhteensopivuutensa takia paljonkin kantajamateriaalina lääkeannostelussa, solukapseloinnissa ja kudosteknologian scaffold- eli tukirankasovelluksissa. Synteettisten silikapohjaisten biomateriaalien etuna voidaan pitää kemiallisten ja mekaanisten ominaisuuksien laajaa muokkausmahdollisuutta. Muotoa ja huokoisuutta on helppo muokata. Huokoisuus vaikuttaa aineiden diffuusion, esimerkiksi hapen ja hiilidioksidin kulkeutumiseen. Amorfisen silikan liukoisuus veteen elimistön olosuhteissa (kudoksessa pH 7,4 ja lämpötila 37 °C) on 130-150 ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ), mutta liukenemisnopeus hidastuu noin 20 % kohdalla maksimikonsentraatiosta. Tämä niin sanottu sink -taso on siis 26-30 ppm ja se on otettava huomioon liukenemisnopeusmittauksissa, jossa selvitetään silikan liukenemistä ja viruspartikkelien vapautumista ajan suhteen (Greenwood & Earnshaw, 2001; Jokinen et al., 2010).

$$(1) \text{ solubility eli liukoisuus} = c_{max} \text{ määritellyissä olosuhteissa} \\ = \text{saturaatiokonsentraatio}$$

$$(2) \text{ dissolution rate eli liukenemisnopeus} = \text{liuenut määrä (m - \%)} \text{ ajan funktiona}$$

Kun silikasoolin valmistuksessa käytetään tetra-alkoksisilaania (TEOS), kuten tässä opinnäytetyössä, niin sen reagoi vedessä veden kanssa ja suolahapon toimiessa katalyyttinä, syntyy hapanta silikasoolia ja valmis sooli sisältää myös etanolia. Ennen kapselointia ja geelin muodostumista materiaali neutraloidaan. Eläinsoluja varten materiaalista tulisi haihduttaa etanoli ennen käyttöä, mutta viruspartikkelien kapseloinnin kannalta etanolilla ei ole niin suurta merkitystä. (Jokinen, et al., 2010).

### 2.3 Antigeenien kapselointi biomateriaaleihin

Virusten kaltaisten partikkelien ja muiden rokoteantigeenien kapselointi erilaisiin biohajoaviin biomateriaaleihin suojaaa niiden ominaisuuksia ennen aikaiselta heikkenemiseltä (biologinen aktiivisuus) ja näin ollen parantaa käyttömahdollisuuksia esimerkiksi rokotteissa, jolloin antigeenit vapautuvat kontrolloidulla annostelulla elimistöön. Toinen sovel-lusalue on diagnostiikka, jossa hyödynnetään taudinaiheuttajien havaitsemiseen valmistettuja kontrollinäytteitä; infektoivan viruksen havaitseminen sitä vastaavien virusten kaltaisten partikkelien avulla.

Ennaltaehkäisevät rokotteet ovat tärkeässä roolissa monien infektio-tautien torjunnassa. Ihmisille annettavia rokotetyyppejä on tällä hetkellä kolme; heikennetyllä viruksella tai

bakteerilla varusteltu rokote, kuumentamalla tai kemiallisella käsittelyllä inaktivoituja patogeenin partikkeleita sisältävä rokote ja patogeenin erilaisista komponenteista valmistettu rokote. Kapselointimateriaaleihin ja lääkeannosteluun liittyvissä tutkimuksissa on tutkittu paljon muun muassa biologisesti hajoavia ja -yhteensopivia polymeerejä sekä erilaisia silkkiproteiineja. PLGA ("poly-lactic-co-glycol acid") hydrofobinen polymeeri, on osoittautunut lupaavimmaksi materiaaliksi käytettäväksi lääkeannostelussa ja rokotteissa niin kaupallisessa kuin tutkimustarkoituksessakin. Useita erilaisia bakteeriantigeenejä sekä kokonaisia viruksia ja niiden antigeenejä on onnistuttu kapseloimaan monipuolisesti muokattaviin PLGA-partikkeleihin. Lineaarilla polysakkaridilla (Cs, chitosan) on rokotesovelluksiin edullisia ominaisuuksia kuten liukoisuus veteen, biohajoavuus ja -yhteensopivuus, myrkyttömyys ja läpäisevyyttä edistävät ominaisuudet. Myös silikaa on käytetty virusten kapselointiin (Montimoli, E. et al., Medscape, 2011; Ulanova, L., Isapour, G. et al. Journal of Applied Polymer Science, 2014).

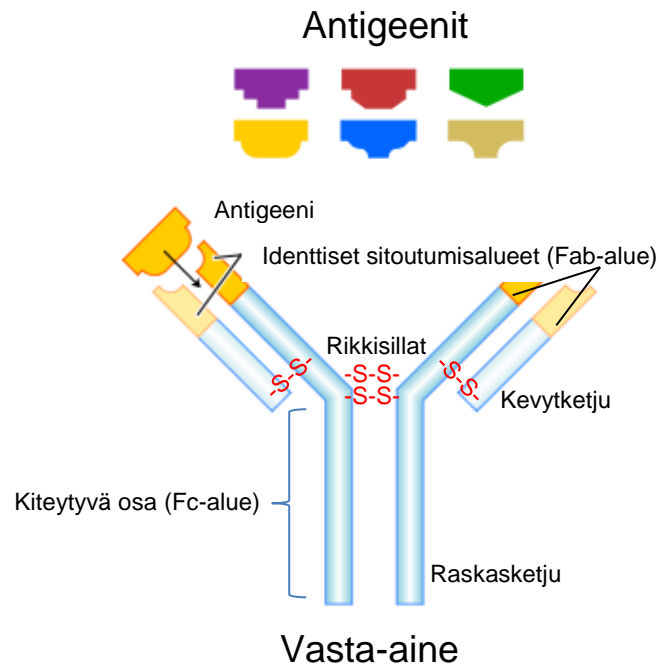
## 3 DIAGNOSTIIKKA

Diagnostiikan peruseriaatteena on tunnistaa mahdollinen tartunta, sairaus tai ongelma elimistössä. Erilaisten diagnostisten menetelmien ja laitteiden avulla lääkärit saavat vahvistuksen tekemälleen diagnoosille ja pystyvät näin määräämään mahdollisimman täsmällistä ja tehokasta hoitoa. Sekä elävässä organismissa että sen ulkopuolella (esimerkiksi koeputkessa) tehtävien sairauksien diagnosoinnit keskittyvät pääasiassa mikrobeihin, varsinkin patogeeneihin ja niiden proteiineihin sekä pieniin molekyyliin, immuunivasteisiin ja geneettisiin taudinaiheuttajiin (Susi, P. 2016).

Diagnostiikan eri osa-alueita ovat muun muassa luonnollinen ja adaptiivinen (opittu) immuniteetti, serologia, leimausmenetelmät, lääketieteellinen mikrobiologia sekä immundiagnostiikka. Bakteerien ja virusten aiheuttamat infektiot ovat laaja tutkimuksen kohde ja vaikka lääketiede on kehittynyt huomasti viimeisien kymmenien vuosien aikana, ei kaikkiin tartuntoihin ole vielä löydetty parannuskeinoa (Susi, P. 2016). Tätä opinnäytetyötä edeltävässä tutkimuksessa käytettiin vasta-aineita todentamaan geelin sisällä mahdollisesti olevia viruksen kaltaisia partikkeleita ja itse opinnäytetyössä tutkittiin epäspesifisesti sitoutuneiden vasta-aineproteiinien irrottamista (proteiinipesu) silikahydrogeelimaateriaalista.

### 3.1 Vasta-aine

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat liukoisia immuunijärjestelmän glykoproteiineja, joita tuottavat pääasiassa plasmasoluiksi muotoutuneet B-lymfosyytit eli B-solut. Vasta-aineiden tehtävänä on auttaa elimistöä tunnistamaan vieraita organismeja, esimerkiksi bakteereja ja viruksia, eli antigeenejä. Jokainen vasta-aine on spesifinen tietyille antigeenille ja B-solun aktivoituessa, eli sen tunnistessa vieraan aineen se alkaa tuottaa oman reseptorinsa mukaista vasta-ainetta (Solunetti 2006. Vasta-aineet; Susi, P. 2016).


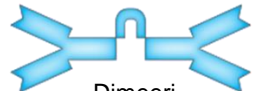
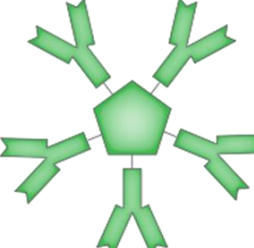


Kuva 2. Immunoglobuliinin perusrakenne

Lähde: Wikimedia (Viitattu 15.05.2016)

Neljästä polypeptidiketjusta, kahdesta identtisestä kevyt- ja raskas ketjusta muodostuvat immunoglobuliinit ovat Y:n muotoisia proteiineja. Peptidiketjut sitoutuvat toisiinsa rikkisiltojen avulla ja jokaisella immunoglobuliinilla on kaksi spesifistä antigeenireseptoria eli sitoutumisaluetta (Kuva 2). Kevyt- ja raskas ketjuissa olevat variaabelit domeenit vastaavat antigeenien tunnistuksesta ja näiden lisäksi kevyt ketjussa on yksi vakiodomeeni ja raskas ketjussa kolme. Vasta-aine voi muodostua yhdestä tai useammasta immunoglobuliinista ja vasta-aineluokkia, isotyyppejä, onkin viisi kappaletta (Taulukko 1) (Solunetti 2006. Vasta-aineet; Susi, P. 2016).

