

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikka

Maija Lähteenmäki

***Saccharomyces cerevisiae* -hiivan solunsisäisen pH:n määrittäminen
fluoresenssimikroskoopilla**

Insinööri työ 3.5.2010

Ohjaaja: erikoistutkija Juha-Pekka Pitkänen
Ohjaava opettaja: yliopettaja Heikki Ojamo

Tekijä	Maija Lähtenmäki
Otsikko	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -hiivan solunsisäisen pH:n määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla
Sivumäärä	81 sivua
Aika	3.5.2010
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja	erikoistutkija Juha-Pekka Pitkänen
Ohjaava opettaja	yliopettaja Heikki Ojamo
<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> -hiiva on yksi käytetyimmistä malliorganismeista eukariotissa solusysteemeissä. Määrittämällä solujen sisäistä pH:a (pH_i) reaaliaikaisesti, voitaisiin päästä optimaalisempaan metabolisten yhdisteiden tuotto-olosuhteisiin. Työn tavoitteena oli kehittää ja testata <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -hiivan solunsisäisen pH:n mittaumenetelmä fluoresenssimikroskoopilla. Työn suoritus perustui suurelta osin Vallin ym. tekemään tutkimukseen (Intracellular pH distribution in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cell populations, analysed by flow cytometry). Työn kokeellinen osa suoritettiin Valtion teknillisessä tutkimuskeskuksessa.</p> <p>Solunsisäisen pH:n määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla mahdollistaisi nopean ja kohtuullisen halvan analyysin. Määrittämistä varten solut täytyy leimata fluoresoivalla värillä. Hiivasolujen solunsisäistä pH:ta pyrittiin määrittämään kahdella erilaisella fluoresenssin leimausmenetelmällä. Fluoresoivana leimamolekyylinä toimi joko soluihin siirrostettu mutatoitu E²GFP-proteiini (Green Fluorescent Protein) tai fluoresoiva SNARF-4F-väri, jolla solut värjättiin kasvatuksen jälkeen.</p> <p>E²GFP-proteiinille on tyypillistä kaksihuippuinen eksitaatio- ja emissioikäyrä. Määrittämällä näytteiden eksitaatiohuippujen intensiteetit voitiin intensiteettien suhteesta määrittää pH_i ratiometrisesti, ilman että fluoresoivien proteiinien määrä vaikutti tuloksiin. Fluoresoiva SNARF-4F-väri sisältää esterin, joka hydrolysoituu solun sisällä solunsisäisen esteraasin vaikutuksesta aktiiviseen muotoonsa, protonisensitiiviseksi polyanioniksi, joka on fluoresoiva. SNARF-4F-värillä on kaksihuippuinen emissiospektri, jolloin tuloksista saadaan ratiometrisiä.</p> <p>Tutkimuksessa ei saatu aikaiseksi fluoresenssimikroskoopilla analysoituna yhtä hyvin sovittuvaa kalibrointikäyrää kuin Vallin ym. tutkimuksessa, kummallakaan fluoresenssin leimausmenetelmällä. SNARF-4F-leimattujen koesarjojen solut saatiin vastaamaan virtausytometrillä analysoituna melko hyvin Vallin ym. tutkimuksen tuloksia. E²GFP-leimatut solut saatiin vastaamaan fluoresenssispektroskoopilla analysoituna kohtalaisesti NMR:llä määritettyjen solujen tuloksia.</p> <p>Yleisesti ottaen fluoresenssimikroskooppi ei todennäköisesti ole riittävän tarkka menetelmä määrittämään hiivasolujen pH_i:tä. Fluoresenssimikroskoopilla analysoitujen solujen määrä jää liian pieneksi, ja kuvien analysointi teettää ainakin toistaiseksi liian paljon töitä, jotta reaaliaikainen määrittäminen olisi mahdollista.</p>	
Hakusanat	solunsisäinen pH, pH_i , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SNARF-4F, E ² GFP, fluoresenssimikroskopia

Author Title	Maija Lähteenmäki Intracellular pH determination of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> with a fluorescence microscope
Number of Pages Date	81 3 May 2010
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor Supervisor	Juha-Pekka Pitkänen, Senior Research Scientist, D.Sc.(tech.) Heikki Ojamo, Principal Lecturer
<p>The aim of this final year project was to develop and test a method to measure the intracellular pH (pH_i) of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast by analyzing it with a fluorescence microscope. By determining the pH_i of yeast in real-time it might be possible to create more accurate conditions to produce metabolic products. The study was carried out in Technical Research Centre of Finland (VTT). The analysis was based on a study performed by Valli et al. in 2005 (Intracellular pH distribution in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cell populations, analysed by flow cytometry).</p> <p>The determination of the yeast pH_i with a fluorescence microscope could enable a cheaper and faster way to analyze the pH_i. To analyze pH_i, the cells have to be marked with a fluorescent probe. In this research, two different kinds of fluorescent probes were used: SNARF-4F-dye, which was transferred to the cells after cultivation, and E^2GFP-protein (Green Fluorescent Protein), which was genetically introduced to the cells before cultivation.</p> <p>SNARF-4F is a fluorescent pH probe. Only the non-fluorescent ester of dyes can permeate the cell membrane. Once inside the cell, the ester hydrolyzes, which is caused by intracellular esterases, and releases the proton-sensitive polyanionic probe, which is fluorescent. SNARF-4F-dye has pH-dependent emission spectra; its two emission signals at two different wavelengths allow a ratiometric pH calculation. It is typical for E^2GFP to have two excitation and emission peaks. Determining the intensity of the samples' excitation peaks enables ratiometric pH calculation.</p> <p>In this project, the calibration curves were not as accurate as those of Valli et al., neither with SNARF-4F dye nor with the E^2GFP-protein. The results for the SNARF-4F test series cells, which were analyzed by flow cytometer, correspond quite well with those obtained by Valli et al. Furthermore, the results of E^2GFP-cells, which were analyzed by fluorescence spectroscopy, correspond quite well with the results determined by NMR.</p> <p>In general, the fluorescence microscope is probably not accurate enough to determine the pH_i of yeast cells. When the intracellular pH is analyzed by using a fluorescence microscope, the number of the analyzed cells remains too low. In addition, the analysis of the pictures takes too much time, rendering real time measurement impossible.</p>	
Keywords	intracellular pH, pH_i , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SNARF-4F, E^2GFP , fluorescence microscope

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Johdanto 7

TEORIAOSA

1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -hiiva	8
2	Solunsisäisen pH:n fysiologinen merkitys.....	9
3	Fluoresenssiin perustuvat menetelmät	10
3.1	Fluoresenssin periaate.....	10
3.2	Fluoresenssin resonanssienergian siirto.....	11
3.3	Fluoresoivat leimat.....	12
3.3.1	GFP ja fluoresoivat proteiinit	12
3.3.2	Fluoresoivat väriaineet	13
3.4	Fluoresenssin mittaus.....	15
3.4.1	Virtaussytometri (FACS).....	15
3.4.2	Fluoresenssimikroskopia	18
3.4.3	Konfokaalimikroskopia	22
3.4.4	Fluoresenssispektroskopia.....	23
4	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia	23

KOKEELLINEN OSUUS

5	Työn tavoitteet	26
6	Materiaalit ja menetelmät.....	30
6.1	Laitteet	30
6.2	Liukset.....	30

6.2.1	YNB-kasvatusliuos.....	30
6.2.2	SNARF-4F-kantaliuos.....	30
6.2.3	Amphotericin B-kantaliuos.....	31
6.2.4	McIlvaine-pH-puskurit.....	31
6.2.5	Maitohappoliuos.....	31
6.3	Kantojen kasvatusta.....	32
6.4	Kantojen ravistelupullokasvatusta.....	32
6.5	Näytteiden valmistusta.....	33
6.5.1	Solujen värjäys fluoresoivalla SNARF-4F-värillä.....	33
6.5.2	Solunäytteiden valmistus kalibrointikäyrän määrittämiseksi.....	33
6.5.3	Vallin ym. tutkimuksen mukaisten puskurikokeiden valmistus.....	33
6.5.4	Koesarjan näytteiden valmistus.....	34
6.6	Näytteiden kuvaaminen fluoresenssimikroskoopilla.....	35
6.7	Fluoresenssimikroskooppikuvien analysointi signaalinkäsittelyohjelmalla.....	35
6.8	Luottamusvälien laskeminen standardin ISO 8466-2:2001(E) mukaisesti matriisikaavoilla.....	40
7	Tulokset.....	44
7.1	SNARF-4F-värillä värjätyt hiivasolut.....	44
7.1.1	SNARF-4F-värin spektrien määrittäminen.....	44
7.1.2	Kalibrointikäyrän määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla.....	46
7.1.3	Kalibrointikäyrän määrittäminen virtausytometrillä.....	49
7.1.4	Ulkoisen pH:n vaikutus pH_i -arvoon.....	51
7.2	E^2 GFP-hiivasolut.....	54
7.2.1	E^2 GFP-solujen spektrien määrittäminen.....	54
7.2.2	Kalibrointikäyrän määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla.....	55
7.3	pH_i :n määrittäminen koesarjasta eri analyysimenetelmillä: SNARF-4F-värjätyt ja E^2 GFP-solut.....	60
8	Yhteenveto.....	65

Lähteet.....	68
--------------	----

Liitteet

Liite 1: SNARF-4F-värjättyjen solujen spektrit eri pHi:n arvoilla.	71
Liite 2: SNARF-4F-värjättyjen solujen intensiteetit eksitaatio- ja emissioaallonpituuden funktiona.	72
Liite 3: E ² GFP-solujen spektrit.	73
Liite 4: E ² GFP-solujen intensiteetit eksitaatio- ja emissioaallonpituuden funktiona.....	74
Liite 5: SNARF-4F-värjättyjen solujen virtausytometrin tulokset (eks. 488 nm sekä em. 578 nm (PE-A) ja 785 nm (PE-Cy7-A)).	75
Liite 6: E ² GFP-solujen virtausytometrin tulokset, eks. 488 nm, em. 519 nm (FITC-A).	76
Liite 7: Esimerkki luottamusvälien laskemisesta.....	77

Johdanto

Saccharomyces cerevisiae -hiiva on yksi eniten käytetyistä malliorganismeista eukariotisten solujen tutkimuksessa, ja se on tieteellisesti lähes yhtä suosittu kuin prokariootti-bakteeri *Escherichia coli*. Kehittämällä menetelmä, jolla voitaisiin määrittää solunsisäistä pH:ta ja seurata sen muutoksia reaaliaikaisesti, voitaisiin muun muassa päästä entistä parempiin tuotto-olosuhteisiin bioreaktorikasvatuksissa. [1, s. 8.]

Työn tavoitteena oli *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan solunsisäisen pH:n (pH_i) mittausmenetelmän kehitys ja testaus fluoresenssimikroskoopilla. Menetelmän kehityksen tarkoituksena oli saada yksittäisten hiivasolujen solunsisäisen pH:n mittaus automatisoitua bioreaktoreihin tai kuoppalevykasvatuksiin niin, että soluihin olisi kytkettyä fluoresoiva leimamolekyylä. pH_i :n määrittämisestä on tehty useita erilaisia tutkimuksia, joissa sitä on pyritty mittaamaan mm. virtaussytometrillä [2] sekä NMR:llä.

Saccharomyces cerevisiae -hiivasolujen pH_i :ta pyrittiin määrittämään fluoresenssimikroskoopilla kahdella erilaisella fluoresenssin leimausmenetelmällä. Fluoresoivana leimamolekyylinä toimi joko solujen heterologisesti tuottama mutatoitu E²GFP-proteiini (Green Fluorescent Protein) tai fluoresoiva SNARF-4F-väri, jolla solut värjättiin näytteenoton jälkeen.

Työn kokeellinen osa suoritettiin Valtion teknillisessä tutkimuskeskuksessa (VTT). VTT on Pohjois-Euroopan suurin tutkimusorganisaatio, joka tekee soveltavaa tutkimusta. VTT suorittaa teknologia- ja tutkimuspalveluja niin kotimaisille kuin kansainvälisillekin asiakkaille. VTT on osa Suomen innovaatiojärjestelmää ja kuuluu työ- ja elinkeinoministeriön hallinnonalaan. VTT ei tavoittele toiminnassaan taloudellista voittoa. [3.] Työ oli osa Suomen Akatemian professori Merja Penttilälle myöntämän Valkoisen Biotekniikan, Vihreän Kemian Huippuyksikön työkalutiimin tutkimusprojektia.

TEORIAOSA

1 *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva

Hiivat muodostavat tärkeän ryhmän teollisuuden mikro-organismeista. Niiden käyttö yli sadan vuoden ajan elintarviketeollisuudessa on johtanut hiivojen lukuisiin erilaisiin tutkimuksiin, jotta niiden elinkykyisyyttä ja erilaisia solunsisäisiä olosuhteita kyettäisiin ymmärtämään paremmin. *Saccharomyces cerevisiae*n genomi sisältää yli 6000 geeniä 16:ssa eri kromosomissa. Luonnossa *S. cerevisiaella* on polyploidinen kromosomisto, mutta laboratoriossa tehtävissä geneettisissä tutkimuksissa on kanta yleensä parempi pitää haploidisena, jolloin hiivasoluilla on vain yksinkertainen kromosomisto. [1, s. 8.]

S. cerevisiae -hiivan käytön suosioon on monia syitä. Eräs syy hiivan suosioon perustuu siihen, että se oli todennäköisesti ensimmäisiä ihmisen hyödyntämiä organismeja (mm. kotitaloudessa), vaikka sen hyödyntäminen ei ollut tietoista. Tällöin hiivaa käytettiin esimerkiksi juomien kuten oluen ja viinin valmistuksessa etanolin tuotantoon ja leivonnassa hiilidioksidin tuottoon. [1, s. 8.]

Nykypäivänä hiivaa kasvatetaan hiivasolujen tuottoon muun muassa leivinhivaksi ja lopputuotteiden kuten etanolin tuotamiseksi. Leivinhivaa hyödynnetään leivonnassa, jossa hiiva tuottaa leipään hiilidioksidia ja alkoholia, jotka tuovat leipään makua ja tilavuutta. [4, s. 984–985.] *Saccharomyces cerevisiaea* käytetään maailmanlaajuisesti myös teollisen etanolin tuotantoon, koska hiiva kykenee tuottamaan etanolia korkeita pitoisuuksia ja koska hiivalla on korkea etanoli-toleranssi. [5.] Vaikka hiivaa on hyödynnetty jo kauan aikaa, kaikkia hiivan fysiologisia rajoitteita mm. etanolin tuotantoon ei kuitenkaan täysin tunneta. Identifioimalla nämä rajoitteet voitaisiin päästä muun muassa nopeampaan ja kustannustehokkaampaan etanolin tuotantoon. [6.]

Aikojen saatossa *S. cerevisiae* hiivaan on kerääntynyt ominaisuuksia, jotka mahdollistavat sen laajan käytön fermentoinneissa. *S. cerevisiae*n hyviin ominaisuuksiin kuuluu mm. sen hyvä sietokyky melko ankariakin ympäristön olosuhteita, kuten korkeita etanoli-, happo- ja suolapitoisuuksia, vastaan. Hiivasolut pystyvät sopeutumaan ympäristön osmoottisiin paine- tai lämpötilavaihteluihin. Hiivasoluilla on verrattaessa muihin eukarioottisoluihin lyhyempi elinkaari ja niiden elintoimintoja on useita muita

eukariotisoluja halvempi ja helpompi ylläpitää. Yksisoluiset hiivat ovat myös hyvä vaihtoehto yksisoluisien lajien perustoimintojen (mm. aineenvaihdunnan) tutkimiseen. *S. cerevisiae* -hiivasoluilla on siis monia hyviä ominaisuuksia, minkä takia niistä on tullut suosittuja tuotanto-organismeja biopohjaisten tuotteiden aikaansaamisessa. [1, s. 9.]

2 Solunsisäisen pH:n fysiologinen merkitys

pH vaikuttaa moniin prosesseihin solun aineenvaihdunnassa. Sitä pidetäänkin yhtenä tärkeimmistä hiivan fysiologiaan vaikuttavista tekijöistä. pH:n muutokset vaikuttavat esimerkiksi solun entsyymien kinetiikkaan. pH:n vaikutus entsyymien kinetiikkaan voi olla suoraa, jolloin protoni toimii reaktiossa substraattina tai tuotteena. Epäsuorasti pH vaikuttaa entsyymikinetiikkaan muuttamalla substraatin ionisoitumisastetta ja substraatin sitoutumista aktiiviseen keskukseen. Tällöin entsyymien aktiivisen keskuksen aminohapon ionisoitumisaste vaihtuu tai entsyymien proteiiniomuoto muuttuu. Muutokset entsyymien aktiivisuuksissa johtavat lopulta aineenvaihduntareittien muutoksiin, mikä voi muuttaa koko prosessin kulkua. Tämän vuoksi epätarkka oletus solunsisäisestä pH:sta saattaa johtaa aineenvaihduntamallin epätarkkuuteen. [7.]

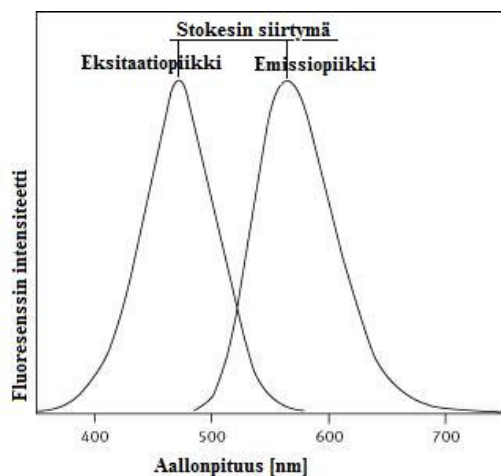
Kaikilla soluilla on mekanismi poistaa H^+ -ioneja, jotta solut pystyisivät säilyttämään optimaalisen pH_i :n sytoplasmisten reaktioiden kannalta [8.] Solunsisäinen pH on solun sytosolisessa tilassa yleensä pH-alueella 6,8 – 7,4. Solunsisäisen pH:n vaihtelu solussa on keskimäärin hyvin pientä ja muutokset tapahtuvat yleensä melko hitaasti. [9.]