Taulukko 1. Immunoglobuliinien isotyypit

Nimi	Kuvaus	Vasta-aineen kompleksi
IgA	Limakalvoilla (suolisto, hengityselimet), sylki, kyyneleet, veri, rintamaito	 Monomeeri IgD, IgE, IgG
IgD	Antigeenien vastaanottaja B-soluissa, jotka eivät ole altistuneet antigeeneille, ylähengitysteiden suojaaminen	
IgE	Sitoutuu allergeeneihin, laukaisee histamiinin, mukana allergioissa	 Dimeeri IgA
IgG	Ihmisen yleisin vasta-aine, neljä eri muotoa, vasta-aineiden suoja patogeenejä vastaan (bakteerit, virukset), neutraloi bakteerien toksiineja, käynnistää komplementin, passiivinen suoja sikiölle (ainut vasta-aine, joka pystyy ohittamaan istukan)	
IgM	Ainut pentameerinen vasta-aine, kymmenen identtistä aktiivikohtaa antigeenille, neutraloi bakteerien toksiineja, käynnistää komplementin Jos IgM-tasot ovat korkeat, tauti on sairastettu äskettäin, jos taas matalat, (ja IgG tasot korkeat) tauti on sairastettu aiemmin	 Pentameeri IgM

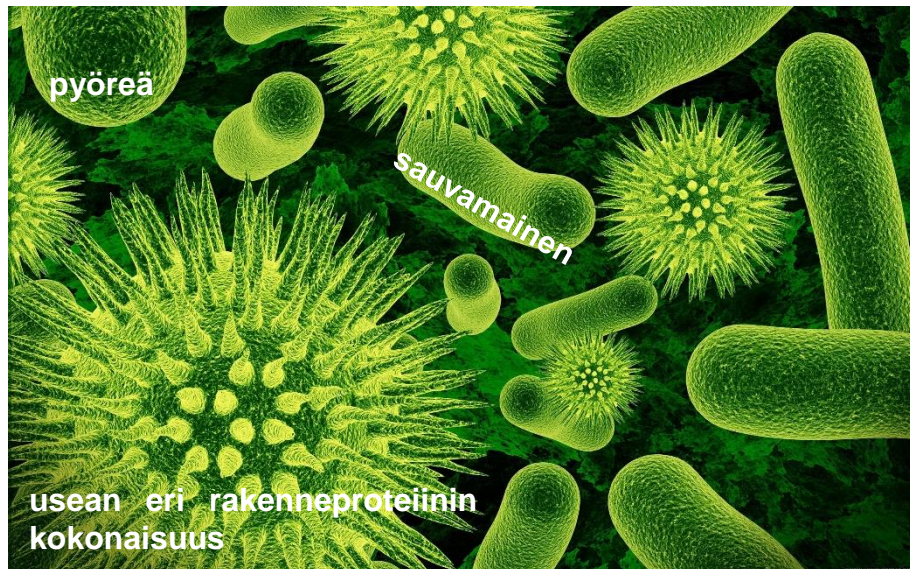
Lähde: Solunetti (Viitattu 10.05.2016),  
Wikimedia (Viitattu 15.05.2016)

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat monospesifisiä, eli yksi vasta-aine tunnistaa vain sen reseptorille ominaisen antigeenin. Tuotanto tapahtuu hybridomasolujen avulla, joista kloonataan täysin samanlaisia immuunisoluja (B-soluja), jotka tuottavat täysin identtisiä vasta-aineita. Monoklonaalisia vasta-aineita käytetään laajasti diagnostiikassa ja tutkimuksissa valitun aineen puhdistamiseen tai todentamiseen, sillä niitä voidaan tuottaa lähes mitä tahansa ainetta vastaan. Vastakohtaisesti polyklonaalisten vasta-aineiden seos tuotetaan B-solujen eri linjoja yhdistelemällä, jolloin nämä vasta-aineet kykenevät sitoutumaan antigeenin eri epitoppeihin usean erilaisen reseptorinsa avulla. Infektiotautien ehkäisy ja hoito on varmasti polyklonaalisten vasta-aineiden merkittävin käyttökohde (Davidson College Biology Department, Monoclonal Antibodies; Kimball, J., Kimball's Biology Pages 2013; Susi, P. 2016).



## 4 VIRUKSET JA VIRUSTEN KALTAISET PARTIKKELIT

Virus on oma biologinen yksikkönsä, elävää organismia infektoiva partikkeli, jolla on kapsidin eli proteiinimolekyyli- tai lipivaipan sisällä yksi- tai kaksijuosteinen DNA- tai RNA-rihman. Virus tarvitsee lisääntyäkseen isäntäsolun eikä sillä myöskään ole solurakennetta tai aineenvaihduntaa. Joillakin viruksilla on tämän lisäksi isäntäsolun kalvorakenteesta peräisin oleva kaksikerroksinen lipidivaippa kapsidin sisä- tai ulkopuolella ja vaippaan kiinnittyneitä hiilihydraatteja. Monien vuosien tutkimusten jälkeenkin on vielä olemassa erilaisia teorioita, mistä virukset oikeastaan ovat peräisin ja voidaanko niitä pitää osin elävinä organismeina vai ei.



Kuva 3. Viruksen kapsidin eri muotoja Lähde: dawddle.com (Viitattu 06.05.2016)

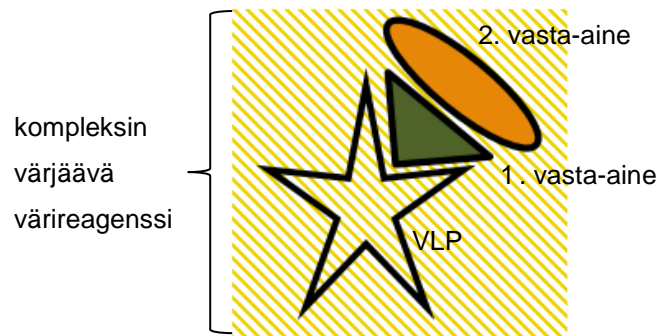
Virusten kokoluokka sijoittuu välille 15-400 nanometriä ja tässä opinnäytetyössä käytettyjen VLP:en keskimääräinen koko on 80-100 nanometriä. Virukset voidaan jakaa kapsidin muodon perusteella helikaalisiin (sauvamaiset), ikosahedraalisiin (pyöreät) ja kapsomeerisiin (useamman eri rakenneproteiinin kokonaisuus)(Kuva 3.). Toinen yleinen luokittelutapa perustuu spesifisyyteen; bakterivirukset eli bakteriofagit, niveljalkaisten bakteriovirukset, nisäkkäille tyypillinen rabies ja vain tiettyjä veren valkosoluja isäntään käyttävä HIV (Human immunodeficiency virus). Lisäksi luokittelua voidaan tehdä virusten sisältämien nukleinihappojen, koon ja niiden aiheuttamien oireiden perusteella (Emiliani, C., 1993; Susi, P. 2016; Solunetti 2006, Virukset.).

Virusten kaltaiset partikkelit muistuttavat nimensäkin mukaisesti suurimmilta osin viruksia ja niitä voidaan tuottaa vastaavien virusten rakenneproteiineista, mutta ne eivät sisällä geneettistä informaatiota, joten ne eivät aiheuta tarttuvia infektioita eivätkä pysty replikoitumaan. Partikkelit voidaan jakaa satelliitteihin, viroideihin ja prioneihin tai vaipallisiin ja vaipattomiin. Virusten kaltaiset partikkelit ovat rokotteissa ja diagnostiikassa turvallisempia ja parempia käyttää kuin tavalliset heikennetyt virukset, sillä ne eivät voi lisääntyä isäntäsolussa ja varsinaisten virusten heikentäminen on osin hankalaa niiden nopean muuntautumiskykynsä takia. Lisäksi niiden kuoren pinnalla on tiheillä alueilla proteiineja, ikään kuin virusepitooppeja, jotka saavat aikaan vahvemman immuunivasteen elimistössä (Chroboczek, J. et al., Acta Biochimica Polonica 2014; Solunetti 2006, Virukset; Susi, P. 2016).

Opinnäytetyössä käytetyt viruksen kaltaisten partikkelit koostuvat Influenssa B-Victoria -nukleoproteiineista (InBnp), joihin on vielä lisätty kaksi puhdistushäntää, hydrofobiini (HFBI) ja 6xhis. Tämä yhdiste on vektorin avulla siirretty *Pichia pastoris* hiivasoluihin, jotka toimivat tuotannossa isäntäsoluina. Kun vähintään kaksi, useimmiten jopa kymmeniä, InBnp+HFBI+6xhis -komplementtia liittyy toisiinsa, muodostuu tässä tutkimuksessa käyttämämme, VLP:ksi kutsumamme yhdiste (Pusa, J. 2016).

#### 4.1 Aiempi tutkimustyö

Aiemmassa VLP -tutkimusryhmän projektissa oli tehtävänä tutustua alusta asti soolin ja geelin tekoon, virusten kaltaisiin partikkeleihin ja näiden kaikkien ominaisuuksiin sekä aiempiin tutkimustuloksiin. Tavoitteena oli myös laskemalla kuiva-ainepitoisuuksia ja kokeilemalla eri tekniikoita löytää toimiva soolin ja geelin valmistusmenetelmä, jonka avulla saataisiin kapseloitua virusten kaltaisia partikkeleita toimivaan materiaaliin. Materiaalin tehtävänä on säilyttää kapseloitavan aineen (VLP) biologinen aktiivisuus ja samalla valmistite parantaisi VLP:n puhdistusta. Tämän jälkeen yritettiin todentaa onnistunutta kapselointia vasta-ainekompleksilla ja värjäävällä reagenssilla (Kuva 4)(Liite 1), mutta ongelmaksi osoittautui myös tyhjän, eli VLP:tä sisältämättömän silikahydrogeelimateriaalin värjäytyminen. Proteiinipesun tarkoituksena on saada kaikki sitoutumattomat vasta-aineet pois geelistä ja liuksesta, mutta koska tyhjä silikahydrogeelikin värjäytyy, niin vasta-aineiden pesu materiaalista ei ole onnistunut.



Kuva 4. Viruspartikkeliin sitoutuneet vasta-aineet sekä värjäävä reagenssi silikahydrogeelissä

Vasta-aineesta riippuen proteiinin kiinnittämiseen ja pesuun käytetään erilaisia puskureita, yleisimpänä PBS- (phosphate buffered saline) tai TBS-puskuria (tris buffered saline). Mikäli kyseessä on AP-leimattu (Alkaline Phosphatase, emäksinen fosfataasi) vasta-aine, suositellaan käytettävän TBS-puskuria, jotta AP-signaali ei häiriintyisi analysoitaessa (AbD Serotec® A Bio-Rad Company).

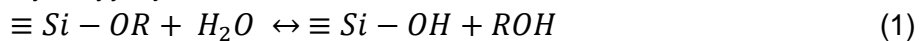
Ensimmäisen vasta-aineen (*Anti-influenza B*) pesuun valikoitui PBS-puskuri, sillä vasta-aineeseen ei ole liitetty emäksistä fosfataasia. Toista vasta-ainetta (*Goat Anti-Mouse IgG (H+L) AP-conjugated*) pestiin ensin AP-detektiopuskurilla ja viimeisenä glysiinipuskurilla (Glycine,  $MgCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ). Värireagenssi (*p-nitrophenylphosphate*) liuotettiin ensin edellä mainittuun glysiinipuskuriin, jonka jälkeen liuos pipetoitiin silikahydrogeelille ja hetken kuluttua se alkoi muuttua kellertäväksi.

Kun haluttua kohdetta, tässä tapauksessa viruksen kaltaisia partikkeleita, todennetaan kahdella vasta-aineella, kutsutaan tätä menetelmää epäsuoraksi todentamiseksi (indirect detection). Ensimmäinen vasta-aine kiinnittyy VLP:iin, jonka jälkeen toinen vasta-aine kiinnittyy ensimmäiseen ja lopuksi värireagenssi reagoi toisen vasta-aineen kanssa antaen visuaalisen reaktion virusten kaltaisten partikkelien osoittamisen merkiksi (Kuva 4). Proteiinipesujen epäonnistuttua todettiin vasta-aineiden jääneen myös silikahydrogeelimateriaaliin kiinni, jolloin värireaktio tapahtui myös geelissä, jossa ei ollut VLP:ta (AbD Serotec® A Bio-Rad Company; Susi, P. 2016).