Solunsisäisen pH:n mittaaminen ja tieto sen käyttäytymisestä ovat hyödyksi monissa metabolisten yhdisteiden tuottoprosesseissa, kuten etanolin tuotossa ja orgaanisten happojen tuotossa (mm. maitohappo). Myös glykolyysin aineenvaihduntareaktiot laskevat pH_i :ta. Määrittämällä reaaliaikaista pH_i :ta voitaisiin siis päästä parempiin tuotto-olosuhteisiin, sillä näin kyettäisiin toimimaan lähempänä ääriarvoja ja täten pystyttäisiin nostamaan myös tuotantoa. Jotta tietoa elävistä soluista voitaisiin lisätä, on siis tärkeää löytää keino mitata elävien solujen pH_i . [10.]

3 Fluoresenssiin perustuvat menetelmät

3.1 Fluoresenssin periaate

Fluoresenssi on atomien tai molekyylien ominaisuus absorboida niihin kohdistettua eksitaatiovaloa (fotoneja) tietyllä aallonpituudella ja pienen ajanhetken kuluttua (fluoresenssin elinaika) emittoida eli säteillä matalaenergisempi fotoni pidemmällä aallonpituudella. Fluoresoivat molekyylit voivat absorboida vain valon tiettyjä aallonpituuksia eli absorptiotaajuuksia. Myös fluoresenssin emissio ilmenee vain tietyillä aallonpituuksilla, emissioaallonpituudet ovat vain eksitaatio-aallonpituuksia suurempia. Tämä johtuu siitä, että molekyyli menettää energiaansa absorboinnin aikana ympäristöön eikä siten emittoi yhtä pienillä (korkea energisillä) aallonpituuksilla (kuva 1). Tätä ilmiötä kutsutaan Stokesin siirtymäksi (Stoke's shift). Stokesin siirtymä mahdollistaa emittoituneiden foneiden erottamisen suuresta eksitaatiofotoneiden joukosta. [11, s. 1-2, 5; 12.]



Kuva 1. Tyypillinen fluorokromin eksitaatio- ja emissiospektri ja Stokesin siirtymä [11, s. 5, muokattu.]

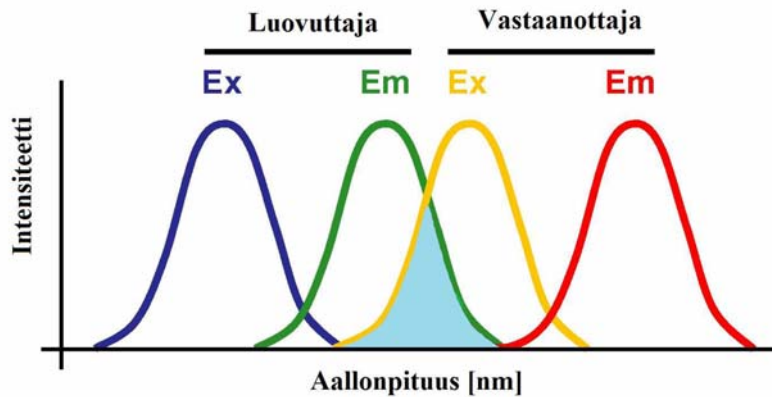
Fluoresenssin eksitaatio- ja emissiospektrit ovat kullekin molekyyllille ominaisia, riippuen mm. molekyylin rakenteesta. Koska erilaisilla molekyyyleillä on erilaiset eksitaatio- ja emissiospektrit, voidaan niiden avulla tunnistaa kompleksisista seoksista erilaisia molekyyylejä. Fluoresenssimittauksilla voidaan myös havaita hyvin nopeita kemiallisia ja molekulaarisia muutoksia. Fluorokromit on suunniteltu niin, että niillä voidaan mitata erilaisia ympäristötekijöitä kuten pH_i:ta ja viskositeettia. Fluoresoivilla

molekyyleillä on kaksi ominaisspektriä. Ensimmäinen on eksitaatiospektri, jossa mitataan valon absorptiota tietyllä aallonpituusalueella, sekä emissiospektri, joka saadaan mittaamalla valon emittoitumista tietyllä aallonpituusalueella. [11, s. 15–16.]

Molekyylin ominaisuus fluoresoida voi olla luonnollista, tai fluoresoiva ominaisuus on voitu siirtää molekyyliin. Autofluoresoivilla molekyyleillä tarkoitetaan molekyylejä, jotka kykenevät fluoresoimaan luonnollisesti, ilman ulkopuolisia molekyylejä. Autofluoresenssi johtuu nisäkässoluilla useimmiten niiden tuottamista kofaktoreista (FAD ja FMN), joilla esiintyy absorptiota/emissiota aallonpituuksilla 450/515 nm. Myös NADH saattaa aiheuttaa autofluoresenssiä, sillä sen eksitaatioalue on välillä 360–400 nm eli alueella, jolla fluoresoiva GFP-proteiini myös usein eksitoidaan. Autofluoresenssi saattaa myös nousta kasvatuksen edetessä. Sekundääri fluoresenssilla tarkoitetaan molekyylejä, joka on käsitelty ulkopuolisella fluoresoivalla proteiinilla tai väriaineella ja joka on sen tähden fluoresoiva. Sekundääri fluoresenssimittauksissa täytyy kuitenkin usein ottaa myös autofluoresenssi huomioon, sillä se häiritsee usein mittauksia aiheuttaen ylimääräistä taustaa. [11, s. 68.]

3.2 Fluoresenssin resonanssienergian siirto

Fluoresenssin resonanssienergian siirrolla (FRET) tarkoitetaan ilmiötä, jossa virittyneen luovuttajafluorokromin fotonin nostaa perustilassa olevan vastaanottajafluorokromin korkeammalle värähdystasolle. Tällöin luovuttajafluorokromin energiatila palaa suoraan perustilaan, emittoimatta fotoneja. Lyhyesti sanottuna FRET-ilmiöllä tarkoitetaan siis fluorokromin emission muuttumista toisen fluorokromin eksitaatioksi. FRET-ilmiö mahdollistuu, kun luovuttajafluorokromin emissiospektri on päällekkäinen vastaanottajafluorokromin eksitaatiospektrin kanssa (kuva 2, vaaleansininen alue). [13.]



Kuva 2. FRET-ilmiö [8, s. 13, muokattu.]

Mikroskopoinnissa kyseinen FRET-ilmiö saattaa muodostua ongelmaksi, sillä jos ensimmäisen fluoresoivan fluorokromin fotonien energia menee suoraan seuraavalle fluorokromille, ensimmäisen fluorokromin emissiospektri jää suurimmaksi osaksi havaitsematta, jolloin tulokset vääristyvät.

3.3 Fluoresoivat leimat

3.3.1 GFP ja fluoresoivat proteiinit

Etsittäessä soluvärjäystä tehokkaampia fluoresoivia leimausmenetelmiä pH_i :n määrittämiseksi ovat proteiinipohjaiset fluoresoivat pH-indikaattorit osoittautuneet varsin käyttökelpoisiksi. Näiden proteiinipohjaisten fluoresoivien pH-indikaattoreiden etuna on, että soluihin on valmiiksi ekspressoitu fluoresoiva molekyyli, jolloin niitä ei tarvitse enää erikseen värjätä fluoresenssin ilmenemiseksi. Tällöin säästytään mm. solujen permeabilisoinnilta, jolloin voitaisiin ainakin teoriassa päästä lähemmäksi solun tarkkaa luonnollista pH_i :tä. [8.]

GFP (Green Fluorescent Protein) eli vihreä fluoresoiva proteiini on luonnollisesti kehittynyt fluoresoiva proteiini, joka on ensimmäisenä eristetty *Aequorea victoria* - meduusialajista. GFP koostuu puhdistettuna 238 aminohaposta (27-kDa). GFP on proteiinilaskos, joka muodostuu β -säikeestä ja α -heliksistä. α -heliksi sisältää absorboivan ja valoa lähettävän molekyylin eli kromoforin, joka koostuu syklistä tripeptidistä (Ser-Tyr-Gly). Tämä erityinen kemiallinen ryhmä siis absorboi sinistä tai ultraviolettia valoa, joka hetken päästä lähetetään ulos vihreänä valona. [11, s. 64.]

GFP:tä on käytetty yleisesti geenien tuottamien proteiinien seurannassa ja molekyylibiologiassa ilmaisemaan geenien leimautumista. GFP on myös mahdollistanut solujen jakautumisen, soluelinten syntymisen ja kromosomien kahdentumisen seurannan. GFP:n kromoforin muodostuminen on geneettisesti koodattu, ja reaktio on spontaani prosessi fysiologisissa olosuhteissa, ilman spesifisiä kofaktoreita. Kromoforin muodostuminen vaatii kuitenkin molekulaarista happea. GFP saadaan ekspressoitua soluihin, kun GFP-molekyyli yhdistetään haluttuun proteiiniin. GFP:n käytössä tulee kuitenkin huomioida mm. solujen autofluoresenssi ja se että leimatut solut tarvitsevat aerobiset kasvuolosuhteet. [11, s. 68; 8.]

Ensimmäisiä ratiometrisiä mutatoituja GFP-muotoja oli *pHluorin*, jonka eksitaatio-spektri muuttui pH:n muutoksen myötä. Myöhemmin GFP:stä onnistuttiin kehittämän myös selkeällä pH-riippuvuudella oleva mutatoitu, fluoresoiva ja ratiometrinen indikaattorikanta (E^2 GFP), jolle oli tyypillistä kaksihuippuinen eksitaatio- ja emissioikäyrä. Näiden kahden piikin suhteesta voitiin määrittää pH_i ratiometrisesti, ilman että fluoresoivien proteiinien määrä vaikutti tuloksiin. [5.] GFP:n monien merkittävien ominaisuuksien ansiosta GFP:n löytäjä Osamu Shimomura sekä kehittäjät Martin Chalfie ja Roger Y. Tsien saivat kemian Nobelin palkinnon 2008, tunnustukseksi työstään GFP:n parissa. [14.]

3.3.2 Fluoresoivat väriaineet

Fluoresoivat pH-indikaattorit ovat nykypäivänä varteenotettava vaihtoehto määrittää solunsisäistä pH:ta. Osalla orgaanisista väriaineista on nimittäin pH-riippuvainen optinen käyttäytyminen, jolloin värin intensiteetti muuttuu pH_i :n muuttuessa. Fluoresoivien väriaineiden etuna on fluoresoiviin proteiineihin verrattuna se, että soluja ei tarvitse geenimuunnella, mikä on tärkeää esimerkiksi tuotanto-olosuhteissa. [2.]

Teollisuudessa ja tutkimuksissa on löydetty monia sovelluskohteita, joissa voidaan soveltaa väriaineiden kykyä muuttaa väriä pH_i :n muuttuessa. Kuitenkin vain fluoresoivat väriaineet voivat tarjota suuren tarkkuuden, jota tarvitaan pH_i :n optisissa mittauksissa elävän solun sisällä. Jotta kvantitatiivisia mittauksia voitaisiin tehdä, on tärkeää, että indikaattorin pK_a -arvo sopii koeolosuhteiden pH-alueelle. Indikaattoreita on erilaisia, sen mukaan missä pH-olosuhteissa niitä käytetään. Indikaattoreita on

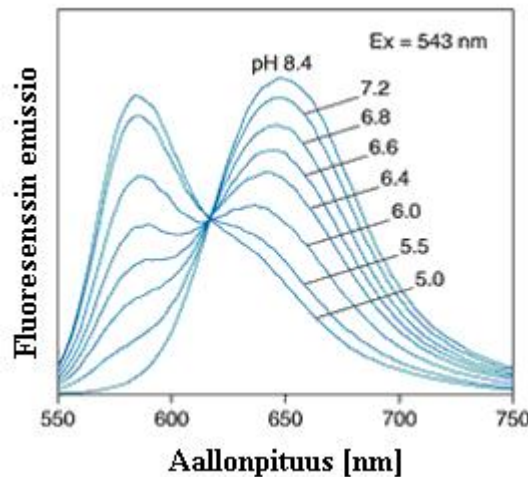
esimerkiksi tarjolla lähellä neutraalin pH:n olosuhteita sekä pH-indikaattoreita, jotka soveltuvat parhaiten happamiin olosuhteisiin. [9, s. 552.]

Väriaineiden ongelmana on yleensä niiden siirtäminen solun ulkoisesta tilasta solun sisälle. Tämä on ongelmallista siksi, että erilaisilla väriaineilla ja soluilla väriaineen kulkeutuminen soluun voi olla merkittävästi erilaista. Ongelmaksi muodostuu myös mm. SNARF-4F-väriaineella se, että siirtäminen solujen sisään vaatii solujen permeabilisointia eli solujen läpäisevyyden lisäämistä. Permeabilisoinnin ongelma on solun luonnollisten olosuhteiden muuttaminen, eli kun solun läpäisevyysominaisuuksia muutetaan, ei välttämättä voida olettaa, että solu tällöin pystyisi ylläpitämään luonnollisen pH_i:n. [8.]

3.3.2.1 SNARF-4F-fluoresoiva väriaine

SNARF-4F 5- ja 6-karboksyylihappo on fluoresoiva väriaine, joka muuttaa värinsä intensiteettiä (kirkkautta) pH_i:n muuttuessa. Värjätessä solut fluoresoivalla SNARF-4F-väriaineella reagenssin esteri saatetaan solun sisälle sytoplasmaan permeabilisoimalla solut. Solujen permeabilisointi toteutetaan yleisesti DMSO:lla (dimetyylisulfoksidi). SNARF-4F:n sisältämä esteri, joka ei ole fluoresoiva, pääsee näin solun sisään, jossa se hydrolysoituu solunsisäisen esteraasin vaikutuksesta aktiiviseen muotoonsa, protonisensitiiviseksi polyanioniksi. Syntynyt yhdiste on fluoresoiva, eikä se kykene enää läpäisemään solukalvoa, jolloin väri on saatu pysyvästi solun sisään. [9, s. 553.]

SNARF-4F-väriaineella saadaan aikaiseksi pH-riippuvainen emissiospektri. Kuvattaessa soluja erilaisilla emissioaallonpituussuodattimilla, eksitaatioaallonpituuden pysyessä vakiona, saadaan kaksi kääntäen verrannollista emissiohuippua (kuva 3). Tämä mahdollistaa ratiometrisen pH_i:n mittaamisen. Ratiometrinen mittaaminen mahdollistuu siksi, että näin pystytään laskemaan näytteen intensiteettien suhde kahdella eri emissioaallonpituudella, jolloin solujen erilainen fluorokromin konsentraatio ei vaikuta tuloksiin. [2.]



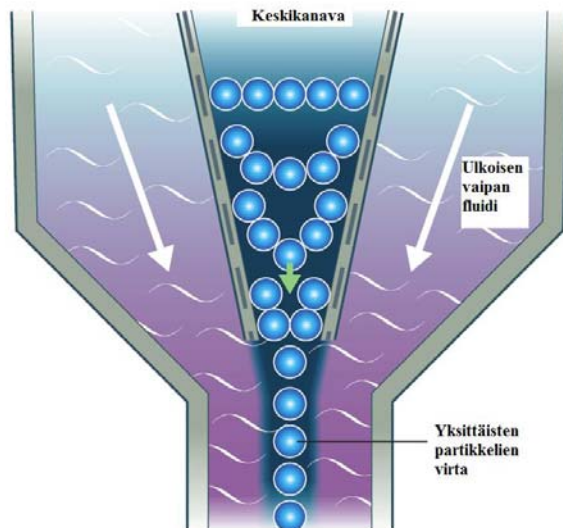
Kuva 3. SNARF-4F 5- ja 6-karboksyylihapon kaksi kääntäen verrannollista emissiosignaalia emissioaallonpituuksilla 580 nm ja 650 nm [15, muokattu.]

3.4 Fluoresenssin mittaus

3.4.1 Virtaussytometri (FACS)

Virtaussytometri on laite, jolla voidaan analysoida yksittäisiä partikkeleita. Lajittelevalla virtaussytometrillä voidaan lisäksi lajitella erilaisia partikkeleja erilleen. Virtaussytometria perustuu fluoresenssiin, jossa fluoresoivalla aineella merkityjä soluja säteilytetään lasersäteellä ja solun lähettämää emission voimakkuutta mitataan. Analysoitaessa haluttua näytettä se injektoidaan virtaussytometriin, jossa partikkelit hajaannutetaan erilleen, kolmidimensionaaliseen tilaan. Näyte täytyy järjestää yksittäisten partikkelien jonoon, jotta laitteen detektori pystyy analysoimaan kunkin partikkelin yksitellen. Tämä tapahtuu virtauskanavassa. [16, s. 4.]

Virtauskanava koostuu keskikanavasta, johon näyte injektoidaan, sekä ulkoisesta vaipasta. Keskikanavasta injektoitu näyte päätyy ulkoiseen vaippaan, jossa on nopeasti virtaava fluidi. Kun vaipan fluidi liikkuu, luo se massiivisen vetovoiman kapenevaan keskikanavaan. Tämä muuttaa keskikanavan nopeutta, jonka virtaus muuttuu paraboliseksi eli virtauksen keskellä on suurin nopeus ja seinämällä nopeus on nolla. Tämä mahdollistaa partikkelien yksittäisen virran, ja sitä kutsutaan hydrodyaamiseksi fokuoinniksi (kuva 4). Kun keskikanavan virtaus on laminaaria, sen virtaus ei sekoitu nopeasti virtaavan vaippavirtauksen kanssa. [16, s. 4.]



Kuva 4. Hydrodynaaminen fokusointi [16, muokattu.]

Hydrodynaamisen fokusoinnin jälkeen jokainen partikkeli menee yksitellen yhden tai useamman valosädekimpun lävitse. Valon sironnan tai fluoresenssin emission avulla (jos partikkeli on varustettu fluorokromilla) saadaan tietoa partikkelin ominaisuuksista. [16, s. 5.]

Laser on yleisimmin käytetty valonlähde virtaussytometrissä. Lasereilla pystytään tuottamaan valoa tarkasti halutuilla valon aallonpituuden alueilla. Valo, joka siroutuu kohteeseen nähden eteenpäin, useimmiten 20° :n kulmassa lasersäteen akselista, kerätään linsillä, jota kutsutaan suorasiironnan kanavaksi (forward scatter channel = FSC). Suorasirota on aksiaalisesti siroavaa valoa, ja se vastaa karkeasti partikkelikokoa. Suorasirotaa mittaamalla voidaan mitata solukokoja sekä sen avulla voidaan erottaa eläviä soluja solujätteistä. [16, s. 5.]

Valon mittaamista noin 90° :n kulmassa näytteeseen saapuvasta valosta eli eksitaatiolinjasta kutsutaan sivusironnaksi. Sivusirontakanava (side scatter channel = SSC) kerää tietoa partikkelien granuloiden sisällöstä. Sekä suorasirota että sivusirota ovat jokaiselle partikkelille yksilöllisiä, joten näiden kahden sironnan avulla voidaan erottaa erityyppisiä solutyyppejä toisistaan, heterogeenisestä näytteestä. [16, s. 5.]

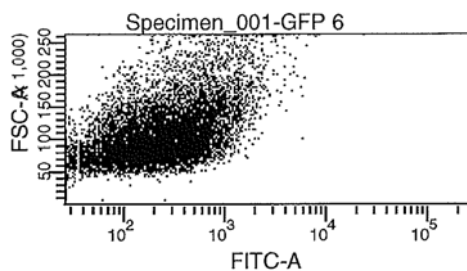
Mittaamalla fluoresenssia eri aallonpituuksilla voidaan luoda kvantitatiivista ja kvalitatiivista dataa fluorokromilla merkittyjen solupintojen reseptoreista tai solunsisäisistä molekyyleistä kuten DNA:sta. Virtaussytometri sisältää erillisiä

fluoresenssikanavia, jotka havaitsevat valon emittoitumista. Havainnot kerätään detektoreilla, joiden määrä virtausytometrissä vaihtelee laitteen ja valmistajan mukaan. Detektorit ovat joko piifotodiodeja tai valomonistinputkia (photomultiplier tube). Piifotodiodeja käytetään useimmiten eteenpäinsironnan mittaukseen, kun signaali on voimakas. Valomonistinputket ovat taas herkempiä, ja niitä käytetäänkin useimmiten sivusironnan ja fluoresenssin mittaamiseen. [16, s. 5.]

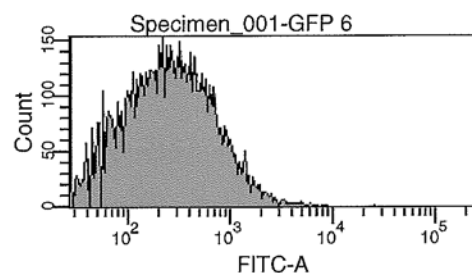
Jotta näytteestä pystyttäisiin havaitsemaan ja mittaamaan vain tiettyjä aallonpituuksia, optisten suodattimien ja peilien avulla voidaan valo keskittää halutulle aallonpituusvälille. Optiset suodattimet siis suodattavat tiettyjä aallonpituuksia ja transmittoivat eli läpäisevät toisia. Virtausytometriassa käytetään samoja suodatintyyppejä kuin fluoresenssimikroskoopissakin eli pitkän aallonpituusalueen suodatinta, lyhyen aallonpituusalueen suodatinta sekä kapean aallonpituusalueen suodatinta (ks. kohta 3.4.2). [16, s. 6.]

Kun molekyylistä emittoitunut valo saapuu fotodetektorille, havaitaan pieni sähkövirta. Havaitulla jännitteellä on amplitudi, joka on verrannollinen detektoriin saapuneiden valofotonien kokonaismäärään. Tämä jännite vahvistetaan lineaarisilla tai logaritmisilla vahvistimilla, jotta tulokset voidaan esittää graafisesti. [16, s. 6.]

Virtausytometrillä saadaan siis analysoitua jokainen solu yksi kerrallaan. Tulosteiksi voidaan saada esimerkiksi kuvien 5 ja 6 kaltaiset graafit. Kuvassa 5 on esitetty näytteen partikkelikokojakauma fluoresenssin funktiona. Tulokset on saatu suorasironnan kanavasta (FSC), ja ne vastaavat karkeasti partikkelikokoa. Kuvan avulla voidaan havita muun muassa erilaisten populaatioiden esiintyminen näytteessä. Kuvassa 6 tulokset on esitetty näytteen solumääräjakauma fluoresenssin funktiona.



Kuva 5. Partikkelikoko fluoresenssin funktiona.



Kuva 6. Solumäärä fluoresenssin funktiona.

3.4.2 Fluoresenssimikroskopia

Ensimmäinen fluoresenssimikroskooppi kehitettiin 1920-luvun alussa.

Fluoresenssimikroskoopin keskeisenä tarkoituksena on johtaa eksitaatioenergiaa fluoresoivaan näytteeseen ja sen jälkeen erottaa heikompi emittoitunut fluoresenssivalo kirkkaammasta eksitaatiovalosta. Näin detektoriin saapuu vain emittoitunut valo, jolloin saadaan aikaiseksi korkean kontrastin kuva. [11, s. 15.]

Fluoresenssimikroskoopin (kuva 7) pääkomponentit ovat eksitaatiovalonlähde (elohopea- tai ksenonlamppu), valoa suodattava suodatinkuutio, objektiivin ja objektin välinen suodatinkuutio, objektiivi sekä detektori. Mikroskoopin objektiivin vastaa näytteen emittoiman fluoresenssin kokoamisesta. [11; s. 23.]



Kuva 7. Olympus IX81 -mikroskooppi.

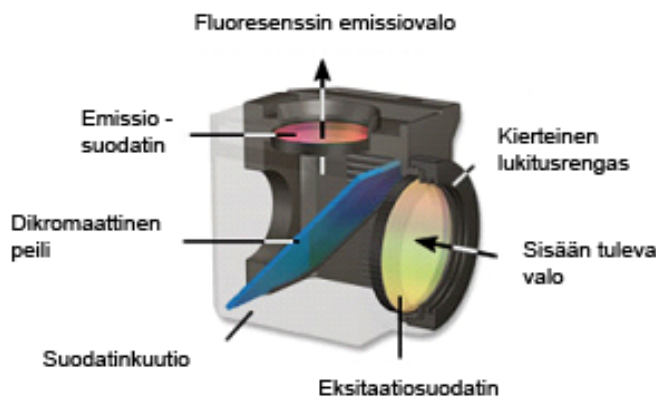
Eksitaatiovalonlähde

Fluoresenssimikroskoopin valonlähteen tarkoituksena on aikaansaada niin voimakas eksitaatiovalo näytteeseen, että näytteestä emittoituneen valon intensiteetti on riittävän voimakas sen detektoimiseen eli keräämiseen. Valolähteenä voi toimia mm. volframi tai halogeenilamppu. Niiden käyttö ei kuitenkaan ole enää kovinkaan yleistä mm. niiden

lyhyen käyttöiän takia. Nykypäivänä suosituimpia valolähteitä ovat elohopea- ja ksenonlamput mm. niiden pidemmän käyttöiän vuoksi. Elohopea-valonlähde koostuu kahdesta elektrodista, jotka on suljettu korkeaan paineeseen kvartsilasilamppuun, joka sisältää elohopean. Kun lamppu kytketään päälle, se lähettää korkeajännitteisiä pulsseja elektrodeille, joka ionisoi osan lampun kaasusta sytyttäen lampun. [11; s. 23–24; 18.]

Suodatinkuutio

Suodatinkuutio koostuu kahdesta erilaisesta suodattimesta sekä dikromaattisesta peilistä. Suodattimet ja peili asetetaan suodatinkuutioon siten, että mikroskoopin fluoresenssivalo läpäisee ensin eksitaatiosuodattimen, josta suodatettu valo heijastuu dikromaattisen peilin kautta näytteeseen. Näytteeltä tuleva emissiovalo jatkaa matkaa dikromaattiseen peilin läpi emissiosuodattimelle, josta suodatunutta valo havainnoidaan kameralla. Kuvassa 8 on esitetty suodattimien ja dikromaattisen peilin sijainnit.

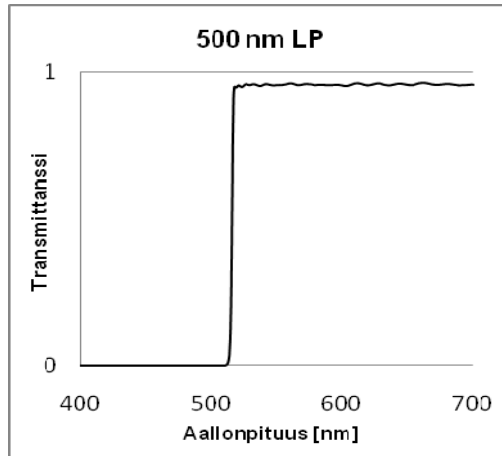


Kuva 8. Suodatinkuutio [18, muokattu.]

Suodattimet ja dikromaattinen peili

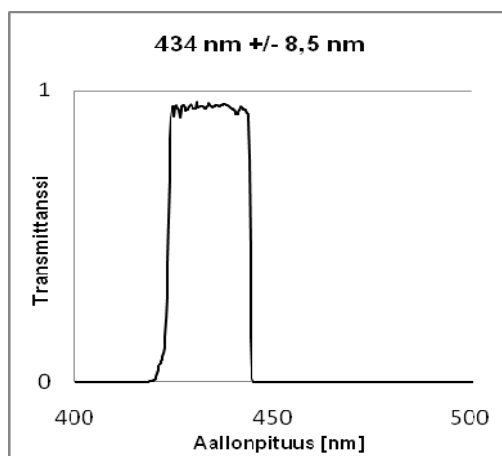
Fluoresenssin valoa suodattavat suodattimet voivat toimia erilaisilla periaatteilla, riippuen siitä millaisia aallonpituusalueita halutaan suodattaa. Kun suodattimen halutaan läpäisevän laajempi aallonpituuskaista ja pitkän aallonpituuden alue, käytetään yleensä pitkän aallonpituusalueen suodatinta (long pass filter, LP), josta on esimerkki kuvassa 9. Tällöin suodatin päästää vain tiettyä aallonpituutta suuremmat aallonpituudet suodattimen läpi. Esimerkiksi kuvassa 9 suodatin päästää vain 500 nm suuremmat

aallonpituudet lävitseen. Jos taas halutaan suodattaa suuri aallonpituusalue lyhyen aallonpituuden alueelta, käytetään lyhyen aallonpituusalueen suodatinta (short pass filter). Tällaista suodatinta käytettäessä suodatin läpäisee valoa tiettyyn aallonpituuteen asti, mutta ei siis päästä tästä suurempia aallonpituuksia lävitseen. [11; s. 26–28.]



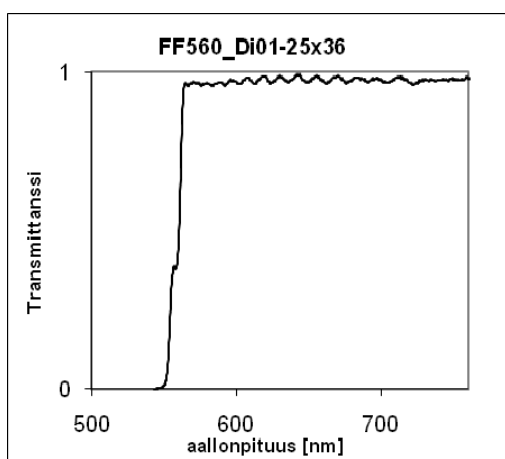
Kuva 9. Pitkän aallonpituusalueen suodatin [19.]

Suodattimet voivat suodattaa myös tarkkaan rajatun aallonpituusalueen, jolloin suodatinta kutsutaan kapean aallonpituusalueen suodattimeksi (band pass filter), kuva 10. Kapean aallonpituusalueen suodattimet sallivat vain tietyissä rajoissa olevien aallonpituuksien läpäisyn. Esimerkiksi kuvassa 10 suodatin päästää vain aallonpituuden 434 nm ympäriltä 17 nm:n aallonpituuskaistan valonsäteet suodattimen läpi eli aallonpituusalueen $434 \pm 8,5$ nm. [11, s. 26.]



Kuva 10. Kapean aallonpituusalueen suodatin [20.]

Dikromaattisella säteenosituspeilillä on kaksi pääasiallista tehtävää. Ensinnäkin peili heijastaa fluoresenssilampusta lähtevän eksitaatio-suodattimen suodattaman valon näytteeseen. Peilin toisena tehtävänä on läpäistä näytteestä saapuva pitkän aallonpituuden emissiovalo, jotta valo pääsee emissio-suodattimen kautta detektoriin. Peili siis läpäisee emissiovaloa niin, että vain pitkän aallonpituuden valo pääsee detektorille eli lyhyen aallonpituuden valo peilin läpi estyy. Tällä heijastusmekanismilla kyetään estämään eksitaatiovalon suoraa pääsyä detektorille. Peili valitaan suodatinkuutioon eksitaatio-suodattimen mukaisesti niin, että peili läpäisee vain eksitaatio-suodattimen maksimiarvoa suuremmat aallonpituudet. Esimerkki dikromaattisen peilin heijastus-spektristä on esitetty kuvassa 11. Dikromaattinen peili toimii optimaalisesti, kun valosäteet saapuvat peiliin 45°:n kulmassa. Toimivan dikromaattisen peilin tulisi heijastaa vähintään 90 % eksitaatiovalosta näytteelle ja läpäistä 90 % emissiovalosta detektorille. [11; s. 26–28.]



Kuva 11. Dikromaattinen peili [21.]

Objektiivit

Mikroskoopeissa käytetään erilaisia objektiivejä, riippuen käyttötarkoituksesta. Muun muassa vesi-imersio-objektiivit ovat tulleet erittäin suosituiksi, sillä ne mahdollistavat erittäin tarkan kuvauksen elävistä soluista sekä soluista, jotka ovat kasvatusalustassaan. Tämän ansiosta solujen fysiologiaa pystytään kuvaamaan reaaliaikaisesti. [11, s. 32.]

Detektorit

Fluoresenssimikroskooppien detektorit mahdollistavat matalatasoisen emissiofluoresenssin keräämisen. Detektorit voidaan jakaa fotonidetektoreihin ja kuvadetektoreihin (kamerat). Fotonidetektorit ovat hyvin herkkiä, ja niillä pystytään detektoimaan yksittäisiä fotoneja. Kuvadetektorit taas tarjoavat herkän fluoresenssin detektoinnin nopealla tarkkuudella. [11, s. 36.]

3.4.3 Konfokaalimikroskopia

Konfokaalimikroskooppin pääkomponentit ovat valomikroskooppi, jossa on fluoresenssivarustus, laser-valolähde, neulanreikä, suodattimet sekä detektori. Konfokaalimikroskoopissa vain näytteen fokuksessa oleva taso kuvannetaan ja ei-fokuksessa olevien tasojen emissiovalon pääsy detektorille estetään. Fokuksessa olevan tason kuvantaminen mahdollistuu, kun lasersäde kulkee pienen neulanreiän (pinhole) läpi, jolloin laseraallon muoto muuttuu sen kulkiessa ohuen reiän läpi. Tällöin näytteestä saadaan kuvatuksi ohuita kolmiulotteisia leikkeitä ilman taustan häiriötä. [22.]

Lasersäde lähetetään näytteeseen eksitaatiovalonlähteestä, josta se kulkee neulanreiän ja suodattimen kautta näytteeseen. Neulanreiän avulla laservalo saadaan siis diffraktoitua eli hajautettua, jolloin valo levittyy näytteen yli. Näytteeseen absorpoitunut emissiovalo heijastuu fluoresoivasta näytteestä detektioneulanreiän kautta detektorille.

Detektioneulanreiän tarkoituksena on päästää vain fokustasosta tuleva valo detektorille. Lähes kaiken ei-fokuksessa olevan valon pääsy detektorille estyy, sillä tällainen valo hajoaa detektioneulanreikää laajemmalle alueelle. Konfokaalimikroskoopin etuja ovat muun muassa sen erinomainen kuvan muodostaminen ainoastaan fokustasoon, jolloin fokustason ala- ja yläpuoliset kohteet (kuten päällekkäiset solut) eivät häiritse leikkeen tarkkuutta. [22.]

3.4.4 Fluoresenssispektroskopia

Fluoresenssispektroskooppia voidaan käyttää mittaamaan muun muassa fluoresenssin intensiteettiä ja reaaliajassa tapahtuvaa fluoresenssia (TRF). Fluoresenssispektroskooppi koostuu valolähteestä, kahdesta eksitaatio- ja emissiomonokromaattorista sekä fluoresenssidetektorista. Valolähde lähettää näytteeseen usean aallonpituuden valoa, joka suodatetaan halutun aallonpituuden valoksi monokromaattoreiden avulla. Suodatettu monokromaattinen valo heijastetaan näytteeseen, josta emittoitunut valo heijastetaan emissiomonokromaattoreille. Emissiomonokromaattoreissa suodatettua monokromaattista valoa jatkaa edelleen matkaansa detektorille, jossa fluoresenssin intensiteetti mitataan. [23, s. 15–21.]