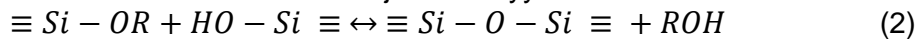
## 5 SOOLI-GEELI -PROSESSI

Kapselointimateriaalina käytetty amorfinen silikapohjainen hydrogeeli valmistetaan kaksivaiheisella sooli-geeli -menetelmällä, joka on yleinen biokeraamisten materiaalien valmistuksessa. Prosessin ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan kolloidinen suspensio, sooli (esim. pH 2), käyttämällä alkoksidia (TEOS, tetraetyyliortosilikaatti) ja vettä sekä suolahappoa (HCl) katalysoimaan hydrolyysireaktiota (1). Tämän jälkeen alkoholin ja veden kondensaatiovaiheissa toisiinsa kiinnittyneet molekyylit vapauttavat pienempiä molekyylejä, tässä tapauksessa etanolia (2) ja vettä (3). Eli TEOS muodostaa silikaa ja etanolia reagoidessaan veden kanssa (4), kun alkoksiryhmä -OR vaihtuu hydroksyyliiryhmään -OH. Käytetyn veden ja alkoksidin eli tässä työssä TEOS:n moolisuhde kuvaa materiaalin kuiva-ainepitoisuutta ja sitä kutsutaan R-arvoksi (Kuvio 1)(Liite 2) (Brinker & Scherer 1990; Jokinen et al. 2010).

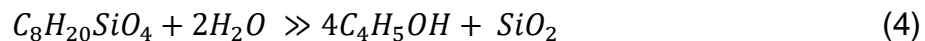
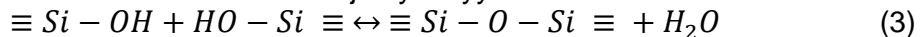
Hydrolyysi ja esteröinti

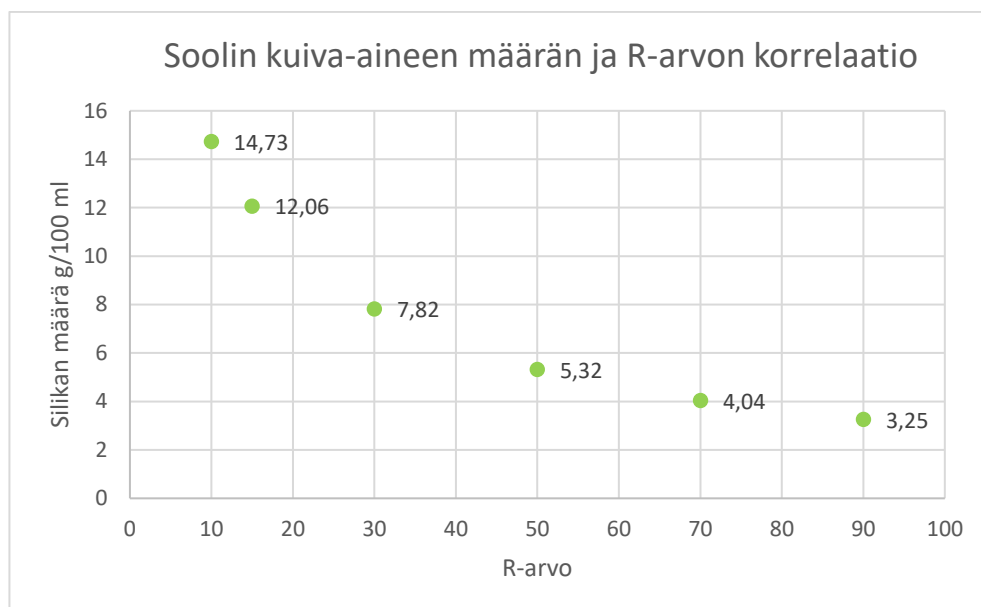


Alkoholin kondensoituminen ja alkoholyysi



Veden kondensoituminen ja hydrolyysi





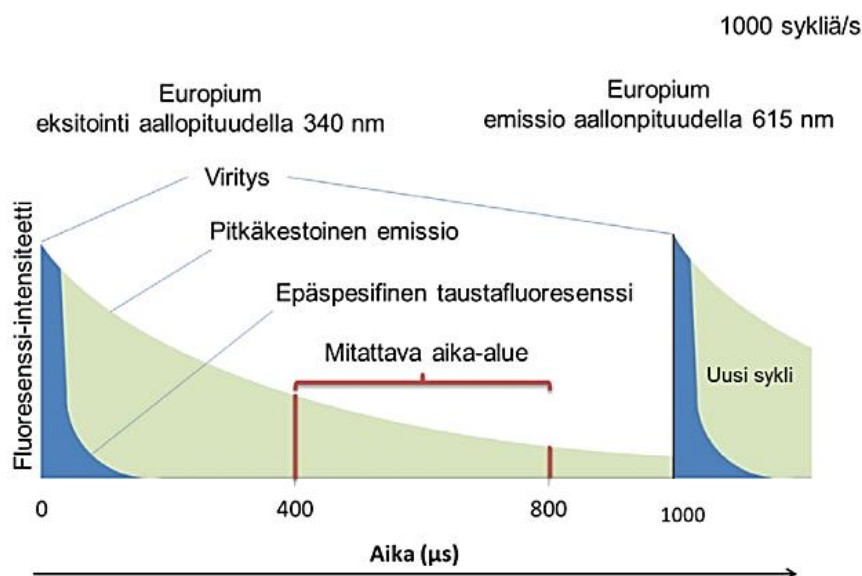
Kuvio 1. Soolin kuiva-aineen määrän ja R-arvon korrelaatio

Geelytyminen eli materiaalin partikkelien aggregoituminen tapahtuu usein olosuhteita, kuten pH:ta, suola- tai kuiva-ainepitoisuutta muuttamalla tai spontaanisti, esimerkiksi pH-arvoltaan 2 oleva R5-sooli (suhdeluku on pieni, eli kuiva-ainepitoisuus on suuri) alkaa geelytyä noin kaksi viikkoa valmistuksesta suljetussa falconputkessa kylmäsäilytyksessä. Opinnäytetyössä geeli muodostettiin lisäämällä sooliin emäksistä natriumhydroksidia geelin neutraloimiseksi ja itse geelytymisen nopeuttamiseksi sekä kapseloitavia viruksen kaltaisia partikkeleita fosfaattipuskurissa eli "lysaattia" (tai tyhjää geeliä tehdessä lysaattissakin käytettyä fosfaattipuskuria). Polymerisaation seurauksena aggregoituneista partikkeleista muodostuu geelille ominainen viskoelastinen tukiranka. Geelin elastinen moduuli on korkeampi kuin viskoosinen moduuli ja soolilla tämä on päinvastoin. Geelytymispisteessä moduulien arvot ovat samat (Brinker & Scherer 1990; Jokinen et al. 2010).

Opinnäytetyössä käytetyssä amorfisesta silikasoolista valmistetussa hydrogeelissä siis kiinteänä faasina toimii huokoinen piioksidi  $\text{SiO}_2$  eli silika ja nestemäisenä dispergoituneena faasina vesi, NaOH ja lysaatti. Normaalisti soolin valmistuksessa muodostuva etanoli on toksista soluille ja sitä voidaan tarvittaessa haihduttaa, mutta viruksen kaltaisiin partikkeleihin etanolilla ei tiettävästi ole negatiivisia vaikutuksia (Brinker & Scherer 1990; Jokinen et al. 2010; Nieto et al. 2009).

## 6 VASTA-AINEMÄÄRITYS AIKAEROTTEISELLA FLUORESENSSIMITTAUKSELLE

Fluoresenssimittauksissa fotonin kohdistettu eksitaatiovalo absorboituu ja kun tämä viritystilasta purkautuu, matalaenergisempi fotonin emittoituu pidemmällä aallonpituudella. Eksitoituneen ja emittoituneen fotonin välistä energiaeroa kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Useissa fluoresenssimittauksissa käytettävät biologiset yhdisteet ja proteiinit ovat luonnostaan fluoresoivia ja aiheuttavat analyysia häiritsevää taustasignaalia. Nämä fluoroforit ovat todella lyhytikäisiä, eli eksitaation jälkeinen emissio laskee hyvin nopeasti. Tähän perustuen aikaerotteisessa fluoresenssimittauksessa käytetään fluoroforeja, joiden elinikä on huomattavasti pidempi ja näin pystytään eliminoimaan analyysia häiritsevä taustafuoresenssi (Kuva 5). TRF-mittauksissa (time-resolved fluorescence) yleisimmin käytetyillä lantanidikelaateilla, Europium (Eu), Samarium (Sm), Terbium (Tb), Dysprosium (Dy), on vaadittavan pitkäikäisen emission lisäksi korkea intensiteetti, suuri Stokesin siirtymä ja kapea emissio (Gudging Dickson, E.F. et al. 1995; Strasburg & Ludescher, 1995).



Kuva 5. Aikaerotteisen fluoresenssimittauksen periaate Lähde: Biogeeni (Viitattu 10.06.2016)

Opinnäytetyössä käytettiin Europium-leimattuja vasta-aineita virusten kaltaisten partikkelien aktiivisuuden selvittämiseen.

## 7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön käytännön osuuteen valittiin kolme pääkohtaa, joiden avulla lähestyttiin aiemmassa tutkimustyössä muodostunutta ongelmaa. Opinnäytetyötä varten valmistettiin amorfista silikasoolia, jota käytettiin silikahydrogeelin valmistuksessa. Kyseiseen geeliin kapseloitiin biologisesti aktiivisia viruksen kaltaisia partikkeleita, sillä silikapohjaisen kapselointimateriaalin avulla pystytään ylläpitämään aktiivisuutta myös pakastusta korkeammissa lämpötiloissa (esimerkiksi 4-25 °C). Toisena tavoitteena oli tutkia VLP:den vapautumista silikahydrogeelistä ja osoittaa vapautuneiden VLP:ien biologisen aktiivisuuden säilyminen ajan suhteen. Tällä pyryttiin osoittamaan, että silikahydrogeeliin kapseloidut VLP:t ovat potentiaalisia VLP-antigeenien kapselointiin ja vapauttamiseen esimerkiksi rokotesovelluksissa. Silikasoolista valmistettiin myös implantteja, joiden avulla tutkittiin sitoutumattomien proteiinien pesua rakenteellisesti tiiviimmän implantin pinnalta. Mikäli proteiineja ei saada puhdistettua implantin pinnalta, niitä ei myöskään mitä todennäköisimmin saada puhdistettua huokoisen silikahydrogeelin sisältä. Virusten kaltaisten partikkelien kapselointiin käytettävän silikahydrogeelin reseptiä tutkittiin soveltuvuuskokeilla, joissa valmistettiin kuiva-ainepitoisuuksiltaan erilaisia silikahydrogeelejä ja niillä tehtiin mittauksia mahdollisten VLP:en ulosvuodon takia. Mikäli kapseloitavaa materiaalia vuotaa ulos ennen aikaisesti, kapselointi ei ole onnistunut.

### 7.1 Virusten kaltaisten partikkelien erotus ja puhdistus

InBnp:a sisältävä hiivasolumassa suspensoitiin fosfaattipuskuriin ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,0) ja hajotettiin soluprässillä. Täydellisen hajoamisen takaamiseksi hajotus suoritettiin kolme kertaa 20 000 psi:n kammiopaineella. Suspensiota säilytettiin jäähauteessa koko prosessin ajan virusten kaltaisten partikkelien deaktivoitumisen estämiseksi.

Hajotuksen jälkeen suspensio sentrifugoitiin 10 000 g:n voimalla 4 asteessa (säilyvyys) tunnin ajan, jolloin haluttu tuote, VLP, jäi supernatanttiin ja soluroska painui pohjalle. Viruksen kaltaiset partikkelit eivät sentrifugoidu kokoluokaltaan suuremman soluroskan mukana, sillä 10 000 g:n voimat eivät riitä 80-100 nanometrin kokoisille partikkeleille.

Lopuksi supernatantti vielä suodatettiin 0,45 mikrometrin suodattimella, jotta valmiista tuotteesta, lymfaattista, saatiin mahdollisimman puhdasta eli se sisältää teoriassa vain viruspartikkeleita fosfaattipuskurissa. Lymfaatti pakastettiin 1,5 millilitran eppendorf-putkissa, kunnes sitä tarvittiin tutkimuskäyttöön.

## 7.2 Soolin valmistus

Amorfinen silikasooli valmistettiin erotussuppilomenetelmällä. Haluttu määrä TEOS:a mitattiin mittalasia apuna käyttäen ja kaadettiin erotussuppiloon. Reseptin mukaan vesi ja suolahappo mitattiin niin ikään mittalasia magneettisekoittajan päällä olevaan 500 millilitran dekanterilasiin. Sekoituksen alkaessa käynnistettiin ajanotto sekä lämpötilan tarkkailu.

Veden ja suolahapon annettiin sekoittua hetki (0-2min), jonka jälkeen seokseen alettiin tiputtaa TEOS:a. Tiputusnopeutta ei ollut ennalta määrätty, mutta reaktion onnistumisen kannalta tiputus ei saa olla liian nopeaa suurten gradienttierojen syntymisen välttämiseksi. Projektin soolien valmistuksessa on TEOS:a lisätty niin, että tipat pystytään selkeästi erottamaan, vaikka tiputusnopeus on ollut melko korkea (noin 5,5-6 ml/min).

Reaktion edetessä seos alkoi kuumentua ja lämpötilan nousu riippuu käytettävän TEOS:n määrästä ja sekoituksen tehokkuudesta. Menetelmässä käytetään apuna virtausestettä, jotta sekoitus tapahtuisi mahdollisimman tehokkaasti. Mitä enemmän TEOS:a ja mitä parempi sekoitus, sitä nopeammin ja korkeammaksi lämpötila nousee. Kun sooli saavuttaa maksimilämpötilansa, niin yleensä niihin aikoihin tai hieman myöhemmin sooli myös kirkastuu, kun reagoimaton TEOS liukenee syntyneeseen etanoliin. Valmiin tuotteen eli soolin kuiva-ainepitoisuus ilmoitetaan R-arvona, joka kuvaa materiaalissa olevan veden ja TEOS:n ainemäärien moolisuhdetta ( $R = n_{H_2O}/n_{TEOS}$ ).

Lopuksi soolin annettiin jäähtyä ja reaktion tapahtua loppuun asti, ennen kuin sekoitus lopetettiin. Tarkemmat aika- ja lämpötilaseurannat löytyvät liitteestä 3. Soolit varastoitettiin 50 millilitran falcon-putkiin ja niitä säilytettiin 4 °C:ssa. Säilyvyyteen vaikuttavat kuiva-ainepitoisuus, lämpötila, kosteus ja happi. Esimerkiksi falcon-putkessa kylmiössä säilytettävät soolit R4 ja R40 eivät ole yhtä pitkään käyttökelpoisia. Korkeamman kuiva-ainepitoisuuden omaava sooli R4 alkaa geeliytyä noin kahdessa viikossa, jolloin viskositeetti kasvaa liian suureksi ja reagenssista tulee käyttökelvotonta.



### 7.3 Silikahydrogeelin valmistus

Geeli valmistettiin soolista, natriumhydroksidista, joka neutraloi materiaalin ja nopeuttaa geelin muodostumista sekä lysaatista tai fosfaattipuskurista. Kaikki reagenssit otettiin hyvissä ajoin huoneen lämpöön ennen valmistusta, koska geeliytyminen tapahtuu paremmin huoneenlämpöisenä kuin jääkaappikylmänä. Poikkeuksena oli lysaatti, joka sulatettiin juuri ennen käyttöä, jotta VLP:t eivät deaktivoituisi ennen kapselointia.

Soolia, jossa HCl:n konsentraatio on 0.01 M, pipetoitiin 5 ml 15 ml:n falcon-putkeen ja siihen lisättiin 0,6 ml NaOH:a 0.1 M. Seoksen annettiin neutraloitua parin minuutin ajan käsin sekoittelemalla. Tämän jälkeen joukkoon pipetoitiin joko lysaatti tai fosfaattipuskuria 0,5 ml riippuen siitä, haluttiinko geeliin kapseloida VLP:ta vai valmistaa vertailugeeli eli tyhjä geeli. Geeliytymistä odotettiin välillä sekoitellen.

Kun seoksesta muodostui yksi kokonainen geeli, joukkoon lisättiin ultrapuhdasta laboratoriovettä, jonka jälkeen geeli hajotettiin vortexilla pieniksi klustereiksi ympäröivään veteen. Tavoitteena oli saada lopulliseksi R-arvoksi joko 200 tai 400, joiden perusteella tarvittava määrä vettä oli laskettu. Geeliklusteriseosta sentrifugoitiin 5 minuuttia 3000 g:n voimalla, jotta vesi saatiin kaadettua pois. Tämän ”pesuvaiheen” tarkoituksena oli poistaa veden mukana geelistä soluhajotuksesta jäänyttä soluroskaa sekä geelistä mahdollisesti irtoava silika. Geelin pesu vedellä suoritettiin yleensä kolme kertaa ennen seuraavaa vaihetta.

### 7.4 Proteiinipuhdistus

Geelin pesuvaiheen jälkeen falcon-putkeen lisättiin 1. vasta-aine puskuuriin sekoitettuna, geeli hajotettiin seokseen käyttämällä vortexia ja annettiin inkuboitua keinuvalla alustalla huoneenlämmössä tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen sentrifugoitiin 3000 g:n voimalla 5 minuutin ajan, jolloin geeliklusterit kerääntyivät yhteen muodostaen yhtenäisen geelikappaleen uudelleen falcon-putken reunalle ja puskuuri voitiin kaataa pois.

*2 µl Anti-influenza B + 20 ml 1xPBS-puskuuri*

Sitoutumattomien vasta-aineiden pesu suoritettiin kolme kertaa 30 ml:lla puskuria (1xPBS, 1xPBS+NaCl, Tris, MES) ja pesupuskuri vaihdettiin pesujen välillä aina sentrifugoimalla. Rinnakkaisille silikahydrogeeleille kokeiltiin erimittaisia pesuaikoja, viidestä minuutista jopa tuntiin.

Seuraavaksi lisättiin 2. vasta-aine myös puskuriin sekoitettuna, vortexoitiin ja annettiin jälleen inkuboitua tunnin ajan. Lopuksi sentrifugoitiin 3000 g 5 min ja puskuri kaadettiin pois.

*2 µl Goat Anti-Mouse IgG + 20 ml 1xPBS-puskuri*

Sitoutumattomat vasta-aineet pestiin pois geelistä ensin kaksi kertaa 30 ml:lla AP-detektiopuskuriä ja kolmannella kerralla käytettiin glysiini-MgCl<sub>2</sub>-ZnCl<sub>2</sub> -puskuriliuosta. Rinnakkaisille geeleille testattiin taas erimittaisia pesuaikoja. Lopuksi geelille lisättiin väri-reagenssipilleri, nitrofenyylifosfaatti, glysiiniliuokseen liuotettuna, jota pipetoitiin 5 ml per geeli.

*5 mg p-nitrofenyylifosfaatti + 20 ml Glysiini, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> (neljä annosta)*

Opinnäytetyössä yritettiin selvittää millaisella pesuprosessilla ja puskureiden yhdistelmällä sitoutumattomat proteiinit saataisiin pestyä pois silikahydrogeelistä, sillä aiemmassa tutkimustyössä tämä todettiin ongelmaksi. Puskureissa on kokeiltu pH:n ja suolapitoisuuden vaihteluita pesuaikojen muutosten lisäksi.

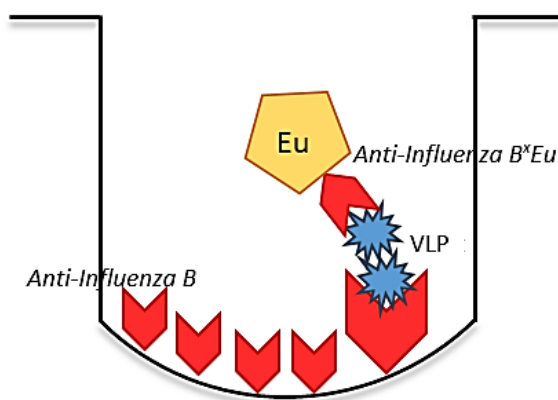
## 7.5 VLP-aktiivisuusmittaus

Ennen dissoluutiotestejä selvitettiin TRFIA-mittauksella pelkän lyaatin eli puskurissa olevien VLP:ien deaktivoitumista 37 °C:ssa ajan funktiona. Aktiivisuusmittauksia varten valmistettiin vasta-aineella (*Anti-influenza B*) päällystettyjä 96-kuoppalevyjä saatujen ohjeiden mukaisesti (Liite 5). Lyaatti otettiin pakkasäilytyksestä, ja siitä otettiin välittömästi näyte, kun se oli saatu sulatettua nestemäiseksi huoneenlämmössä (noin 10 minuuttia). Tämän jälkeen lyaattia inkuboitiin 37 °C lämpökaapissa ja siitä otettiin näytteitä puolen tunnin välein. Näytteet säilytettiin jääkaappilämpötilassa, jossa deaktivoitumisen oletetaan olevan tarpeeksi hidasta, ennen kuin näytteitä käytetään mittaukseen.