Fluoresenssispektroskoopin mittaama fluoresenssi on hyvin herkkä analyysimenetelmä. Fluoresenssispektroskoopin käytön edellytyksenä on, että tutkittava näyte fluoresoi tai se voidaan värjätä fluoresoivalla värillä. Näytteen lämpötila ja pH vaikuttavat näytteen fluoresenssitehokkuuteen. Näytteen on myös absorboitava riittävästi laitteen lähettämää viritysvaaloa, jotta fluoresenssin analysointi olisi ylipäättään mahdollista. Fluoresenssispektroskopian huonoja puolia on myös se, että yksittäisten solujen informaatiota ei ole mahdollista kerätä, toisin kuin esimerkiksi fluoresenssimikroskooppilla ja virtausytometrillä. [23, s. 15–21.]

4 Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia

Ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) käytetään pääsääntöisesti määrittämään orgaanisten yhdisteiden rakenteita. NMR:n toiminta perustuu tiettyjen atomiytimien magneettimaiseen käyttäytymiseen. NMR-laitteella kerätty signaali saadaan esimerkiksi seuraavista ytimistä: ^1H , ^{13}C , ^{19}F ja ^{31}P . Tärkeimmät NMR-analytiikan lajit ovat ^1H -NMR ja ^{13}C -NMR. [24.]

Menetelmän signaalin keräys perustuu atomiytimien käyttäytymiseen magneettikentässä. Jos ytimessä on parillinen määrä protoneja ja neutroneja, sillä ei ole

NMR-spektriä, koska ytimellä ei tällöin ole magneettisia ominaisuuksia. Tämän takia hiilen ja hapen tavallisimmat isotoopit (^{12}C ja ^{16}O) eivät aiheuta NMR-signaalia. [24.]

Eräille alkuaineiden ytimille (^1H , ^{13}C , ^{19}F ja ^{31}P) on ominaista ytimen pyörimisliike eli spin. Spin luo ytimeen magneettisen ominaisuuden. Kun ytimien luokse tuodaan ulkoinen magneettikenttä (B_0), ytimissä esiintyy kahta eri spin-tilaa ($1/2$ ja $-1/2$). Matalammalla energiatasolla $1/2$ magneettinen momentti on yhdensuuntainen ulkoisen magneettikentän kanssa, ja korkeammalla energiatasolla $-1/2$ magneettinen momentti on ulkoista magneettikenttää vastaan. Näiden kahden spin-tilan energiaero riippuu ulkoisen magneettikentän voimasta. Ulkoisen magneettikentän voimakkuuden ollessa nolla spin-tilojen energiatasot ovat samat, mutta ulkoisen magneettikentän kasvaessa myös energiatasojen ero kasvaa. NMR:ssä tarvitaan suuria magneettikenttiä (useita tesloja, T), jotta hyvin pienet energiatasojen erot kyetään havaitsemaan. [25.]

Säteilytettäessä näytettä radiotaajuisella säteilyllä (rf-pulssilla), joka vastaa spin-tilojen energiaeroa, saadaan $1/2$ -tilan ytimet absorpoimaan energiaa ja nousemaan korkeammalle $-1/2$ -spin-tilalle. Jos esimerkiksi vesinäytettä pidetään 2,3487 teslan ulkoisessa magneettikentässä ja kentän voimakkuutta nostetaan hiljalleen 2,3488 teslaan, vesimolekyylin vety-ytimet ryhtyvät absorpoimaan radiotaajuisia säteilyä, joka havaitaan hetken kuluttua resonanssisignaalinä, jolloin spinsysteemi palaa aiempaan tasapainotilaan ja lähettää samalla näytteen ympärillä olevaan kelaan sähköjännitteen. Tämä sähköjännite voidaan vahvistaa, ja tekemällä signaaliin fourier-muunnos saadaan selville värähtelyn spektri. [25.]

Energiaero kahden spin-tilan välillä tietyllä magneettikentän voimakkuudella on verrannollinen ytimien magneettiseen momenttiin (μ). Esimerkiksi neljällä tunnetuimmalla ytimellä magneettiset momentit ovat: ^1H $\mu = 2,7927$, ^{19}F $\mu = 2,6273$, ^{31}P $\mu = 1,1305$ ja ^{13}C $\mu = 0,7022$. Momentit on ilmaistu ydinmagnetoneina, joka on $5,05078 \cdot 10^{-27} \text{ J/T}$. Energiaeron ja magneettisen momentin korrelaatio voidaan esittää yhtälön 1 avulla. [25.] Yhtälöstä

$$\nu = \frac{\mu B_0}{hI} \quad (1)$$

jossa μ on ytimen magneettinen momentti (J/T), B_0 on ulkoisen magneettikentän voimakkuus [T], h on Planckin vakio ($6,626069 \cdot 10^{-34}$ Js) ja I on ytimen pyörimistila ($1/2$ tai $-1/2$), saadaan ν eli ytimien energiaeron taajuus [Hz]. [25.]

Ytimen magneettikentän suuruuteen vaikuttavat muun muassa siihen sitoutuneet vetyatomit ja sen läheisyydessä olevat ytimet. Lähiympäristössä olevien protonien ytimet vaikuttavat tutkittavaan ytimeen joko vahvistaen tai heikentäen sen kokema kenttää, riippuen siitä miten nämä muut protonit ovat suuntautuneet. [24.]

Koska erilaisten yhdisteiden NMR-piikkien signaali riippuu ulkoisen magneettikentän voimakkuudesta sekä radiotaajuuden voimakkuudesta, voivat resonansitaajuudet vaihdella. Tämän takia NMR-näytteisiin lisätään referenssistandardia (esim. tetrametyylisilaani, TMS). Referenssinäytteen ja tuntemattoman piikin välimatkan etäisyydestä voidaan täten määrittää tuntemattoman piikin yhdiste. [25.]

^{31}P -NMR on tehokas menetelmä määrittää solunsisäistä pH:ta, sillä soluja ei tarvitse rikkoa pH_i :n määrittämiseksi. Menetelmän haittana on kuitenkin se, että näytteen solukonsentraation täytyy olla kovin suuri, mittaukset täytyy suorittaa erillisessä puskurissa, mittauksilla on alhainen herkkyys sekä se että menetelmällä ei voida määrittää nopeita pH_i :n muutoksia. [26.]

KOKEELLINEN OSUUS

5 Työn tavoitteet

Löydettäessä fluoresoivalle SNARF-4F-väriaineelle optimaaliset olosuhteet värin saamiseksi solun sisään ja määrittämällä optimaaliset suodatinkuutiot fluoresenssimikroskooppiin voitaisiin teoriassa kyetä määrittämään *Saccharomyces cerevisiae* -hiivasolujen solunsisäistä pH:ta reaaliaikaisesti fluoresenssimikroskoopilla. Värjäystekniikka toisi mahdollisuuden määrittää solunsisäistä pH:ta ilman, että soluja tarvitsisi geenimuunnella, mikä olisi hyvin tärkeää muun muassa tuotanto-organismien kannalta. Fluoresenssimikroskooppi mahdollistaisi lisäksi näytteiden nopean, helpon ja kohtuullisen halvan analysoinnin.

Työssä pyrittiin lisäksi määrittämään E²GFP-solujen kalibrointikäyrä niin, että analysoidut tulokset noudattaisivat toisen asteen laskevaa käyrää. Jos kalibrointikäyrän määrittäminen onnistuisi, pystyttäisiin näytteistä määrittämään solunsisäinen pH ilman ylimääräistä fluoresoivaa värjäystä, jolloin säästyttäisiin ainakin solujen permeabilisoinnilta ja täten päästäisiin todennäköisesti lähemmäksi solun todellista pH_i:tä. E²GFP:n käyttö bioreaktorikasvatuksissa pH_i:n määrittämiseksi saattaisi kuitenkin olla ongelmallista, sillä tuotantokantoja täytyisi geenimuunnella, jotta E²GFP-geenin sisältävä plasmidi saataisiin siirrostettua soluihin. Tuotantokannoilla tämä on ongelma siksi, että tuotantokantojen geenimuuntelusta on tiukat säännökset eikä tällaisia ”ylimääräisiä” geenimuunteiluita yleisesti ottaen kannateta. Geenimuuntelu on tiukasti valvottua, sillä geenimuuntelun vaikutuksia muihin organismeihin ja ympäristöön ei tunneta vielä riittävän tarkasti.

Saccharomyces cerevisiae -hiivan solunsisäisen pH:n määrittämisestä on tutkittu muun muassa virtaussytometrillä. Vallin ym. tutkimuksessa hiivasolut olivat värjätty fluoresoivalla pH-riippuvaisella karboksyyli SNARF-4F-värillä. Työn kokeellisen osuuden suoritus perustui suurelta osin Vallin ym. tutkimukseen. Suurin ero virtaussytometrillä tehtyyn tutkimukseen oli analyysimenetelmä, jolla pH_i:ta pyrittiin määrittämään. Työssä pH_i:tä pyrittiin määrittämään fluoresenssimikroskoopilla. Testataksemme hiivakannan yhdenmukaisuutta Vallin ym. käyttämään hiivakantaan,

suoritimme Vallin ym. tutkimuksen mukaiset kokeet ulkoisen pH:n vaikutuksesta solun sisäiseen pH-arvoon virtaussytometrillä. [2.]

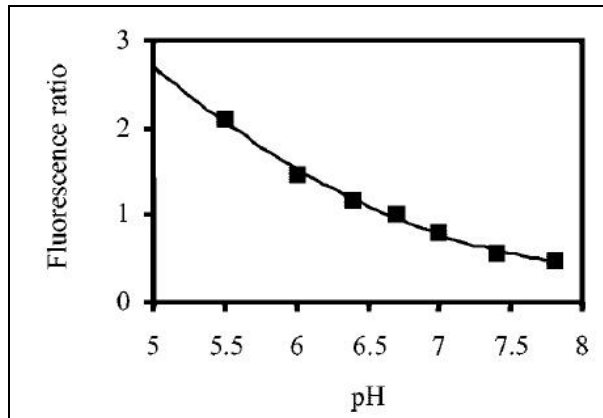
pH_i:n määrittäystä soluista, joihin oli siirrostettu fluoresoivan E²GFP-proteiinin geeni, on tutkittu mammaalisoluilla, ja tulokset ovat analysoitu konfokaalimikroskoopilla [8.] Hiivasoluilla vastaavaa tutkimusta ei ole tehty. Bizzarrin ym. tutkimuksessa E²GFP:llä havaittiin olevan kaksi eksitaatio- ja kaksi emissiohuippua, jotka ovat pH-riippuvaisia [8]. Tutkimuksen tarkoituksena oli löytää nämä eksitaatio- ja emissiohuippujen paikat ja testata, toimiiko E²GFP:n pH-riippuvuus hiivasoluihin siirrostettuna.

Kalibrointikäyrän määrittämiseksi solun ulkoiset olosuhteet saatiin vallitseviksi solun sisälle inkuboimalla soluja permeabilisoivassa aineessa, jolloin ulkoiset ja sisäiset olosuhteiden katsottiin tasoittuvan. Permeabilisoivia aineita kuten Triton X-100:aa on testattu hiivasolujen permeabilisointiin, mutta muilla permeabilisoivilla aineilla kuin Amphotericin B:llä ei kuitenkaan ole saatu toistettavia tuloksia [2]. Tämän vuoksi myös työn kokeisiin valittiin Amphotericin B:n permeabilisoivaksi aineeksi. pH-puskuriliuoksena virtaussytometrillä tehdyssä tutkimuksessa päädyttiin käyttämään McIlvaine-puskuria sen laajan puskurointikapasiteetin vuoksi ja siksi että se soveltui optimaalisesti biologisiin systeemeihin [2]. Tämä puskuriliuos valittiin myös työn analyysiin.

Fluoresoivan SNARF-4F-värin lisäys soluihin olisi ideaalisinta solujen kasvuvaiheessa. Tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, sillä SNARF-4F-fluoresoiva väriaine on epästabiili, kun liuoksessa esiintyy kasvatusliuosten sisältämiä amiiniryhmiä kuten aminohappoja ja vitamiineja. Nämä yhdisteet kykenevät pilkkomaan SNARF-4F-väriaineen esterin ja siten estävät värin siirtymisen soluun. [2.] Tämän vuoksi analyysien solujen värjäys suoritettiin kasvatuksen jälkeen, pestyihin (sentrifugoituihin) soluihin.

Virtaussytometriset analyysit suoritettiin Vallin ym. tutkimuksessa eksitoimalla näytteitä 488 nm ioni-laserilla (air-cooled ion-laser) ja mittaamalla emissio käyttämällä kapean aallonpituusalueen suodatinta 585 +/- 21 nm sekä pitkän aallonpituusalueen suodatinta 670 nm. Tutkimuksessa jokaisesta näytteestä analysoitiin erikseen 10 000 solua. Solujen fluoresenssien suhteet laskettiin Vallin ym. tutkimuksessa jokaiselle

solulle erikseen jakamalla emissiosignaali 585 nm emissiosignaalilla 670 nm. Jokaisen näytteen pH_i :n keskiarvo laskettiin kahdella eri suodattimella saatujen intensiteettien suhteiden keskiarvosta (585 nm / 670 nm) käyttämällä kalibrointikäyrää (kuva 12). [2.]



Kuva 12. Vallin ym. määrittämä kalibrointikäyrä [2.]

Työssä pyrittiin määrittämään SNARF-4F-värille optimaaliset fluoresenssimikroskoopin suodatinkuutiot eli sellaiset suodattimet, jotka olisivat mahdollisimman tarkasti SNARF-4F-värin intensiteettihiippujen kohdilla. Intensiteettihiippujen kohdilla intensiteetin vaste pH_i :n muutoksiin olisi kaikkein suurinta ja täten tulokset tarkimpia. Optimaaliseksi määritetyillä suodatinkuutioilla pyrittiin luomaan Vallin ym. tutkimuksen mukainen kalibrointikäyrä, jossa intensiteettien suhde laskee pH_i :n kasvaessa (kuva 12). Jotta mittauksista saatiin ratiometrisiä, tuli solujen intensiteetit määrittää kahdella eri eksitaatioalueella, jolloin intensiteettien suhteesta (585 nm / 758 nm) saatiin solun sisällä olevan värin määrästä riippumaton arvo. [2.]

Insinööriyössä virtausytometriset analyysit suoritettiin SNARF-4F-värjätuille soluille eksitoimalla näytteitä 488 nm laserilla ja keräämällä emissio suodattimilla 578 nm ja 785 nm. Analyysien suorittamisen jälkeen havaittiin, että jälkimmäinen emissiosuodatin valittiin virheellisesti, sillä optimaalisempi suodatin olisi ollut tehtyjen kokeiden mukaan virtausytometrin emissiosuodatin 667 nm. Virtausytometrisissä analyyseissä näytteistä analysoitiin 10 000 solua, joiden intensiteettien keskiarvoista laskettiin kahdella eri suodattimella (578 nm / 758 nm) saatujen intensiteettien suhdeluku.

Vallin ym. tutkimuksen puskurikokeet suoritettiin muuttamalla solujen ulkoista pH:ta erivahvaisilla pH-puskuriliuoksilla (McIlvaine-puskuri pH 2,2–7,0) ja mittaamalla näytteiden fluoresenssin intensiteetin muutosta virtausytometrillä. Tutkimuksessa haluttiin myös selvittää, millainen vaikutus solujen kasvuvaiheella (eksopotentiaalinen kasvuvaihe vs. stationäärinen kasvuvaihe) on solun kykyyn ylläpitää optimaalinen pH_i. [2.] Työssä tehtiin Vallin ym. [2] tutkimusta vastaavat pH-puskurikokeet eri kasvuvaiheen soluille fluoresenssimikroskoopilla ja virtausytometrillä, jotta saatiin selville olivatko tulokset toistettavia Vallin ym. tulosten kanssa.

Kalibrintikäyrien soveltuvuutta määrittää erilaisissa koesarjan liuoksissa olleiden E²GFP- ja SNARF-4F-värjättyjen solujen pH_i:tä testattiin inkuboimalla soluja erilaisissa koesarjan liuoksissa tunnin ajan ja seuraamalla samalla fluoresenssin intensiteetin muutosta. Koesarjan liuoksissa 15 minuuttia inkuboituneiden solujen kuvat analysoitiin, jotta tulokset olisivat olleet vertailukelpoisia NMR:llä analysoitujen tulosten kanssa (NMR-tulokset analysoitu ajanhetkellä 20 – 22 minuuttia).

Työn analyysit suoritettiin fluoresenssimikroskoopin lisäksi virtausytometrillä sekä fluoresenssispektroskoopilla. Saatuja tuloksia verrattiin lisäksi NMR:llä määritettyihin *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan tuloksiin, jotta eri analyysimenetelmien herkkyyksistä ja toimivuudesta saatiin käsitys. Hannu Maaheimo ja Mervi Toivari (VTT) suorittivat NMR-analyysiin vaadittavat kokeet ja analysoivat saadun datan tuloksiksi.

6 Materiaalit ja menetelmät

6.1 Laitteet

- Fluoresenssimikroskooppi, Olympus IX81, Japani.
- Fluoresenssispektroskooppi, Varioskan, Thermo Electron Corporation, 100V – 240V, USA.
- pH-mittari, pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Saksa.
- Ravistelukaappi, HT infors Minitron, CH-4103, Infors AG, Sveitsi.
- Sekoittaja, Vortex-Genie 2, Model G560E, Scientific Industries, USA.
- Sentrifugi, Biofuge Fresco, Heraeus, Saksa.
- Sentrifugi, Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, K. I. Scientific, Australia.
- Sentrifugi, Centrifuge 5810R, R 134 A, Eppendorf, Saksa.
- Spektrofotometri UV-1201, UV-vis-spectrophotometer, Shimadzu, Fennolab, NO: 510460, Japani.
- Virtaussytometri, BD FACSAria™, BD Biosciences, P/N 334078, Kanada.