Mittausta varten valmistettiin negatiivinen ja positiivinen kontrolli sekä näytteet, ja nämä kaikki laimennettiin suhteessa 1:100. Negatiivisena kontrollina käytettiin mittauksessa

tarvittua puskuria ja positiivisena kontrollina käytettiin juuri sulatettua lymfaattia (samoin kuin ensimmäisenä näytteenä), sillä varsinaista standardinäytettä tätä mittausta varten ei ollut (Liite 4). Rinnakkaiset näytelaimennokset pipetoitiin päällystetylle kuoppalevyille, jonka jälkeen joukkoon pipetoitiin vielä Europium-leimattua vasta-aineliuosta (*Anti-Influenza B<sup>x</sup>Eu*). Inkuboinnin jälkeen suoritettiin pesu. Viimeisenä työvaiheena ennen varsinaista mittausta kuoppiin lisättiin hapanta, kelatoivaa ja signaalia vahvistavaa puhdistusliuosta, joka irrottaa  $\text{Eu}^{3+}$ -ionit vasta-aineesta mittausta varten.

Mittauksessa käytetyt vasta-aineet ovat molemmat Anti-Influenza B:tä, joten ne sitoutuvat antigeeniin, virusten kaltaiseen partikkeliin, vain tiettyyn reseptorikohtaan. Mitä voimakkaampaa signaalia mittauksesta saadaan, sitä paremmin nukleoproteiinit ovat kiinnittyneet toisiinsa eli muodostaneet VLP:ta (Kuva 6).



Kuva 6. TRFIA - periaatekuva

## 7.6 Silikahydrogeelin dissoluutio

Silikahydrogeelin liuotusta eli dissoluutiota tutkittiin 37 °C:ssa ja tätä työvaihetta varten suoritettiin aiemmin VLP:n aktiivisuusmittauksia kyseisessä lämpötilassa. Ympäröivän biomateriaalin oletetaan huomattavasti parantavan VLP:n säilyvyyttä, kun taas VLP:t ilman suojaa deaktivoituvat nopeasti 37 °C:een liuoksessa. Dissoluutionesteinä, johon silikahydrogeeliä alettiin liuottaa, käytettiin tässä työssä Tris-puskuria, joka on vesipohjainen ja sopii liuottamiseen paremmin kuin esimerkiksi fosfaattipohjaiset puskurit (PBS), jotka häiritsevät signaalia silikamittauksissa.

Liutusta varten laskettiin eri kuiva-ainepitoisten silikahydrogeelien sisältämän piioksidin määrä, jonka perusteella voitiin laskea tarvittava puskurin määrä (Liite 6). Tämän määrittämiseen tarvitaan tietoa silikan liukoisuudesta. Silikaa liukenee veteen ja vesipohjaisiin puskureihin teoriassa 130-150 µg/ml, mutta liukeneminen hidastuu, kun on saavutettu 20 prosenttia saturaatiosta eli niin sanotun in sink-rajan jälkeen (26-30 µg/ml), jonka jälkeen puskuri tulee vaihtaa osittain tai kokonaan. Liukoisuus tarkoittaa konsentraatiomaksimia tietyissä olosuhteissa, tässä tapauksessa elimistön kaltaisissa olosuhteissa noin pH 7,4 ja 37 °C, kun taas liukenemisnopeus tarkoittaa liuennutta määrää ajan funktiona. Dissoluutioliuosta mitattaessa, jokaisessa mittapisteessä  $c(\text{SiO}_2)$  -arvon tulisi olla enintään 30 µg/ml (in sink-rajan mukainen), jotta tuloksista saadaan mahdollisimman luotettavia ja tarkkoja.

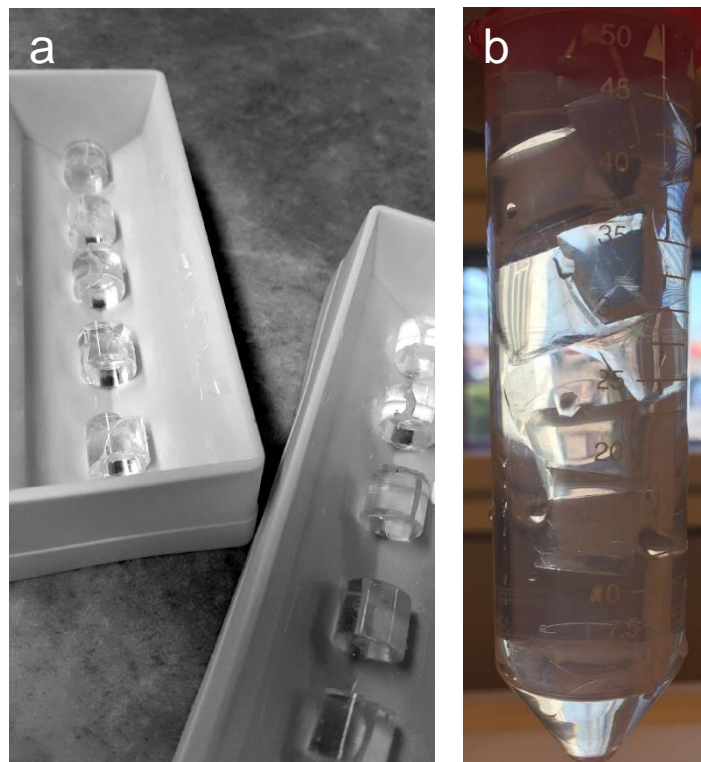
Dissoluutiota varten valmistettiin R30- ja R50-sooleja, joista muodostettiin VLP:tä sisältävät geelit R39 ja R64 (Liite 3). Kuiva-aineen määrän perusteella (Liite 6) laskettiin pie-  
neen mittakaavaan järkevä puskurin määrä, joka jaettiin osiin liuotusastian koon perusteella (esimerkiksi 50 ml:n falconputki). Geelistä leikattiin ja punnittiin pala, jossa oli sellainen määrä silikaa, jonka oli laskettu liukenevan tarvittavaan määrään puskuria. Puskuria voi myös laittaa varmuuden vuoksi hieman enemmän. Geeliä liuotettiin 37 °C:ssa ja dissoluutioliuoksesta otettiin suoraan näytteitä tunnin välein. Liuos voidaan vaihtaa myös näytteen oton yhteydessä kokonaan, kunhan kaikki liuotukseen käytetty puskuri otetaan talteen analysointia varten.

## 7.7 Silikaimplantit proteiinipesuun

Silikaimplantteja valmistettiin vasta-aineiden proteiinipesumenetelmän parantamista varten, sillä aiemmassa tutkimuksessa havaittiin ongelmaksi vasta-aineiden kiinnittyminen VLP:n lisäksi myös huokoiseen silikahydrogeelimateriaaliin. Tarkoituksena oli valmistaa silikahydrogeeliä tiiviimpi implantti, jotta vasta-aineet eivät pääsisi tunkeutumaan pitkälle huokosrakenteeseen, vaan pesu tapahtuisi lähinnä geelin pinnalta. Valmistusmenetelmää ja koostumusta kehittämällä implanteille on käyttöä muissakin diagnosti-  
sissa ja lääketieteellisissä sovelluksissa.

Implantteja varten ei ollut aiempaa valmistusohjetta. Pääraaka-aineena päätettiin käyttää R15-soolia, joka neutraloitiin natriumhydroksidilla lähelle pH 7:ää. Soolin valmistuk-

sessahan käytetään 0.1 M suolahappoa 10 millilitraa, joten soolin valmistuksen loppuvaiheessa lisättiin 10 ml 0.1 M NaOH:a ja tällä reseptillä valmistettujen implanttien kuiva-ainepitoisuuden arvoksi saadaan R24 (Liite 2, Liite 3). pH:n muutos kiihdyttää jonkin verran soolin geelytymistä, joten seos valettiin heti muotteihin. Työhön valikoitui 24-kuoppalevy, sillä sen avulla muodostuneet lieriön muotoiset implantit olivat kompaktin kokoisia käyttötarkoitusta ajatellen (Kuva 7a). Kuopat peitettiin tiiviisti kuoppalevytarralla ja jätettiin geelytymään 37 °C:een lämpökaappiin. Ilmatiiviisti suljettuihin kuoppiin alkaa geelytymisen seurauksena kertyä vettä, joka on erottunut ulos silikahydrogeelistä. Implantin ympärille alkaa muodostua vesifaasi, joka helpottaa sen irrottamista kuopasta.



Kuva 7. a) Silikaimplantteja b) Silikaimplanttien säilytys vedessä

Kuiva laboratorion huoneilma alkoi vaikuttaa heti implantteihin, kun niitä alettiin irrottaa muotistaan. Lieriöt alkoivat säröillä, mikä taas vaikutti negatiivisesti jatkokäsittelyyn. Tämän vuoksi apuna käytettiin puhdistettua vettä, joka helpotti irrottamista ja implantit myös varastoitettiin falcon-putkiin niin, että säilytysliuokseksi laitettiin hieman Milli-Q-vettä (Kuva 7b). Korkean kuiva-ainepitoisuuden takia vedessä säilyttäminen ei vaikuttanut implanttien liukenemiseen (vesi saturoitui nopeasti silikan liukenemistuotteella).

Koska silikahydrogeeli sisältää todella runsaasti vettä, päätettiin kokeilla vielä implanttien kuivattamista, jotta niistä saataisiin kestävämpiä jatkokäsittelyä varten. Kuivatus suoritettiin todella hitaasti, sillä implanttien irrotusvaiheessa oli juuri todettu kuivan huoneilman tuhoavan rakennetta nopeasti. Implantteja laitettiin muutama kappale sopivaan astiaan, esimerkiksi pipetointikaivoon (Kuva 7a), ja peitettiin parafilmillä, johon tehtiin satunnaisesti muutama pieni reikä. Näin implanteista erottuva vesi pääsi haihtumaan vähitellen ja rakenne pysyi ehjänä.

Proteiinipesun testaamiseen käytettiin samanlaista prosessia kuin aiemmassa tutkimuksessa VLP:n todentamiseen geelin sisältä. Ensin implanttia inkuboitettiin ensimmäisen vasta-aineen, *Anti-Influenza B*, kanssa huoneenlämmössä tunnin ajan. Tämän jälkeen kokeiltiin erimittaisia pesuja PBS-, Tris- ja MES-puskureilla. Seuraavaksi lisättiin toinen vasta-aine, *Goat Anti-Mouse IgG*, jonka inkuboinnin jälkeen pesuja kokeiltiin Tris-, MES- ja AP-detektiopuskureilla. Viimeinen pesu suoritettiin aina glysiiniliuoksella kuten aiemminkin, ja väriagenssina toimi edelleen nitrofenyylifosfaatti.

#### 7.8 VLP-kapseloinnissa käytetyn silikahydrogeelin resepti

Virusten kaltaisten partikkelien kapselointiin käytettävän silikahydrogeelin pH:n tulee olla lähellä neutraalia, jotta partikkelien biologinen aktiivisuus säilyy eikä proteiinirakenne tuhoudu. Materiaalin tulee olla tarpeeksi tiivistä, jotta kapseloidut viruksen kaltaiset partikkelit eivät vuoda ennen aikaisesta ulos, mutta käsiteltävyys ei kuitenkaan saisi kärsiä. Silikahydrogeeli valmistetaan happamasta silikasoolista (pH2, HCl:n konsentraatio soolissa on 0.01 M), johon lisätään emäksistä natriumhydroksidia geeliytymisen nopeuttamiseksi ja geelin neutraloimiseksi. Geeliytymisajan, johon vaikuttavat aika, lämpötila, pH ja kuiva-ainepitoisuus, tulee olla tarpeeksi pitkä, jotta materiaali ehtii neutraloitua ennen VLP-lisäystä ja geeliytyä vasta tämän jälkeen. Geeliytymisajalla tarkoitetaan tässä työssä aikaa soolin pH:n nostohetkestä geeliytymispisteeseen, eli kun nestemäisestä seoksesta alkaa muodostua selkeä geelimäinen rakenne.

Aiemman tutkimustyön kokeilujen perusteella (Liite 1) geelin reseptiksi muodostui:

- 5 ml valikoitua soolia 0.01 M pH 2
- 0,6 ml NaOH-liuosta 0.1 M pH 13.

Kun nämä reagenssit ovat neutraloineet toisensa, voidaan joukkoon lisätä lysaattia eli kapseloitavia VLP:ta 0,5 ml. Näin geelin yhteistilavuudeksi saadaan 6,1 ml. Geelin kuiva-ainepitoisuutta laskiessa käytetyn soolin määrästä lasketaan kuiva-aineen (TEOSista

syntyvä piioksidi) ja veden määrä mooleina ja geelissä käytetyt lysaatti ja NaOH-liuos huomioidaan vetenä. Aluksi geelejä tehtiin R4-soolista, jossa  $\text{SiO}_2$ :n osuus on korkea, mutta ne osoittautuivat pian aivan liian tiiviiksi rakenteeltaan ja geelin jatkokäsittely oli hankalaa.

Sopivan reseptin selvitystä varten valmistettiin sooleja R-arvoilla 30, 50 ja 70, joista muodostettiin sillikahydrogeelejä R39, R64 ja R88. Ensimmäisten geelikokeilujen jälkeen huomattiin, että R70-soolista valmistettu kapselointimateriaali jäi liian löyhäksi eikä rakenne pysynyt kunnolla kasassa, joten tarkemmin testattaviksi sooleiksi jäivät R30 ja R50.

Geelimateriaalin testaus suoritettiin seuraavasti:

- Valmistettiin kerrallaan kaksi rinnakkaista, yhtä paljon kuiva-ainetta sisältävää geeliä, joista toiseen kapseloitiin VLP:tä ja toisessa näiden tilalla käytettiin vastaava määrä pelkkää fosfaattipuskuria.
- Geelin resepti 5 ml R30/R50 0.01 M + 0,5 ml NaOH 0.1 M + 0,5 ml lysaatti/fosfaattipuskuri = R39/R64
- Geelien muodostumisen jälkeen niiden rakenne hajotettiin puhdistettuun veteen, jolloin muodostui erikokoisia geeliklustereita sisältävä seos. Vettä lisättiin niin, että seoksen R-arvo nousi noin 300:aan; R39-geeli hajotettiin 31 ml:aan vettä (R301) ja R64-geeli 19 ml:aan vettä (R303). Tämä toistettiin kolme kertaa, jolloin joka hajotuskerran jälkeen sentrifugoitiin ja supernatantit otettiin talteen analysointia varten.

Supernatanteista valmistettuja näytteitä mittaamalla selvitettiin, vuotaako viruksen kaltaisia partikkeleita ulos geelimateriaalista. Analysointimenetelmänä käytettiin valosiron-taa, Nicomp 380 partikkelikokomittaria (Liite 7). Punainen laservalo on aallonpituudeltaan 675 nm ja saa aikaan dynaamista valon siroamista, jota voidaan käyttää 2 nm – 5000 nm kokoisten partikkelien, kuten nanopartikkelien, proteiinien ja kolloidien mittaamiseen. Näytelaimennoksien tulee olla tarpeeksi laimeita, jotta partikkelit pääsevät liikkumaan sattumanvaraisesti ja itsenäisesti. Laservalo siroaa erikokoisista partikkeleista erilaisella intensiteetillä. Suuremmat partikkelit liikkuvat pienempiä hitaammin, joten partikkelien nopeuden ja siroavan valon intensiteetin perusteella saadaan tietoa näytteen partikkelikokojakaumasta.

Näytteistä valmistettiin laimennussarjoja, sillä niiden alkuperäinen konsentraatio ei ollut tiedossa ja toimiva laimennos tuli löytää kokeilemalla. Kaikki näytteet valmistettiin laminaarikaapissa ylimääräisten kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. VLP:ta sisältävistä silikahydrogeelikapseleista saaduista näytteistä selvitettiin mahdollista partikkelien ulosvuotoa. Tulosten luotettavuuden kannalta analysoitiin myös tyhjästä silikahydrogeeleistä saatuja näytteitä, joiden avulla selvitettiin mahdollisesti irronneiden silikahiukkasten aiheuttamaa signaalia partikkelikokojakaumassa.



## 8 TULOKSET JA YHTEENVETO

Virusten kaltaisten partikkelien aktiivisuus 37 °C asteen lämpötilassa laski huomattavasti jo yhden tunnin inkuboitumisen jälkeen (Kuva 8). Mittaukset tehtiin fosfaattipuskurissa oleville VLP:lle eli lysaatille, joten tässä työvaiheessa VLP:n suojana ei vielä ollut biomateriaalia. Mittauksien tarkoituksena oli tarkoitua pohjustaa dissoluutiokokeita. Tuloksien perusteella voidaan todeta, että dissoluutiota tehdessä näytteitä tulee kerätä maksimissaan yhden tunnin välein, mielellään vielä useammin, ja näytteet tulee mitata nopeasti tai säilöä kylmässä, jotta aktiivisuus ei häviä ennen mittausta.

N	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	12038	14019	14453	12771	13681	6644	6502	4614	3991	2855	2901		
230	13991	3829	2329	1840	1526	476	1126	0	71	28	0		

*N = negatiivinen kontrolli, P = positiivinen kontrolli (VLP heti sulatuksen jälkeen), 1 = 0 h eli VLP heti sulatuksen jälkeen, 2 = 0,5 h sulatuksen jälkeen 37 °C, 3 = 1 h, 4 = 1,5 h, 5 = 2 h, 6 = 2,5 h, 7 = 3 h, 8 = 3,5 h*

Kuva 8. TRFIA - VLP aktiivisuus 37 asteessa

Mikäli VLP:ta halutaan hyödyntää rokotustarkoituksessa injektoimalla niitä elimistöön, täytyy aktiivisuusmittauksia suorittaa myös geelikapselin liuottamisen yhteydessä, jolloin VLP vapautuu biologisia ominaisuuksia suojaavan biomateriaalin sisältä. Pelkän VLP:n aktiivisuutta mitattaessa menetelmää tulee vielä kehittää, jotta tuloksista saadaan yhdenmukaisia jokaisella mittauksella.

Silikahydrogeelin dissoluutioon käytettävää menetelmää ehdittiin kokeilla vain muutamia kertoja, joten sitä tulee kehittää tulevia tutkimuksia varten. Dissoluutioliuoksen analysointiin tarkoitettua näytteiden mittausmenetelmää, joka huomioi sekä liuokseen vapautuneiden silika- että VLP:en määrän ajan funktiona, ei saatu toimimaan tämän opinnäytetyön aikana, jolloin varsinaisia tuloksia tästä työvaiheesta ei ole.

Vasta-aineiden irrottamiseen käytettävä proteiinipesumenetelmä ei tämänhetkessä muodossaan toiminut halutulla tavalla. Vasta-aineiden avulla halutaan todentaa geelikapselin sisällä mahdollisesti olevia viruksen kaltaisia partikkeleita, mutta koska proteiinit

kiinnittyvät liian voimakkaasti huokoiseen silikahydrogeelimateriaaliin, ei voida olla varmoja, aiheutuuko syntyvä värisignaali halutuista VLP:n ja vasta-aineiden muodostamasta kompleksista vai pelkistä geeliin kiinnittyneistä vasta-aineproteiineista. Eli kun valmistettua VLP:ta sisältävää silikahydrogeeliä inkuboidaan vasta-aineen ja puskurin liuoksessa, vasta-aineproteiinin halutaan kulkeutuvan pitkälle huokoisen geelimateriaalin sisälle ja sitoutua VLP:hin. Proteiinipesun tarkoituksena on pestä sitoutumattomat vasta-aineet pois. Tämän testaamista varten vasta-aineita inkuboitii myös sellaiseen geeliin, jossa ei ole VLP:ta, jolloin sitoutumista ei pitäisi tapahtua. Mutta koska myös tämä niin sanotusti tyhjä silikahydrogeelikin antoi värisignaalin, proteiinipesu ei ole onnistunut ja vasta-aineet ovat tiettävästi kiinnittyneet silikahydrogeeliin. R15-soolista valmistettiin paljon tiukemman rakenteen omaavia silikaimplantteja, joiden avulla testattiin proteiinipesua materiaalin pinnalta. Useista erilaisista pesuparametreista huolimatta implantitkin antoivat kerta toisensa jälkeen värisignaalin. Silikaimplantteja, sellaisenaan tai kuivatettuna vielä matalampaan vesipitoisuuteen ja tiiviimpään rakenteeseen, voidaan käyttää jatkossa proteiinipesun kehittämiseen.

Virusten kaltaisten partikkelien kapselointiin käytettävän silikahydrogeelin testaaminen edistyi opinnäytetyön aikana hyvin. Kun geelin R-arvo oli välillä R39 ja R64, eli valmistukseen käytettyjen soolien R-arvo oli välillä R30 ja R50, muokattavuus ja käsiteltävyys säilyivät hyvinä. Näillä arvoilla valmistettuja materiaaleja voidaan käyttää jatkotutkimuksissa. Silikahydrogeelin muodostamiseen ja VLP-kapselointiin kehitettiin opinnäytetyön puitteissa resepti, jonka pohjalta kaikki tutkimuksessa käytetyt VLP –geelikapselit on valmistettu:

*5 ml R30/R50 0.01 M sooli + 0,6 ml 0.1 M NaOH + 0,5 ml VLP/fosfaattipuskuri*

Partikkelikokomittarilla yritettiin selvittää mahdollista VLP-ulosvuotoa kapselointimateriaalin käsittelyn yhteydessä, mutta useista eri näytteistä ja laimennoksista huolimatta analyyseista ei saatu luotettavia tuloksia. R39-geelin supernatantista saadut tulokset viittasivat siihen, että geelistä olisi vuotanut ulos VLP-aggregaatteja. Yhden partikkelin koko on arviolta 100 nm ja partikkelikokomittauksissa tulokseksi saatiin hieman yli 300 nm (Liite 7). Mutta laitteen epäsystemaattisten mittaustulosten johdosta päätettiin analysoida myös ultrapuhdasta laboratoriovettä, jonka ei pitäisi sisältää laservalon havaitsemia partikkeleita. Koska mittauksesta saatiin kuitenkin tulos, jossa gaussin käyrän mukaisessa jakaumassa ultrapuhdaassa vedessä olisi keskimäärin 4900 nm kokoisia partikkeleita ja koska tätä tulosta ei voitu liittää epäpuhtauksiin, jouduttiin toteamaan kaikki mittauksissa saadut tulokset epäluotettaviksi.