6.2 Liuokset

6.2.1 YNB-kasvatusliuos

Saccharomyces cerevisiae -hiivasolujen kasvatusliuoksena käytettiin YNB-kasvatusliuosta. YNB-liuos (Yeast Nitrogen Base) sisälsi hiivan vaatimat suolat, vitamiinit ja hivenaineet. YNB-kasvatusliuos sisälsi 10 g/l glukosia ja 100 ml/l 10 x YNB- liuosta.

6.2.2 SNARF-4F-kantaliuos

5 μ M SNARF-4F-kantaliuos valmistettiin liuottamalla 50 μ g SNARF-4F-väriä (Snarf® - 4F 5- ja 6-karboksyylihappo asetoksimetyyliesteri, asetaatti, {SNARF®- 4F 5- and 6-carboxylic acid, acetoxymethyl ester, acetate}), Invitrogen, Molecular Probes™, S23921, MW: 585,54) 17 μ l:n DMSO:ta (DMSO, dimetyyli sulfoksidi, C₂H₆OS, Sigma Hybri-max ®, D2650, FW: 78,13).

6.2.3 Amphotericin B -kantaliuos

Amphotericin B:n kantaliuoksesta valmistettiin vahvuudeltaan 3000 μM :sta Amphotericin B. jauheesta (Amphotericin B: Solubilized, Sigma, A9528-100MG, FW: 924,1) ja ionivaihdetusta steriloidusta vedestä. Lisättäessä kantaliuosta edelleen näytteeseen se tuli laimentaa 100-kertaisesti eli pitoisuuteen 30 μM .

6.2.4 McIlvaine pH-puskurit

Eri pH:n omaavat McIlvaine-puskuriliuokset valmistettiin sekoittamalla 0,2 M:sta dinatriumvetyfosfaattia ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ja 0,1 M:sta sitruunahappoa ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) keskenään taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1. McIlvaine-puskurin valmistus

haluttu pH	Na_2HPO_4 (0,2 M) [ml]	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,1 M) [ml]
3	4,11	15,89
3,5	5,96	14,04
4	7,71	12,29
4,5	8,99	11,01
5	10,3	9,7
5,5	11,29	8,71
6	12,63	7,37
6,5	14,07	5,93
7	16,47	3,53
7,5	18,34	1,66
8	19,45	0,55

Valmista puskuria yhteensä 20 ml.

Valmiiden liuosten pH:t tarkistettiin kalibroidulla pH-mittarilla valmistuksen jälkeen sekä mahdollisuuksien mukaan säilytyksen aikana.

6.2.5 Maitohappoliuos

Koesarjan maitohappoliuokset valmistettiin 85-prosenttisesta maitohappoliuoksesta (Lactic acid 85 %, racemic, Sigma, L-6661) laimentamalla liuokset 0,9 %:lla NaCl-liuoksella.

6.3 Kantojen kasvatus

Tutkimuksessa käytettiin *Saccharomyces cerevisiae* -kanta H2798 (mat a, ura3-52, HIS3, LEU2, TRP1, MAL2-8c, SUC2).

SNARF-4F-värjättyihin näytteisiin käytettiin solukantaa *Saccharomyces cerevisiae* (H2798 / B547), joka oli peräisin VTT:n kantakokoelmasta. Kanta siirrostettiin glyserolistokista siirrostussilmukalla SCD-ura-alustalle (synteettinen, glukoosia ja aminohappoja sisältävä kasvatusmalja ilman urasiilia). Maljoja inkuboitiin neljä vuorokautta 30 °C:ssa, jonka jälkeen maljoja säilytettiin + 4 °C:ssa. Kanta siirrostettiin kolmen viikon välein uudelle alustalle.

Fluoresoivalla E²GFP – proteiinilla analysoituihin kokeisiin käytettiin solukantana *Saccharomyces cerevisiae* E²GFP pMV102 / H2798 -kanta, joka oli VTT:n kantakokoelmasta. Mari Valkonen (VTT) oli siirrostanut kantaan fluoresoivan pH-riippuvaisen E²GFP-plasmidin. Kanta siirrostettiin glyserolistokista siirrostussilmukalla SCD-ura-alustalle. Maljoja inkuboitiin neljä vuorokautta 30 °C:ssa, jonka jälkeen maljoja säilytettiin + 4 °C:ssa. Kanta siirrostettiin kolmen viikon välein uudelle alustalle.

6.4 Kantojen ravistelupullokasvatus

Solujen ravistelupullokasvatukset suoritettiin siirrostamalla *Saccharomyces cerevisiae* (H2798 / B547) -kanta SNARF-4F-värjäyskokeisiin tai *Saccharomyces cerevisiae* E²GFP pMV102 / H2798 -kanta E²GFP-kokeisiin noin neljä pesäketä 25 ml:aan YNB-kasvatusliuosta 100 ml:n erlenmeyereihin. Näytteitä inkuboitiin ravistelijassa (30 °C, 200 rpm). Kasvatuspulloista siirrostettiin noin 18 tunnin kasvattamisen jälkeen 1 ml soluliuosta 25 ml:aan tuoretta YNB-kasvatusliuosta. Solujen annettiin kasvaa noin 4 tuntia, jotta solut saavuttivat eksponentiaalisen kasvun vaiheen (OD 0,5). Jos kokeet suoritettiin stationäärisen kasvuvaiheen soluille, viimeinen siirrostus jätettiin tekemättä.

6.5 Näytteiden valmistus

6.5.1 Solujen värjäys fluoresoivalla SNARF-4F-värillä

Saccharomyces cerevisiae H2798 / B547 -kannan solujen värjäyksessä käytettiin eksponentiaalisen kasvuvaiheen kasvatusliuosta ($OD_{600} = 0,5$) 0,5 ml. Sentrifugoitujen (13 000 rpm, 5 min, 5 °C) näytteiden solupelletit erotettiin supernatantista.

Solupelletin päälle valmistettiin SNARF-4F-loudausliuos SNARF-4F-kantaliuoksesta (5 mM) sekä McIlvaine-puskurista (pH 3) niin, että SNARF-4F:n lopullinen konsentraatio liuoksessa oli 20 μ M. Soluja inkuboitiin ravistelijassa 11 min (30 °C, 200 rpm) värin saamiseksi solujen sisään.

6.5.2 Solunäytteiden valmistus kalibrointikäyrän määrittämiseksi

SNARF-4F-värjättyt solut tai kasvatetut E²GFP-solut sentrifugoitiin ($OD_{600} = 0,5$; 0,5 ml) ja solupelletit kerättiin. Pelletit suspendoitiin haluttuihin McIlvainen pH-puskureihin (lopullinen tilavuus 500 μ l) kalibrointikäyrän määrittämiseksi. Näytteisiin lisättiin myös Amphotericin B -kantaliuosta niin, että sen loppukonsentraatio kussakin liuoksessa oli 30 μ M. Amphotericin B:n tarkoituksena oli permeabilisoida soluja niin, että solun ulkoiseksi ja sisäiseksi pH:ksi saataisiin sama arvo. Näytteitä inkuboitiin ravistelijassa 1 tunti (37 °C, 180 rpm). Inkuboidut näytteet analysoitiin halutulla analyysilaitella.

6.5.3 Vallin ym. tutkimuksen mukaisten puskurikokeiden valmistus

SNARF-4F-värjättävät solut kasvatettiin eksponentiaaliseen tai stationääriseen kasvuvaiheeseen (kasvusaika 4 h tai 18 h), jonka jälkeen solut värjättiin fluoresoivalla SNARF-4F-värillä. Värjättyjen sentrifugoitujen solupellettien päälle lisättiin 500 μ l McIlvaine-puskuria pH 3-7.

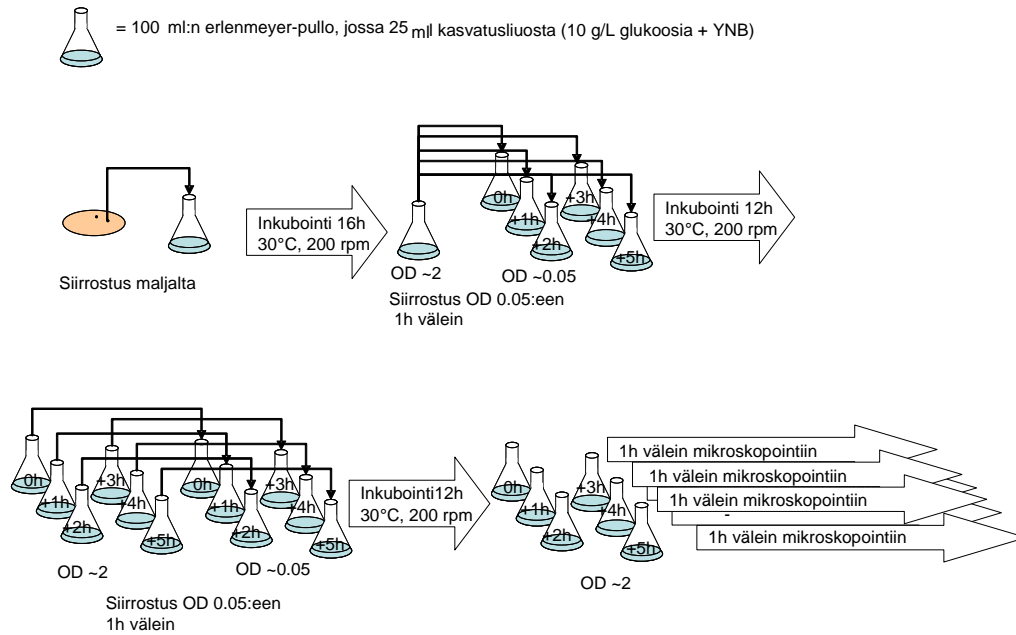
6.5.4 Koesarjan näytteiden valmistus

SNARF-4F-värjättävät solut kasvatettiin eksponentiaaliseen kasvuvaiheeseen ja solut värjättiin. Värjättyjen sentrifugoitujen solupellettien päälle lisättiin 500 µl haluttua koesarjan liuosta (taulukko 2).

E²GFP-näytteet kasvatettiin kuvan 13 kasvatussyklin mukaan eksponentiaaliseen kasvuvaiheeseen. Näytteeksi otettiin 0,5 ml (OD₆₀₀ = 0,5) näytettä ja sentrifugoitujen solupellettien päälle lisättiin 500 µl haluttua koesarjan liuosta (taulukko 2).

Taulukko 2. Koesarjan erilaiset koeolosuhteet

A) NaCl 9 g/L,
B) 5 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa,
C) 15 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa,
D) 20 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa,
E) 30 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa,
F) 40 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa
G) NaCl 9 g/L,
H) 15 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa & pH 2 (säädetty NaOH:lla),
I) 15 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa & pH 3,5 (säädetty NaOH:lla),
J) 15 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa & pH 5 (säädetty NaOH:lla),
K) 15 g/L maitohappoa NaCl-liuoksessa & pH 6,5 (säädetty NaOH:lla),
L) NaCl 9 g/L,
M) 55 mM HCl NaCl-liuoksessa,
N) 165 mM HCl NaCl-liuoksessa,
O) 2 g/L D-glukoosia YNB-liuoksessa (mittaus 2 h),
P) 20 g/L D-glukoosia YNB-liuoksessa (mittaus 2 h)



Kuva 13. Koesarjan kasvatussykli E^2GFP -soluille [10.]

6.6 Näytteiden kuvaaminen fluoresenssimikroskoopilla

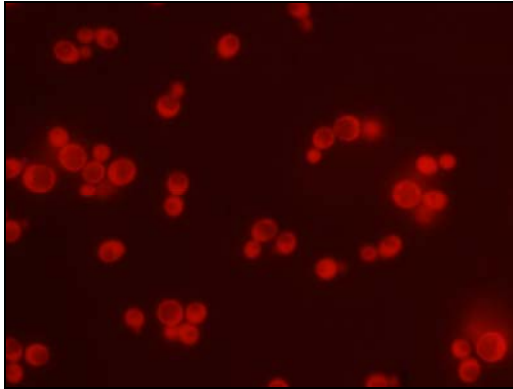
Työssä käytettiin Olympus IX81 -mikroskooppia (Japani), jossa oli Olympus 60x vesi-imersio-objektiivi. Objektiivin ja näytteen väliaineena toimi vesi. Fluoresoivana valonlähteenä käytettiin elohopealamppua. Mikroskooppi oli liitetty tietokoneeseen, jossa käytettiin Olympuksen *Cell-P*-ohjelmaa kuvattaessa näytteitä. Ennen kuvauksen aloitusta mikroskoopin valotusaika säädettiin aina samaksi, jotta eri päivinä otetut kuvat olivat vertailukelpoisia keskenään. Näytteistä otettiin aina ensin kuva näkyvän valon alueella, jolloin saatiin kuva näytteessä olevien solujen määrästä. Tämän jälkeen valo suljettiin ja laitettiin päälle fluoresenssivalo, haettiin fokustaso ja otettiin näytteestä kuvat kahdella eri suodatinkuutiolla.

6.7 Fluoresenssimikroskooppikuvien analysointi signaalinkäsittelyohjelmalla

Kuvattaessa fluoresoivia soluja fluoresenssimikroskoopilla solunsisäisen pH_i:n määrittämiseksi otettiin soluista kaksi kuvaa kahdella eri suodatinkuutiolla kuvattuna. Tällöin soluista saatiin kahdella eri eksitaatio- tai emissioaallonpituudella otetut kuvat, joissa solut fluoresoivat eri intensiteeteillä. Otetuista kuvista ei saatu solujen intensiteettien arvoja suoraan, vaan kuvat täytyi käsitellä jollain

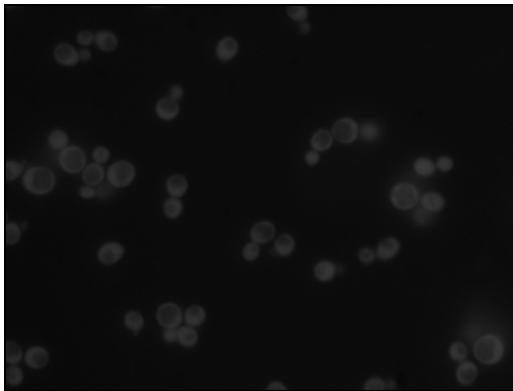
signaalinkäsittelyohjelmalla niin, että fluoresenssien intensiteetit saatiin numeeriseksi. Ohessa kuvaus UTHSCSA (University of Texas Health Science Center at San Antonio) ImageTool 3.0 -ohjelmalla tapahtuvasta kuvien käsittelyn eri vaiheista. Kuvan käsittely suoritettiin tutkimusprofessori Jouko Viitasen (VTT) neuvojen mukaan.

Ohjelmaan avattiin käsiteltävä kuva tiff-formaatissa (kuva 14).



Kuva 14. Fluoresoivia soluja fluoresenssimikroskoopilla kuvattuna.

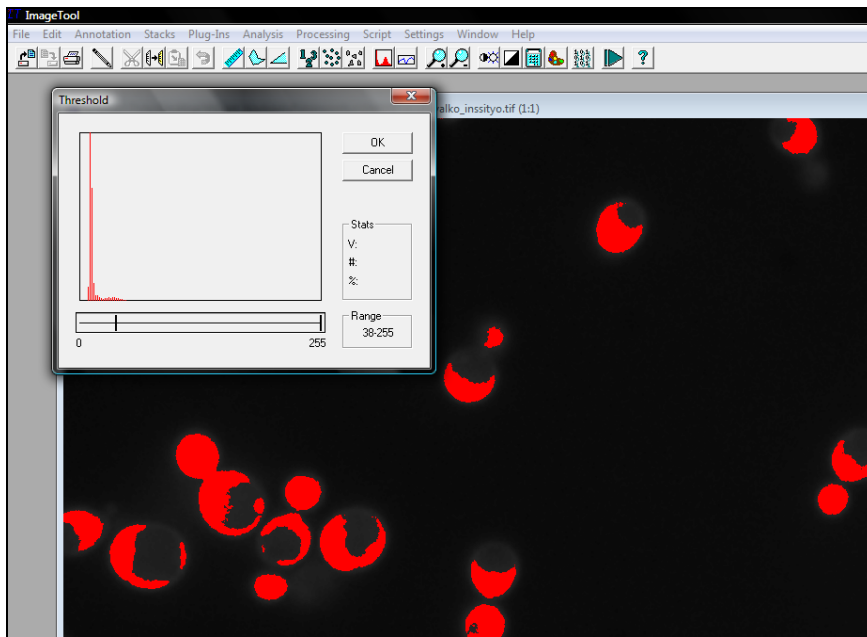
Kuva saatettiin seuraavaksi mustavalkoiseksi, jotta ohjelma pystyi käsittelemään värikomponentteja erikseen (kuva 15).



Kuva 15. Mustavalkokuva soluista.

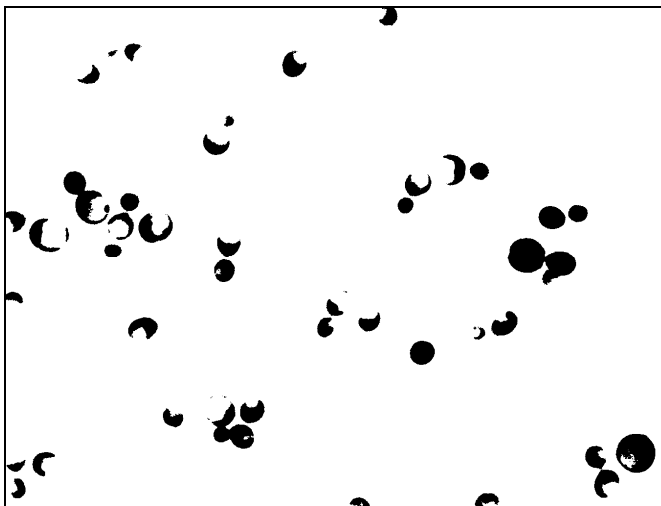
Seuraavaksi kohteet eli solut kynnystettiin niin, että erilliset kohteet saatiin tilastoitua erillisinä. Tämä tehtiin erityisellä liu'ulla, jossa liukua säädettiin niin, että kynnystetyt kohteet tulivat punaiseksi väritetyssä kuvassa erilleen (kuva 16). Kynnistyksen suuruus määräytyi sen mukaan, milloin suurin osa soluista oli irti toisistaan, jotta saatiin määritettyä yksittäisten solujen intensiteettejä. Kynnysarvo pyrittiin hakemaan

kummassakin kuvassa samaan kohtaan, jotta molemmissa kuvissa olisi samat solut eriteltyinä.



Kuva 16. Kynnystys.

Hyväksymällä kynnystystaso, saatiin mustavalkoinen kynnystetty kuva (kuva 17).



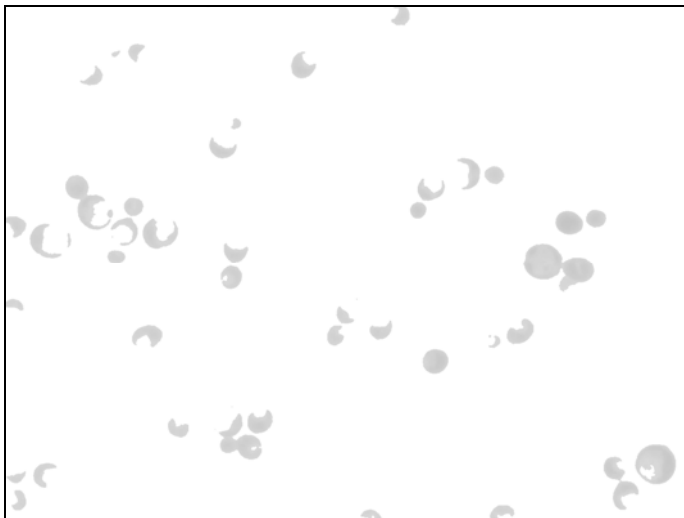
Kuva 17. Kynnestyksen jälkeen.

Koska kuvassa oli kuitenkin kynnestyksen jälkeen monia kohinapisteitä (toisin sanoen ei kokonaisia soluja), poistettiin ne käyttämällä muutaman kerran mediaanisuuodatusta. Näin kuvaan saatiin jäämään vain fluoresoivat kohdat (kuva 18).



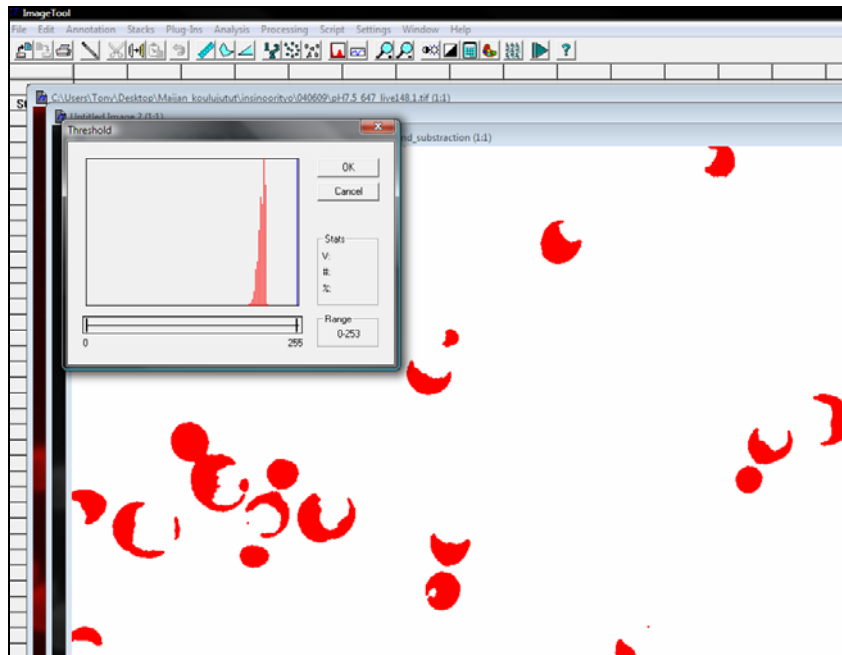
Kuva 18. Mediaanisuodatettu kuva.

Intensiteetin arvot saatiin vähentämällä alkuperäisen harmaakuvan (kuva 15) tausta mediaanisuodatetusta kuvasta (kuva 18).



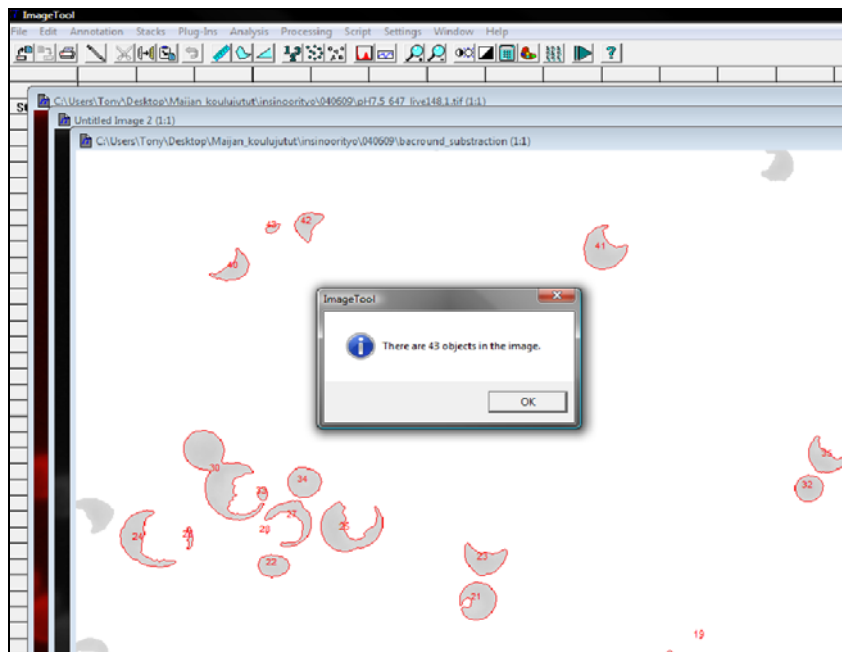
Kuva 19. Mitattavat fluoresoivat kohdat.

Tulokseksi saatiin kuva, jossa tausta oli valkoinen ja mitattavat kohteet olivat harmaalla (kuva 19). Saatu kuva kynnystettiin siten, että kynnystysarvo oli 253, jolloin solut saatiin erillisiksi kohteiksi (kuva 20).



Kuva 20. Kynnystys.

Kynnestyksen jälkeen suoritettiin kvantitatiivinen analyysi. Analyysiä varten ohjelma etsi kuvasta kaikki erilliset fluoresoivat kohdat (kuva 21). Analyysin olisi voinut tehdä myös suoraan alkuperäiselle kuvalle, mutta silloin erillisiä kohteita olisi voinut löytyä monta sataa, mikä olisi vaikeuttanut tulevaa analyysiä.



Kuva 21. Fluoresoivat alueet.

Kuvasta saatiin numeerisia mitattuja arvoja solujen intensiteeteistä, analysoimalla erotellut kohteet. Ohjelma kykeni erottamaan kuvan soluista 255 eri harmaan sävyä. Tämän takia analyysissä saatiin kuvassa olleiden solujen intensiteetit muodossa 255-intensiteetti (kuva 22).

Object	Area	Perimeter	Major Axis Length	Major Axis Angle	Roundness	Centroid	Gray Centroid	Int. Dens.	Min Level	Mean Level	Median Level
Mean	1342,49	157,40	47,59	22,39	0,79			284331,53	207,70	213,09	213,02
Std. Dev.	1451,25	108,84	30,02	47,33	0,91			306425,10	5,27	2,62	2,78
1	#1	737,00	122,57	40,26	75,62	[27,985]	[29,986]	158455,00	211,00	215,00	215,00
2	#2	2954,00	368,43	107,97	-74,42	[1215,948]	[1217,949]	623294,00	202,00	211,00	211,00
3	#3	1029,00	171,20	52,20	36,43	[71,931]	[73,932]	220206,00	209,00	214,00	214,00
4	#4	5025,00	262,11	80,89	8,53	[1289,912]	[1290,913]	1075350,00	199,00	214,00	212,00
5	#5	485,00	101,33	38,90	17,97	[21,939]	[23,940]	104275,00	211,00	215,00	215,00
6	#6	3829,00	372,23	96,01	-67,98	[465,867]	[467,868]	815577,00	205,00	213,00	212,00
7	#7	966,00	141,23	43,42	-51,55	[341,842]	[343,843]	206724,00	209,00	214,00	214,00
8	#8	1586,00	175,44	53,91	40,49	[504,830]	[506,831]	334646,00	203,00	211,00	211,00
9	#9	2,00	2,00	1,00	90,00	[415,843]	[417,844]	434,00	217,00	217,00	217,00
10	#10	3,00	4,41	1,41	45,00	[448,798]	[450,799]	651,00	217,00	217,00	217,00
11	#11	1957,00	164,02	51,87	19,13	[851,707]	[853,708]	409013,00	200,00	209,00	208,00
12	#12	258,00	82,25	26,63	55,71	[971,670]	[973,671]	55728,00	214,00	216,00	216,00
13	#13	1557,00	204,72	61,68	16,97	[282,654]	[284,655]	330084,00	205,00	212,00	212,00
14	#14	961,00	130,23	42,54	60,42	[652,656]	[654,657]	204693,00	208,00	213,00	214,00
15	#15	1659,00	183,34	58,31	30,96	[1021,651]	[1023,652]	351708,00	204,00	212,00	212,00
16	#16	997,00	141,47	47,51	30,34	[744,648]	[746,649]	211364,00	207,00	212,00	212,00
17	#17	19,00	13,07	4,47	63,43	[959,657]	[961,658]	4123,00	216,00	217,00	217,00
18	#18	678,00	112,57	40,46	-39,99	[670,618]	[672,619]	145092,00	209,00	214,00	214,00
19	#19	5,00	9,66	2,00	90,00	[696,583]	[698,584]	1085,00	217,00	217,00	217,00
20	#20	7542,00	469,17	140,29	-7,78	[1092,517]	[1094,518]	1583820,00	202,00	210,00	211,00
21	#21	1451,00	180,10	47,01	66,16	[447,539]	[449,540]	309063,00	206,00	213,00	213,00
22	#22	753,00	103,50	35,06	3,27	[218,498]	[220,499]	160389,00	209,00	213,00	213,00
23	#23	1131,00	152,61	48,27	-13,17	[454,491]	[456,492]	239772,00	205,00	212,00	211,00
24	#24	1621,00	249,97	74,65	-50,98	[69,467]	[71,468]	343652,00	207,00	212,00	212,00
25	#25	2077,00	291,39	70,88	16,39	[300,455]	[303,456]	440324,00	205,00	212,00	212,00

Kuva 22. Results-ikkuna.

Jotta kahden eri kuvan samojen solujen intensiteettejä pystyttiin vertaamaan, täytyi jokaiselle erotetulle kohteelle eli solulle löytää vastaavuus toisen kuvan tuloksista. Vastaavat kohteet pyritään löytämään kohteiden koordinaattien perusteella (centroid). Kun vastaavat kohteet oli löydetty, voitiin vastaavien solujen intensiteettien suhteesta määrittää solunsisäinen pH standardikäyrän määrittämisen jälkeen.

6.8 Luottamusvälien laskeminen standardin ISO 8466–2:2001(E) mukaisesti matriisikaavoilla

ISO 8466–2:2001(E) standardin mukaan epälineaarisen toisen asteen kalibrintifunktioiden virherajat voidaan laskea kaavan 2 mukaan. Standardin mukainen menetelmä on tarkoitettu ensisijaisesti vesianalytiikkaan. Koska toisen asteen kalibrintikäyrien virhearvioinnit ovat vain approksimaatioita, päätettiin työn virhearvioinnissa käyttää kyseistä standardoitua tapaa. [27.]

$$I(\hat{x}) = \frac{s_{res} \cdot t_{1-\alpha/2, n-3}}{(b + 2c\hat{x})} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2 Q_{x^4} + \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N}\right)^2 Q_{xx} - 2(\hat{x} - \bar{x}) \left(\hat{x}^2 - \frac{\sum x_i^2}{N}\right) Q_{x^3}}{Q_{x^4} Q_{xx} - (Q_{x^3})^2}}$$
(2)

\hat{x} on näytteen laskettu arvo, joka on saatu mittaustuloksesta \hat{y} , käyrän yhtälöstä laskemalla

$I(\hat{x})$ on näytteen lasketun arvon virheraja

s_{res} on residuaalien keskihajonta

t on t-jakauma, jossa vapausasteita $N-3$ ja luottamusväli esim. 95 %

b on kalibrintifunktion kerroin ($y = a + bx + cx^2$)

c on kalibrintifunktion kerroin ($y = a + bx + cx^2$)

N on kalibroinnissa käytettyjen standardinäytteiden määrä

\hat{N} on näytteestä tehtyjen toistojen lukumäärä

\bar{x} on keskiarvo standardinäytteiden pH-arvoista

x_i on näytteen pH-arvo i :lle näytteelle

$$Q_{x^4} \text{ on } \sum x_i^4 - \frac{(\sum x_i^2)^2}{N}$$

$$Q_{xx} \text{ on } \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$Q_{x^3} \text{ on } \sum x_i^3 - \left(\sum x_i \times \frac{\sum x_i^2}{N} \right)$$

Luottamusvälit saatiin ratkaistua kaavalla 3 [27.]

$$\hat{x}_{\text{luottamusväli}} = \hat{x} \pm I(\hat{x})$$
(3)

Koska summafunktioilla laskeminen on hyvin työlästä ja laskuvirheitä sattuu helposti, käytettiin työssä matriisikaavoja virherajojen ratkaisussa.

Standardin mukainen luottamusvälien ratkaisu perustuu siihen, että standardikäyrälle piirretään saadun tuloksen mukaiseen pisteeseen (x_0, y_0) tangentti. Liikkumalla pisteestä (x_0, y_0) y:n hajonnan verran ylös ja alas ja siirtymällä näistä pisteistä tangentille saadaan

tuloksen luottamusvälit laskettua jakamalla vasteen luottamusväli tangentin kulmakertoimella.

Käyrän pisteeseen (x_0, y_0) piirretty tangentin kulmakerroin saadaan derivoimalla käyrän yhtälö:

$$\begin{aligned} y &= a + bx + cx^2 \\ y' &= b + 2cx \end{aligned} \quad (y = \text{intensiteettien suhde, } x = \text{pH})$$

Saadun tuloksen (\hat{x}) luottamusvälit saadaan siis ratkaistua kaavalla 4.

$$I(\hat{x}) = \frac{I(\hat{y})}{b + 2cx} \quad (4)$$

$I(\hat{y})$:n luottamusvälit saadaan ratkaistua kaavalla 5 [28, s. 235.]

$$I(\hat{y}) = \pm t_{1-\alpha/2; n-3} \cdot \hat{\sigma}_{\hat{y}} \quad (5)$$

jossa $\hat{\sigma}_{\hat{y}}$ on \hat{y} :n keskihajonta.

$\hat{\sigma}_{\hat{y}}$:n laskemiseen tarvitaan kovarianssi-matriisiä $\hat{\Sigma}$, joka lasketaan kaavan 6 avulla [28, s. 231.]

$$\hat{\Sigma} = (\mathbf{X} \cdot \mathbf{X}^T)^{-1} \times s_{res}^2 \quad (6)$$

jossa \mathbf{X} on matriisi

$$\begin{bmatrix} 1 & \hat{x}_1 & \hat{x}_1^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \hat{x}_n & \hat{x}_n^2 \end{bmatrix}$$

$\hat{\sigma}_{\hat{y}}^2$ saadaan ratkaistua kovarianssi-matriisin avulla kaavasta 7 [28, s. 210.]

$$\hat{\sigma}_{\hat{y}}^2 = \frac{s_{res}^2}{r} + x_u \cdot \hat{\Sigma} \cdot x_u^T \quad (7)$$

r on näytteen toistomittausten lukumäärä

$$x_u \text{ on } [1 \quad x \quad x^2]$$

Vasteesta lasketun pH:n luottamusvälit saadaan siis ratkaistua kaavalla 8.

$$\hat{x}_{\text{luottamusvälit}} = \hat{x} \pm I(\hat{x}) \quad (8)$$

7 Tulokset

7.1 SNARF-4F- värillä värjätyt hiivasolut

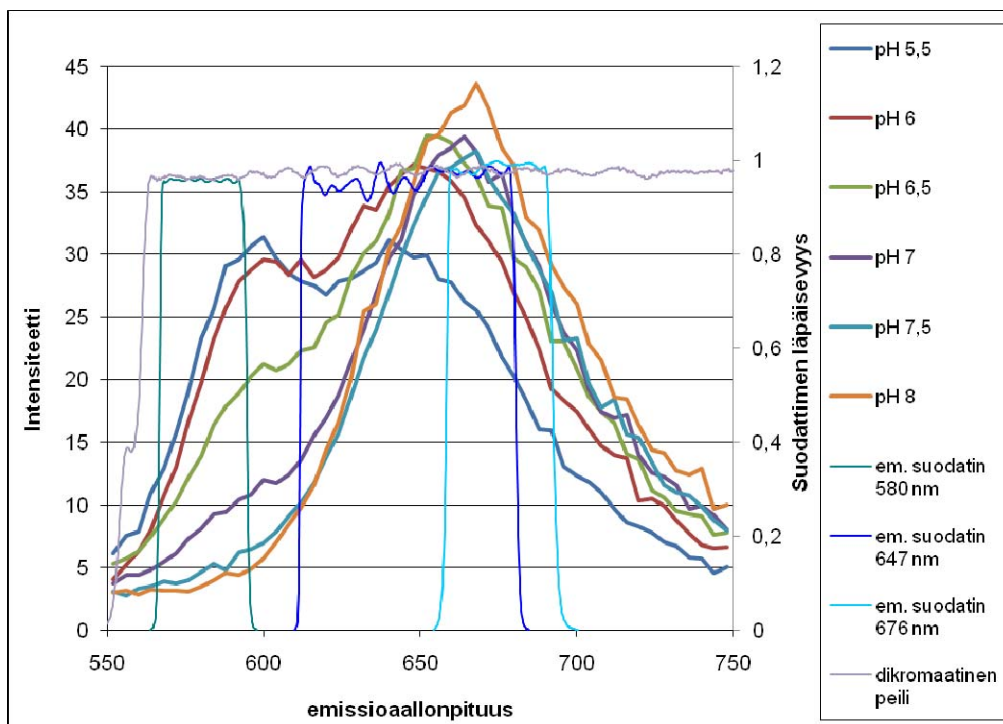
7.1.1 SNARF-4F- värin spektrien määrittäminen

SNARF-4F-värjättyjen solujen eksitaatio- ja emissiospektrit määritettiin kalibroitikäyrän solunäytteistä fluoresenssispektroskoopilla. Näytteisiin otettiin eksponentiaalisen kasvuvaiheen soluja 5 ml ($OD_{600} = 0,5$), jotta intensiteettitaso saatiin erottumaan taustakohinasta.