Jatkotutkimuksissa voitaisiin kehittää menetelmä, jonka avulla voidaan seurata VLP-määrää ennen kuin se kapseloidaan, kun kapselia käsitellään ja kun sitä aletaan liuottaa ja VLP vapautuu. Tällöin pystytään ilmoittamaan kuinka suuri osa kapseloitavista VLP:sta vapautuu injektioon ja biomateriaalin liukenemisen jälkeen.

## LÄHTEET

AbD Serotec® A Bio-Rad Company. Western Blotting. Viitattu 15.05.2016  
<https://www.abdserotec.com/western-blotting.html>

Allcock, H. 2008. Introduction to Materials Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Brinker, C. & Scherer G. 1990. Sol-gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. San Diego: Academic Press, Inc.

Chroboczek, J., Szolajska, E., Szurgot, I. Acta Biochimica Polonica 2014, Vol. 61, No 3/2014 531–539. Virus-like particles as vaccine. Viitattu 15.05.2016

Davidson College Biology Department, Monoclonal Antibodies. Viitattu 10.06.2016  
<http://www.bio.davidson.edu/molecular/MolStudents/01rakarnik/mab.html>

Emiliani, C. 1993. Extinction and viruses. BioSystems 31: 155-159. Viitattu 15.05.2016

Enas M. Ahmed. ScienceDirect 2016. Journal of Advanced Research. Volume 6, Issue 2, March 2015, Pages 105–121. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. Viitattu 06.05.2016

Greenwood, N. & Earnshaw, A., 2001. Chemistry of the Elements. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Gudging Dickson, E.F.; Pollak, A. & Diamandis, E.P. (1995) Ultrasensitive bioanalytical assays using time-resolved fluorescence detection. Pharmacology & Therapeutics, 66: 207–235.

Immunoglobuliinien rakennekuvat. Viitattu 15.05.2016  
<https://fi.wikipedia.org/wiki/Vasta-aine#/media/File:Mono-und-Polymere.svg>

Jokinen, M., Györvary, E. & Rosenholm, J., 1998. Viscoelastic characterization of three different sol-gel derived silica gels. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 141: 205-216.

Jokinen, M., Jalonen, H., Forsback, A.-P. & Koskinen, M., 2010. Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof. s.l. Patentintiro US 20100119500 A1.

Jones, J. & Hench, L., 2005. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering 1-6:1-70.

Kimball, J. Kimball's Biology Pages. Monoclonal Antibodies. 23 February 2013. Viitattu 15.05.2016

Kuva 2. Immunoglobuliinin perusrakenne. Viitattu 15.05.2016  
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2d/Antibody.svg/255px-Antibody.svg.png>

Kuva 3. Viruksen kapsidin eri muotoja. Viitattu 06.05.2016  
<http://dawddle.com/wp-content/uploads/2014/01/cellular-virus-wallpaper.jpg>

Kuva 5. Aikaeroitteisen fluoresenssimittauksen periaate. Viitattu 10.06.2016  
[www.edu.fi/biogeeni](http://www.edu.fi/biogeeni) > Vasta-ainemääritys

Montomoli, E. et al. Medscape 2011. Current Adjuvants and New Perspectives in Vaccine Formulation. Viitattu 15.05.2016

- Nieto, A. et al., 2009. Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomaterialia* 5: 3478-3487.
- Paakinaho, K. & Kellomäki, M. 2011. Kudostekniikan biomateriaalit – Räätelöidyistä materiaaleista ihmisen varaosiksi. Fimea, Sic!
- Pusa, J., laboratoriovastaava. 19.05.2016. VLP tuotanto ja muodostuminen.
- Rimann, M. & Graf-Hausner, U., 2012. Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 1-7.
- Sartor, M. DYNAMIC LIGHT SCATTERING. University Of California San Diego. Viitattu 16.05.2016.  
[https://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics\\_173\\_273/dynamic\\_light\\_scattering\\_03.pdf](https://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf)
- Strasburg, G.M. & Ludescher, R.D. (1995) Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 69–75.
- Solunetti 2006. Vasta-aineet. Viitattu 10.05.2016  
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>
- Solunetti 2006. Virukset. Viitattu 15.05.2016  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virukset/>
- Susi, P., Diagnostics 2016 kurssimateriaali, Turun ammattikorkeakoulu, Turku.
- Törmälä, P. Aho, A., Anderson, Ö., Heikkilä, J., Keränen, J., Kontinen, Y., Lappalainen, R., Lepojärvi, M., Nevalainen, J., Santavirta, S., Salenius, J., Tarvainen, T., Törmälä, P., Vallittu, P., Viljanen, V., Waris & E., Waris, V. 2003. Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin. *Lääkelaitoksen julkaisusarja* 3/2003.
- Ulanova, L., Isapour, G. et al. *Journal of Applied Polymer Science*. Development of Methods for Encapsulation of Viruses into Polymeric Nano- and Microparticles for Aquaculture Vaccines. Received 22 December 2013; accepted 4 March 2014. Viitattu 15.05.2016.
- Valvira 2016. Biomateriaalit. Viitattu 06.05.2016  
[www.valvira.fi/terveydenhuolto/terveysteknologia/biomateriaalit](http://www.valvira.fi/terveydenhuolto/terveysteknologia/biomateriaalit)
- Virusoppi, Diagnostisen palvelutoiminnan laatukäsikirja. Antigeeniosoitus. Voimassa alkaen 26.02.2013. Turun Yliopisto.
- Wang, F. et al., 2010. Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers. *Acta Biomaterialia* 6: 1978-1991.

## Aiempi tutkimustyö

1. Valmistetaan 100 ml haluttua soolia lasketuilla arvoilla, käyttäen 98 % TEOSia, Milli-Q-vettä ja 10 ml 0.1 M HCl-liuosta.

$$V_{TEOS} = \frac{V_{TOTAL}}{\left(\frac{R_{SOOLI} * c_{TEOS}}{c_{H2O}} + 1\right)}$$

$$V_{total} = 100 \text{ ml}$$

$$R_{sooli} = 40 \rightarrow V_{TEOS} = 24,02 \text{ ml}, V_{H2O} = 65,98 \text{ ml}, V_{HCl} = 10,00 \text{ ml}$$

$$c_{TEOS} = 4,389 \text{ mol/l}$$

$$c_{H2O} = 55,506 \text{ mol/l}$$

Kaikki valmistukseen tarvittavat reagenssit on säilytetty huoneenlämmössä.

2. Tiedetään aiempien kokeilujen perusteella, että 0.0 1M pH2 soolia käytetään 5 ml:aa ja se saadaan neutraloitua 0,5 ml:lla 0.1 M NaOHia. Lasketaan haluttu R-arvo (50) muuntelemalla neutraloivien aineiden määrää (lähinnä lyaattiin/veden).

$$c_{TEOS \text{ soolissa}} = \frac{c_{TEOS} * V_{TEOS}}{V_{TOTAL}}$$

$$n_{TEOS \text{ soolissa}} = c_{TEOS \text{ soolissa}} * V_{geeli \text{ reseptissä}}$$

$$c_{H2O \text{ soolissa}} = \frac{c_{H2O} * (V_{H2O} + V_{HCl})}{V_{TOTAL}}$$

$$n_{H2O \text{ soolissa}} = c_{H2O \text{ soolissa}} * V_{geeli \text{ reseptissä}}$$

$$n_{H2O \text{ geelissä}} = n_{H2O \text{ soolissa}} + \frac{m_{NaOH} + m_{lysaatti}}{M_{H2O}}$$

$$R_{geeli} = \frac{n_{H2O \text{ geelissä}}}{n_{TEOS \text{ soolissa}}}$$

**5 ml R40 0.01 M+0,5 ml NaOH 0.1 M + 0,5 ml lyaatti/fosfaattipuskuri**

= **R51,58** (näillä arvoilla päästään tarpeeksi lähelle haluttua R-arvoa ja geeli on toimiva)

3. Geelytetään reagenssit ja lisätään 30 ml Milli-Q vettä, jonka jälkeen hajotetaan geeli vortexilla. Veden lisäyksen jälkeen R-arvo on 367.
4. Geeliglusteriseos sentrifugoidaan kolme kertaa 3000 g voimalla 5 minuutin ajan. Jokaisen fuugauskerran jälkeen otetaan supernatantista näyte talteen eppendorf-putkeen analysointia varten.

5. Lisätään 1. vasta-aine puskuriin sekoitettuna, vortexilla hajotetaan geeli tähän seokseen ja annetaan inkuboitua keinuvalla/pyörivällä alustalla huoneenlämmössä tunnin ajan. Lopuksi sentrifugointi 3000 g 5 min.  
*2 µl Anti-influenza B + 20 ml 1xPBS-puskuri*
6. Vasta-aineen pesu suoritetaan kolme kertaa 30 ml:lla 1xPBS-puskuria ja rinnakkaisille putkille kokeillaan erimittaisia pesuaikoja (5/10/20/30 minuuttia).
7. Lisätään 2. vasta-aine myöskin puskuriin sekoitettuna, vortexoidaan ja annetaan jälleen inkuboitua tunnin ajan. Lopuksi sentrifugointi 3000 g 5 min.  
*2 µl Goat Anti-Mouse IgG + 20 ml 1xPBS-puskuri*
8. Pestään geeli kaksi kertaa 30 ml:lla 1xAP-detektiopuskuria ja kolmannella kerralla käytetään Glycine, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> puskuriliuosta. Rinnakkaisille geeleille testataan taas erimittaisia pesuaikoja.
9. Lopuksi lisätään värireagenssipilleri glysiiniliuokseen liuotettuna, jota pipetoidaan 5 ml/geeli.  
*5 mg p-NITROPHENYL PHOSPHATE + 20 ml Glycine, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> (neljä annosta)*

## Soolin ja geelin kuiva-ainepitoisuuden laskeminen

Laskuesimerkkinä on R40 soolista valmistettu geeli.