Analyysiin tehtiin kontrollinäytteet pelkistä soluista ja pelkästä SNARF-4F-liuoksesta McIlvaine-puskuriin pH 3 sekoitettuna. Kontrollien tarkoituksena oli selvittää taustan määrää. Solukontrolli tehtiin sentrifugoimalla solut ja lisäämällä solupelletin päälle McIlvaine pH-puskuria 7. SNARF-4F-kontrolli tehtiin laimentamalla SNARF-4F-kantaliuosta 500-kertaisesti McIlvaine-puskurilla pH 7.

Vallin ym. tutkimuksen mukaan solujen intensiteettien tuli laskea kun pH_i nousi, emissioaallonpituuden ollessa noin 580 nm, kun taas emissioaallonpituudella noin 647 nm intensiteettien tuli nousta pH_i :n noustessa [2]. Fluoresenssispektroskoopilla analysoidut näytteet vastasivat Vallin ym. tutkimuksen tuloksia. Kuvassa 23 esitettyjen näytteiden intensiteetit eivät välttämättä laskeneet/nousseet pH_i :n mukaan järjestyksessä, koska näytteiden solumäärä ei ollut absoluuttisesti sama jokaisessa näytteessä, sillä näytteiden välillä saattoi olla vaihtelua värjäytyneiden solujen määrässä.

Tuloksista (liite 1 ja 2) selvitettiin eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien intensiteettien huiput. Intensiteetit olivat korkeimmillaan emissioaallonpituuksilla noin 580 nm ja 676 nm (liite 1) ja eksitaatioaallonpituudella noin 523 nm (liite 2). Kuvassa 23 on esitetty kaikkien näytteiden intensiteetit emissioaallonpituuden funktiona eksitaatiosuodattimen ollessa 523 +/- 15 nm.

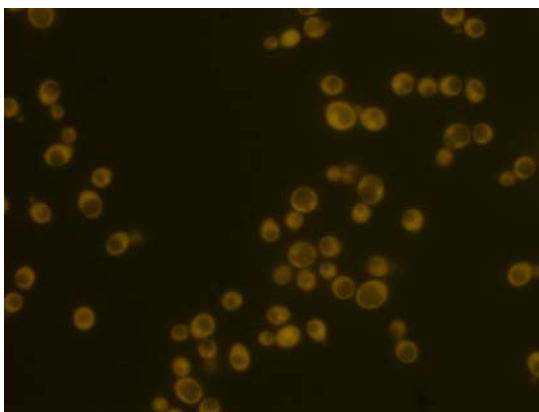


Kuva 23. Standardikäyrän näytteiden intensiteetit eksitaatioaallonpituudella 523 nm emissioaallonpituuden funktiona sekä suodattimien läpäisevyudet aallonpituuden funktiona.

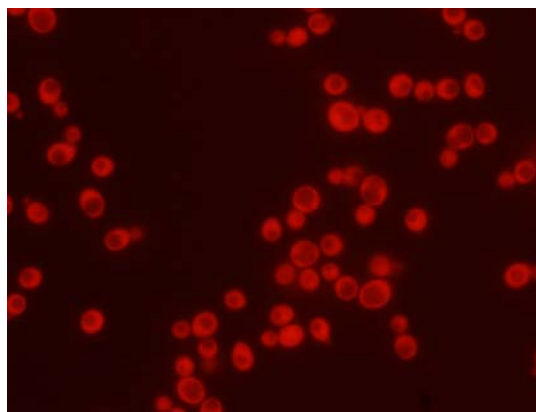
SNARF-4F-väriin eksitaatio- ja emissiohuippujen selvittyä valittiin fluoresenssimikroskoopin suodattimista emissioaallonpituushuippuja lähellä olevat suodattimet. Suodattimet valittiin niin, että suodattimien suodattamat alueet eivät olleet päällekkäin ja että suodattimet suodattivat vain yhtä emissiopeikkiä kerrallaan. Näin emissiopeikkien intensiteetit pystyttiin mittaamaan fluoresenssimikroskoopilla erillisinä. Optimaalisimmiksi eksitaatiosuodattimiksi valittiin molemmille kromoforeille 523 +/- 15 nm ja emissiosuodattimiksi valittiin 580 nm +/- 23 nm ja 676 nm +/- 29 nm. Jatkotutkimuksissa kuitenkin huomattiin, että jostain syystä emissiosuodattimella 676 nm ei saatu näkymään lainkaan fluoresoivia soluja, joten päädyttiin käyttämään laajemman aallonpituuden emissiosuodatinta 647 nm +/- 57 nm. Suodatinkuutioihin valittiin lisäksi dikromaattiset peilit, jotka heijastivat vain eksitaatiosuodattimen maksimia suuremmat aallonpituudet detektorille, jolloin pystyttiin estämään eksitaatiovalon suora pääsy detektorille.

7.1.2 Kalibrintikäyrän määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla

Fluoresenssimikroskoopilla analysoidut kalibrintikäyrän määrittäykset SNARF-4F-värjättyille soluille suoritettiin käyttäen suodatinkuutiopareja (eks. 485 nm & em. 580 nm) ja (eks. 485 nm & em. 647 nm) sekä suodatinkuutiopareja (eks. 523 nm & em. 580 nm) ja (eks. 523 nm & em. 647 nm) tehden molemmille pareille kaksi toistoa. Kuvattujen solujen intensiteettien arvot määritettiin kuvankäsittelyohjelmalla. Intensiteettien arvot määritettiin kuvasta mahdollisimman monelle solulle. Esimerkkikuvat SNARF-4F-värjättyjen solujen fluoresenssimikroskooppikuvista on esitetty kuvissa 24 ja 25.

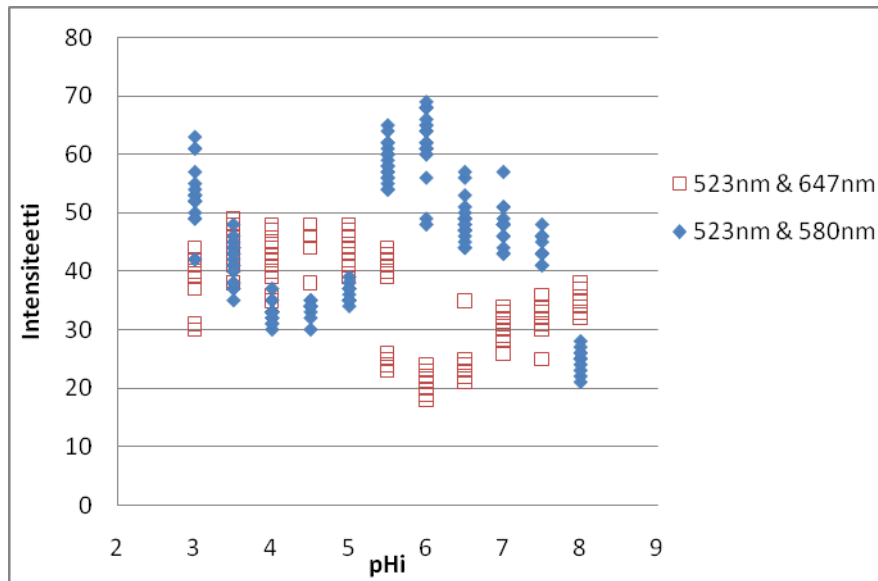


Kuva 24. pH 6, suodatinkuutio (523 nm & 580 nm).



Kuva 25. pH 6, suodatinkuutio (523 nm & 647nm).

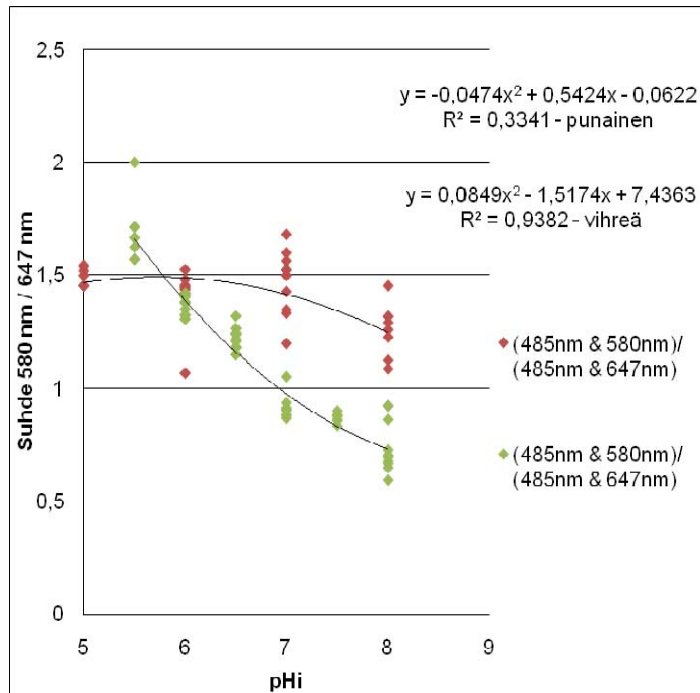
Näytteiden intensiteettien jakauma määritettiin pH-puskurialueella 3–8 kahdella eri suodatinkuutiolla. Havaittiin, että SNARF-4F-värin pH-riippuvuus ei toiminut pH-puskuriliuoksen ollessa alle 6 (kuva 26), sillä intensiteettien riippuvuus pH_i :stä ei ollut lineaarista pH-arvon ollessa alle 6. Täten kalibrintikäyrien määrittämistä jatkettiin pH-alueella 5,5–8.



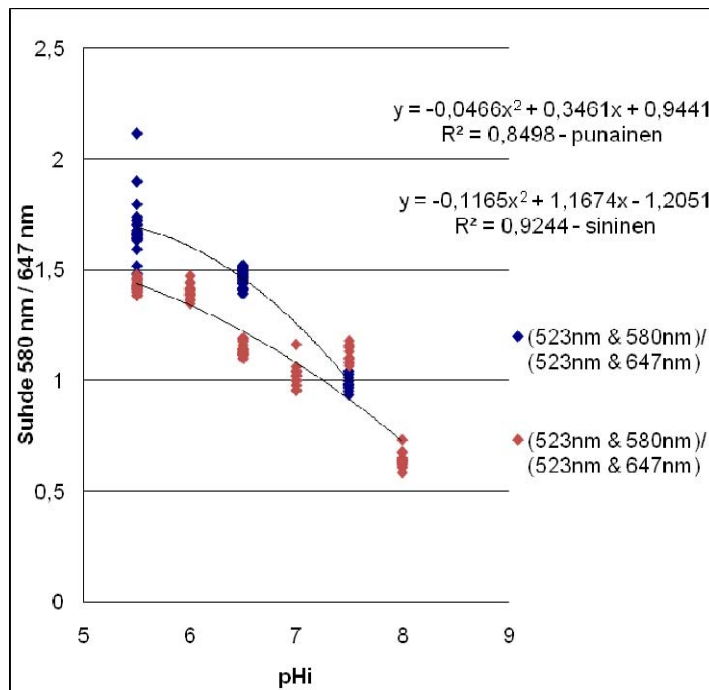
Kuva 26. Solujen intensiteetit suodatinkuutiolla 523 nm & 647 nm ja suodatinkuutiolla 523 nm & 580 nm.

Vallin ym. tutkimuksen tulokset osoittivat, että SNARF-4F-värjättyjen solujen kalibrointikäyrä noudatti toisen asteen polynomikäyrää, eli kun solunsisäinen pH kasvoi, fluoresenssien intensiteettien suhde kahdella eri suodatinkuutioparilla (580 nm/670 nm) mitattuna laski (kuva 12) [2]. Fluoresenssimikroskoopilla määritetyt pisteet sovitettiin tyydyttävästi laskevaan toisen asteen käyrään (kuvat 27 ja 28), kahdella erilaisella suodatinkuutioparilla. Tulokset eivät kuitenkaan olleet toistettavia eivätkä niiden kulmakertoimet olleet tarpeeksi suuria, jotta eri pHi:n arvoille olisi saatu tarpeeksi laaja intensiteetin alue. pHi:n määrittäminen koesarjan näytteistä kyseisillä kalibraatiokäyrillä ei siis ollut kovinkaan luotettavaa.

Fluoresenssimikroskoopin suodattimet on esitetty kuvissa 27 ja 28 muodossa $(x \& y)/(z \& w)$, missä x ja y ovat ensimmäisen suodatinkuution eksitaatio- ja emissiosuodatin sekä z ja w toisen suodatinkuution eksitaatio- ja emissiosuodatin. Näillä suodatinkuutioilla määritetyt intensiteettien arvot on jaettu keskenään erikseen jokaiselle solulle ja eri näytteiden pisteisiin on sovitettu toisen asteen käyrä. Kalibrointikäyrän avulla voitiin tulevissa koesarjoissa määrittää solujen pHi-arvo.



Kuva 27. Kalibrointikäyrien määrittäminen suodattimilla (485 nm & 580 nm) ja (485 nm & 647 nm).



Kuva 28. Kalibrointikäyrien määrittäminen suodattimilla (523 nm & 580 nm) ja (523 nm & 647 nm).

Vallin ym. [2] tutkimuksessa kalibroinnin näytekäyrät sovitettiin parabeliin. Paraabelin ongelmana oli kuitenkin käyrän kaareutuva ominaisuus, jolloin samalla intensiteetin arvolla voitiin saada kaksi eri pH_i -arvoa. Lisäksi kalibrointikäyrän ulkopuolisia pisteitä

ei voinut määrittää, jos näytteen intensiteettien suhde meni alle korkeimman pH-arvon (näyte pH 8) intensiteetin.

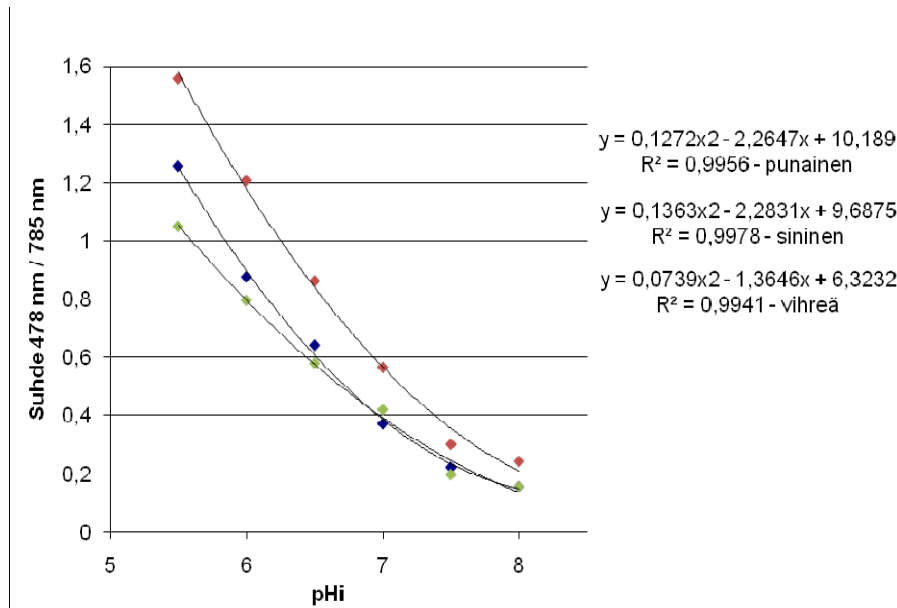
Jotta fluoresenssimikroskoopilla olisi päästy tarkempiin tuloksiin määritettyjen näytteiden kohdalla, olisi toisenlaisen kalibrointikäyrän sovittaminen määritettyihin kalibrointinäytteiden pisteisiin saattanut parantaa hieman pisteiden sovittuvuutta käyrään. Esimerkiksi kalibrointikäyrä, jolla x-akseli olisi käyrän asymptootti, kyettäisiin määrittämään myös kalibrointikäyrän ulkopuolisten pisteiden pH_i -arvot.