PERUSTIEDOT			
	c (mol/L)	M (g/mol)	ρ (g/l)
TEOS (98 m%)	4,3889	208,3316	933
H <sub>2</sub> O	55,5062	18,016	1000

SOOLI		
	ml	
V(total)	100	
R-arvo	40	
HCl (0.1 M)	10	

neutraloituminen



GEELI-RESEPTI		
	ml	L
Sooli (0.01M)	5	0,005
NaOH (0.1M)	0,6	
lysaatti tms.	0,5	

LASKURIT		
Soolin valmistus		
V(teos)	24,02233	ml
V(H <sub>2</sub> O)	65,97767	ml
V (HCl)	10	ml
TOTAL	100	ml
c (teos soolissa)	1,054308	mol/L
n (teos soolissa)	0,005272	mol
c (H <sub>2</sub> O soolissa)	42,17233	mol/L
n (H <sub>2</sub> O soolissa)	0,210862	mol
n (H <sub>2</sub> O geelissä)	0,271918	mol

**R-geeli 51,58**

HAJOTUS H <sub>2</sub> O			
10 ml	0,826981	R	156,88
20 ml	1,382043	R	262,17
30 ml	1,937105	R	367,46

↑veden mooliosuus



$$V_{TEOS} = \frac{V_{TOTAL}}{\left(\frac{R_{SOOLI} * c_{TEOS}}{c_{H2O}} + 1\right)}$$

$$c_{TEOS \text{ soolissa}} = \frac{c_{TEOS} * V_{TEOS}}{V_{TOTAL}}$$

$$n_{TEOS \text{ soolissa}} = c_{TEOS \text{ soolissa}} * V_{geeli \text{ reseptissä}}$$

$$c_{H2O \text{ soolissa}} = \frac{c_{H2O} * (V_{H2O} + V_{HCl})}{V_{TOTAL}}$$

$$n_{H2O \text{ soolissa}} = c_{H2O \text{ soolissa}} * V_{geeli \text{ reseptissä}}$$

$$n_{H2O \text{ geelissä}} = n_{H2O \text{ soolissa}} + \frac{m_{NaOH} + m_{lysaatti}}{M_{H2O}}$$

$$R_{geeli} = \frac{n_{H2O \text{ geelissä}}}{n_{TEOS \text{ soolissa}}}$$

## Esimerkki soolin valmistuksesta ja työssä käytetyt soolit

Päivämäärä	30.03.2016
R-arvo	15
Tilavuus	100 ml

Sisälämpötila	23,1 °C
Ilmankosteus	37 %

Reagenssitiedot	
TEOS	98% Aldrich Chemistry lot#WXBB5318V
H <sub>2</sub> O	Milli-Q
HCl	0.1 M suolahappoliuos

Reagenssien määrät	EtOH
TEOS	45,74 ml
H <sub>2</sub> O	44,26 ml
HCl	10,00 ml

Työvaihe	Erä 1		Erä 2	
	Aika	Lämpötila	Aika	Lämpötila
Sekoitus aloitettu (1250 RPM)	00:00	22,9		
TEOS lisäys aloitettu	02:20	23,2		
TEOS lisäys päättyi	10:56	30,3		
Sooli kirkastui	19:00	38,7		
Maksimi lämpötila	18:41	38,7		
Sekoitus lopetettu	30:00	29,4		

Muuta huomioitavaa

Implanttimateriaalin neutralointi

- ➔ lisätään 10 ml 0.1 M NaOH liuosta
- ➔ 1 ml kerrallaan, sekoitus 1250 RPM
- ➔ lopetetaan sekoitus, valetaan 24-kuoppalevyille

Työssä käytetyt soolit						
R-arvo	V <sub>TOTAL</sub>	V <sub>TEOS</sub>	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	V <sub>HCl</sub>	R <sub>GEELI</sub>	m <sub>SiO<sub>2</sub></sub>
n <sub>VESI</sub> /n <sub>TEOS</sub>	ml	ml	ml	ml	n <sub>VESI</sub> /n <sub>TEOS</sub>	g
15	100	45,74	44,26	10,00	21,08	0,60322
30	100	29,66	60,34	10,00	39,38	0,39095
50	100	20,19	69,81	10,00	63,78	0,26621
70	100	15,30	74,70	10,00	88,18	0,20178

(V<sub>TOTAL</sub> = 5,1 ml)

## Aikaerotteisen fluoresoivan vasta-ainemäärityksen ohje



OHJE 29 Influenza B Assay\_vers1.2\_20140403\_KSj

### Influenza B assay (96 well format)

- Reagents and materials
  - Coated microtitration strips 0,25 µg/well B2 Mab (koutattu itse)
  - PerkinElmer 25x wash concentrate dilute (40 ml to 1 litre >> 80ml to 2litre)
  - PerkinElmer Multibuffer "MB" assay buffer
  - Tracer antibody (anti – InfB-Eu B2, 1:1000 dilution to Multibuffer)
  - PerkinElmer Enhancer solution "ES"
  - Positive control sample
- Make **1:100** dilution of **positive control** with Assay Multibuffer MB.
- Make 1:10-200 dilution of your **samples 1:100** with Assay Multibuffer MB.
- Use Assay Multibuffer MB as **negative control** (or X-33 lysate)
- Aspirate and discard the liquid from the wells (ime neste pois)
- Wash the strips **2 times** with plate washer or multi-channel pipet (fill the wells up to top approx. 350 µl (2x175µl per fill))
- Tap the plate dry before next step
- Add **100 µl of the dilutions** to plate single/**replicate** wells according to plate map
- **Add 50 µl of the Tracer antibody** dilution to the wells
- Cover wells with tape or sealing film
- Incubate at **+37 °C for 1 h** (± 10 min) or 90 min at RT
- Wash the strips **8 times** with plate washer (2 x + 6 x tai 4 x + 4 x) or multi-channel pipet (fill the wells up to top approx. 350 µl)
- Add **150 µl Enhancer solution ES** to wells
- Mix with plate shaker 30s - 1 min
- Measure the plate in with VICTOR multi label counter, Wallac TRF/Eu –protocol or **Hidex Sense multi label counter TRF/Eu –protocol.**

pvmnimiallekirjoitusLaatija: 20140403Kaj Sjöblom

\_\_\_\_\_

Hyväksyjä: 20140403Jarno Pusa

\_\_\_\_\_

## TRFIA – kuoppalevyjen päällystysohje

1) *Saturointi- ja laimennuskantaliuos 50 mM TRIS pH 7.75*

30.3 g TRIS Base

45 g NaCl

Lisää suodatettua vettä niin paljon että liuosta on 4.5 litraa

Säädä pH-mittarilla, 5 M HCl tarvitaan noin 35 ml

Lisää 2.5 g NaN<sub>3</sub> (tai 10 ml 25 % NaN<sub>3</sub> liuosta)

Lisää vettä kunnes lopputilavuus on 5 litraa

Sekoita

Suodatetaan (Bottle Filter 0.45 µM Nalgene)

Jaetaan 1000 ml:n eriin

Säilytys kylmälaboratoriossa (huone 215).

OHJE 5 litraan  
tee vain  
7L3) *Saturointiliuos*

Saturointikantaliuos (liuos 1)

0.1 % gelatiinia

Punnitse 1 g gelatiinia punnitusastiaan

Lisää gelatiini 1 litraan saturointikantaliuosta (liuos 1) pulloon. Ravistele voimakkaasti.

Lämmitä liuosta +56°C-vesihauteessa, kunnes gelatiini on sulanut

Säilytys kylmälaboratoriossa (huone 215). Lämmitetään ennen käyttöä +38 - +56°C vesihauteessa, tai yön yli huoneenlämmössä.

9.50 mM  
Karbonaattipuskuri pH 9.6

8 g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

14.5 g

NAHCO<sub>3</sub>

1 g

NaN<sub>3</sub>

Ad 5000 ml

Aqua

OHJE 5L  
tee vain 7L

Mittaa pH.

Jaa 1000 ml:n pulloihin.

Säilytys huoneenlämmössä.

## 10) Kuoppalevynauhojen päällystys

Päällystys suoritetaan karbonaattipuskuriin pH 9.6 240 µl/k laimennetuilla monoklonaalisilla vasta-aineilla. Käytetyt konsentraatiot erillisinä tiedostoina työpisteessä.

$$\frac{X \text{ kuoppaa} \times \text{haluttu päällystyspitoisuus } \mu\text{g/ml}}{\text{MCAb pitoisuus mg/ml}} = y \mu\text{l}$$

Esim. kun levyjä on 8, niin päällystykseen tarvittava monoklonaalisen vasta-aineen määrä on: Kuoppien määrä: lasketaan kuin levyssä olisi 100 kuoppaa (K = kuoppa):

$$\frac{800 K \times 0.1 \mu\text{g} / K}{\text{MCAb } 1 \text{ mg/ml}} = 80 \mu\text{l}$$

0.05 µg/kuoppa

1. Päällystys 240 µl/k. Peitä levyt kannella.
2. Yön yli inkubaatio huoneenlämmössä
3. Pesu 2 x TR-FIA-pesuliuksella.
4. Lisätään gelatiinia sisältävää saturointiliuosta (liuos 3) 250 µl/k (=kuoppien saturointi)
5. Peitä teipillä
6. Yön yli inkubaatio +5 ± 3°C:ssa
7. Säilytys +5 ± 3°C:ssa saturointiliuksessa tiiviisti teipillä päällystettynä.

(Turun Yliopisto, Virusoppi, Diagnostisen palvelutoiminnan laatukäsikirja. Antigeeniosoit-  
tus. Voimassa alkaen 26.02.2013)

## Geelin sisältämän silikan (SiO<sub>2</sub>) määrän laskeminen

Esimerkkinä R30 soolista valmistettu geeli.

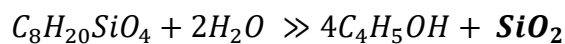
$$\left\{ \begin{array}{l} V_{TOTAL} = 100 \text{ ml} \\ V_{TEOS} = 29,65 \text{ ml} \\ V_{H_2O} = 60,35 \text{ ml} \\ V_{HCl} = 10,00 \text{ ml} \\ R_{SOOLI} = 30 \end{array} \right.$$

5 ml R30 0.01 M + 0,6 ml NaOH 0.1 M + 0,5 ml lyaatti

$$\left\{ \begin{array}{l} R_{GEEI} = 39,38 \\ \mathbf{n_{TEOS} = 0,006506 \text{ mol}} \\ n_{H_2O} = 0,256296 \text{ mol} \end{array} \right.$$

$$c_{TEOS} = \frac{c_{TEOS} * V_{TEOS}}{V_{TOTAL}} = \frac{4,389 \text{ mol/l} \times 0,02965 \text{ l}}{0,1 \text{ l}} = 1,3013 \text{ mol/l}$$

$$\rightarrow 5 \text{ ml soolia} = 0,005 \text{ l} \times 1,3013 \text{ mol/l} = \mathbf{0,006506 \text{ mol}} = n_{TEOS}$$



Silikan määrä käytetyssä geelissä

$$\begin{aligned} m_{SiO_2} &= 0,006506 \text{ mol} \times 60,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (M_{SiO_2}) \\ &= \mathbf{0,39095 \text{ g}} = \mathbf{390\,950 \mu\text{g}} \end{aligned}$$

In-sink saturaatoraja liuotuksessa 26-30 μg/ml

$$\rightarrow \frac{390\,950 \mu\text{g}}{26 \mu\text{g/ml}} \approx 15\,034 \text{ ml}$$

TRIS-puskuria tarvitaan liuotukseen yli 15 litraa.

## Esimerkki partikkelikokojakauman mittaustuloksista