Jos tehtyjen kokeiden tulokset olisivat olleet lähempänä Vallin ym. [2] tuloksia, olisi pisteisiin voitu yrittää sovittaa paremmin sovittuvia kalibrointikäyriä, jolloin tulosten tarkkuus olisi voinut parantua ja käyrän ulkopuolisten pisteiden määrittäminen onnistua. Koska kokeet eivät kuitenkaan onnistuneet toivotulla tavalla, ei kannattanut nähdä suurempaa vaivaa paremman kalibrointikäyrän määrittämiseksi, koska tällöin myös esimerkiksi virherajojen laskeminen olisi voinut monimutkaistua.

7.1.3 Kalibrointikäyrän määrittäminen virtausytometrillä

SNARF-4F-värjätyille soluille määritettiin kalibrointikäyrä analysoiden näytteet virtausytometrillä. Analyysit suoritettiin eksitoimalla näytteitä 488 nm laserilla ja keräämällä emissio emissiosuodattimilla 578 nm ja 785 nm. Analyysejä tehtiin kolmena eri analyysikertana. Liitteessä 5 on esitetty esimerkki SNARF-4F-värjätyjen solujen virtausytometritulostuksesta. Liitteen 5 kuvista havaitaan, että SNARF-4F-väri on jakautunut eri soluihin melko tasaisesti, sillä fluoresenssijakauma on melko kapea.

Näytteiden pisteet asettuivat hyvin toisen asteen kalibrointikäyrälle (kuva 29), mikä ilmeni korkeina R^2 :n arvoina. Käyrien jyrkkyydet olivat myös riittäviä, sillä virtausytometrillä saatiin aikaiseksi suurempi otos näytteestä, jolloin tuloksetkin olivat luotettavampia. Tällöin pienet vaihtelut saman näytteen intensiteeteissä eivät vaikuttaneet ratkaisevasti tuloksiin.



Kuva 29. Virtaussytometrillä määritettyjen kalibrointikäyrien vertailu, eksitaatiolaser 488 nm ja emissiosuodattimet 578 nm ja 785 nm.

Kalibrointikäyrien määrittämisen jälkeen tutkittiin, ovatko kalibrointikäyrät toistettavissa eli tarvitseeko jokaisena analyysikertana näytteille määrittää uusi kalibrointikäyrä. Tätä varten laskettiin kalibrointikäyrien luottamusvälit kalibrointikäyrien pisteistä.

Luottamusväli kertoi tuloksen olevan 95 %:n varmuudella luottamusvälin arvojen sisällä. Intercept kuvasi käyrän leikkauspistettä, pH kuvasi käyrän kulmakerrointa ja $(\text{pH}-7)^2$ käyrän kaarevuutta. Mikäli kolmen edellä mainitun tekijän luottamusvälit eivät olleet kolmen kalibrointikäyrän välillä päällekkäisiä, erosivat kalibrointikäyrät sen tekijän suhteen osalta merkittävästi toisistaan. Luottamusvälien tuloksista (taulukko 3 - 5) havaittiin kalibrointikäyrien eroavan toisistaan merkittävästi kaikissa kolmessa suhteessa. Tulokset siis osoittivat, että jokaiselle koesarjalle tuli määrittää oma kalibrointikäyrä pH_i :n laskemista varten.

Kalibrointikäyrien luottamusvälit:

Taulukko 3. Punaisen kalibrointikäyrän luottamusvälit.

	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	3,35552675	4,560170934
pH	-0,566636426	-0,402218528
$(\text{pH}-7)^2$	0,034280225	0,220050314

Taulukko 4. Sinisen kalibrointikäyrän luottamusvälit.

	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	2,65805258	3,35520003
pH	-0,421835739	-0,3266844
(pH-7)²	0,082591073	0,19009929

Taulukko 5. Vihreän kalibrointikäytän luottausvälit.

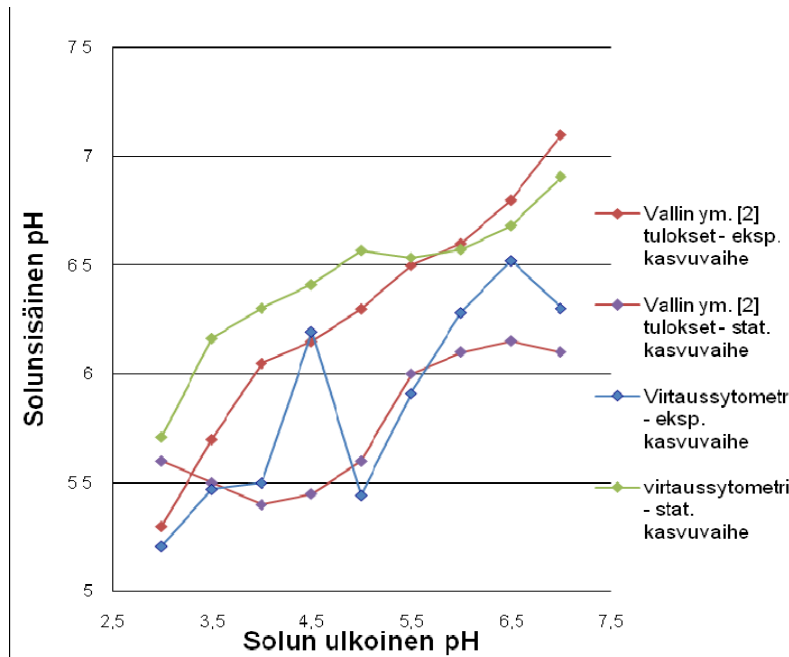
	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	2,236750029	3,16621317
pH	-0,393283714	-0,2664244
(pH-7)²	0,002245829	0,14557981

Verrattaessa virtaussytometrillä määritettyjä kalibrointikäyriä (kuva 29) fluoresenssimikroskoopilla (kuva 27 ja 28) määritettyihin havaittiin, että virtaussytometrillä toistettavuus on kuitenkin fluoresenssimikroskooppia parempi ja että määritetyt pisteet soveltuvat paremmin toisen asteen käyrälle (suurempi R^2).

7.1.4 Ulkoisen pH:n vaikutus pH_i -arvoon

SNARF-4F-värjättyjen solujen ulkoisen pH:n vaikutusta pH_i -arvoon, eksponentiaalisen- ja stationääriseen kasvuvaiheen soluille tutkittiin Vallin ym. [2] tutkimuksessa tehdyn kokeen mukaisesti, analysoimalla näytteet virtaussytometrillä. Kokeella haluttiin selvittää, saadaanko tulokset vastaamaan Vallin ym. [2] tuloksia, jos koeolosuhteet ovat samat.

Eksponentiaaliseen ja stationääriseen kasvuvaiheeseen kasvatetut solut värjättiin, minkä jälkeen soluja inkuboitiin ravistelijassa yksi tunti McIlvainen puskureissa pH 3-7, lämpötilan ollessa 30 °C. Inkuboitujen solujen pH_i :t analysoitiin virtaussytometrillä. Tulokset ovat esitetty kuvassa 30.



Kuva 30. Eksponentiaalisessa ja stationäärissä kasvuvaiheessa olevien solujen solunsisäisen pH:n muuttuminen ulkoisen pH:n funktiona virtaussytometrillä analysoituina sekä Vallin ym. [2] määrittämänä.

Vallin ym. tutkimuksen tulokset osoittivat (kuva 30, Vallin ym. tulokset), että stationäärivaiheen ja eksponentiaalisen kasvuvaiheen solujen pH_i :t käyttäytyivät hyvin erilailla inkuboitessa näytteitä eri pH-puskureissa. Eksponentiaalisen kasvuvaiheen solut osoittivat jatkuvaa pH_i :n kasvua, kun ulkoinen pH nousi. Stationäärivaiheen solut taas pystyivät ylläpitämään melko tasaisen pH_i :n, alun pienen pH_i :n laskun jälkeen, kun ulkoinen pH nousi. Stationäärisen kasvuvaiheen solut olivat siis yleisesti ottaen vähemmän alttiita ympäristön muutoksille (stressitekijät) kuin eksponentiaalisen kasvuvaiheen solut, eli stationäärivaiheen solut kykenivät ylläpitämään optimaalista pH_i :ta paremmin. [2.]

Virtaussytometrillä analysoiduista tutkimuksen tuloksista (kuva 30) havaittiin, että stationäärivaiheen solujen pH_i -arvot käyttäytyivät solun ulkoisen pH:n muuttuessa Vallin ym. [2] määrittämien eksponentiaalisen kasvuvaiheen näytteiden mukaisesti. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että todellisuudessa analyysien stationäärivaiheen solut olivatkin vielä eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, sillä solut olivat kasvaneet vain yön yli eli noin 18 tuntia. Vallin ym. tutkimuksessa stationäärisen kasvuvaiheen solut olivat kasvaneet 70 tuntia ennen analysointia. Täten stationäärisen kasvuvaiheen solut ja Vallin ym. määrittämät eksponentiaalisen kasvuvaiheen solut ovat paremmin vertailukelpoisia keskenään.

Virtaussytometrillä analysoitujen SNARF-4F-värjättyjen solujen stationäärisen kasvuvaiheen tulokset saatiin siis vastaamaan melko hyvin Vallin ym. määrittämiä eksponentiaalisen kasvuvaiheen solujen tuloksia. Stationäärisessä kasvuvaiheessa olevien solujen pH_i kasvoi ulkoisen pH:n noustessa, kuten Valli ym. [2] kuvasivat eksponentiaalisen kasvuvaiheen solujen käyttäytyvän. Täten voidaan päätellä, että pH_i :n määrittämisen onnistuminen ei todennäköisesti ollut kiinni SNARF-4F-väristä tai kannasta, vaan pikemminkin analyysilaitteesta. Fluoresenssimikroskoopi ei siis todennäköisesti soveltunut analyysimenetelmänä fluoresoivalla SNARF-4F-värillä värjättyille soluille.

Koska eksponentiaalisen kasvuvaiheen solut eivät olleetkaan vielä saavuttaneet haluttua kasvuvaihetta, ei tuloksia voinut verrata tehtyihin tutkimuksiin. Määritettäessä eksponentiaalisen kasvuvaiheen solujen pH_i :tä on määrittämisessä myös saattanut käydä jokin virhe, sillä kun solujen ulkoinen pH oli 4,5, solujen intensiteetti oli hyvin paljon korkeampi kuin näytteillä, joiden ulkoinen pH-arvo oli 4 ja 5.

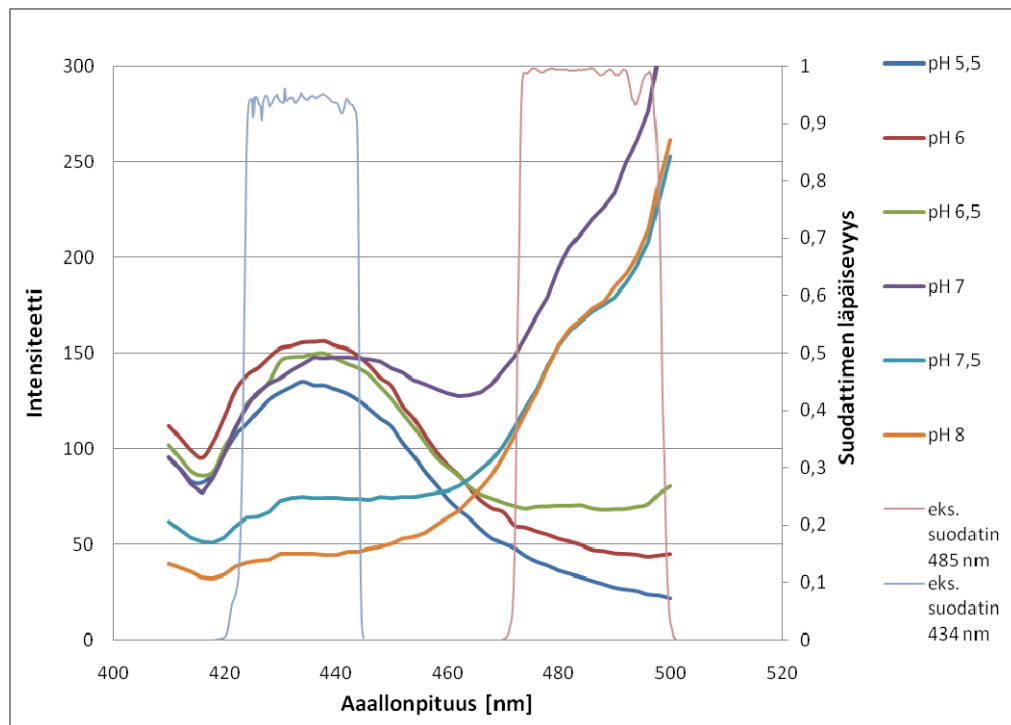
Vaikka SNARF-4F-värjättyjen solujen pH_i :n määrittämismenetelmä fluoresenssimikroskoopilla olisikin saatu toimimaan, ei sen soveltuvuus bioreaktorikasvatukseen olisi todennäköisesti kuitenkaan ollut kovikaan hyvä. Ongelmaksi SNARF-4F-värisä olisi muodostunut se, että solut olisi täytynyt sentrifugoida, permeabilisoida ja inkuboida puskuriliuoksessa, ennen kuin solujen pH_i :tä olisi kyetty määrittämään. Puskuriliuoksen käyttö olisi ollut pakollista, koska kasvatusliuos sisälsi aminohappoja ja vitamiineja, jotka kykenivät pilkkomaan väriaineen esterin. Puskuriliuoksen käyttö sekä permeabilisointi olisivat todennäköisesti muuttaneet kasvatusliuoksessa olevien solujen alkuperäisiä pH_i -arvoja, sillä myös solun muut ulkopuoliset olosuhteet kuin vain fluoresoiva väri olisi saattanut päästä solun sisään värjäytymisen aikana. Tällöin pH_i :n määrittäminen ei olisi ollut enää kovinkaan luotettavaa.

7.2 E²GFP-hiivasolut

7.2.1 E²GFP-solujen spektrien määrittäminen

Määritettiin E²GFP-hiivasolujen spektrit fluoresenssispektrometrillä, kun näytteitä oli käsitelty eri McIlvainen pH-puskureissa kalibrointikäyränäytteiden tavoin. Tulokseksi saatiin kuvan 31 mukaiset spektrit, joista saatiin selville E²GFP:n intensiteettihiippujen kohdat. Eksitaatiohuipuiksi määritettiin 434 nm ja 485 nm (liite 3).

Eksitaatiosuodattimelle 434 nm +/- 17 nm määritettiin optimaaliseksi emissiosuodattimeksi 510 nm +/- 10 nm, ja eksitaatiosuodattimelle 485 nm +/- 20 nm optimaaliseksi emissiosuodattimeksi valittiin pitkän aallonpituusalueen suodatin 500LP (liite 4).



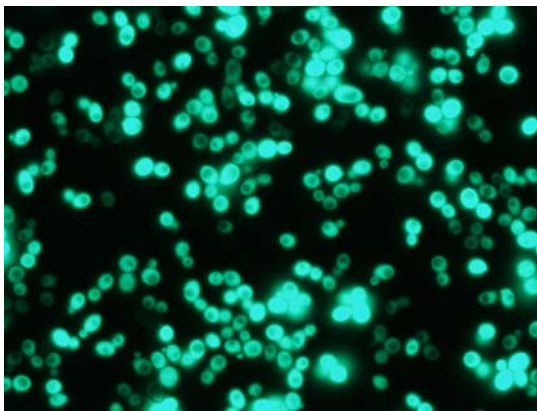
Kuva 31. E²GFP-solujen eksitaatiospektrit emissioaallonpituudella 520 nm sekä eksitaatiosuodattimien läpäisevyydet aallonpituuden funktiona.

E²GFP-solujen intensiteettitasot eivät välttämättä laskeneet/nousseet järjestyksessä pH_i:n noustessa, sillä näytteet eivät sisältäneet absoluuttisesti samaa määrää fluoresoivia soluja.

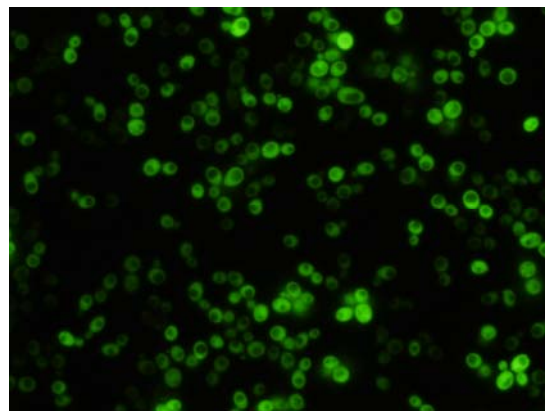
E²GFP-soluille ei voitu määrittää kalibrointikäyriä virtausytometrianalyysillä, sillä virtausytometrissä puuttui eksitaatiolaser aallonpituudella 434 nm. E²GFP-soluille voitiin tehdä kuitenkin virtausytometrillä ajo yhdellä suodatinvälikolla: eksitaatiolaserilla 488 nm ja emissiosuodattimella 519 nm. Tulokset löytyvät liitteestä 6. Tuloksista havaitaan, että E²GFP-soluilla on paljon suurempi intensiteetin jakauma, verrattaessa liitteestä 5 löytyviin SNARF-4F-värjättyjen solujen tuloksiin. Tämä johtuu siitä, että E²GFP-proteiinin ekspressiossa on aina vaihtelua, esimerkiksi fluoresoivan plasmidin määrä eri soluissa ei ole vakio. Tämä ei kuitenkaan häiritse mittauksia, sillä jakamalla kahdella eri suodatinkuutiolla saadut intensiteetin arvot tuloksista saatiin ratiometrisiä, jolloin tuloksiin ei vaikuttanut absoluuttinen värin määrä soluissa.

7.2.2 Kalibrointikäyrän määrittäminen fluoresenssimikroskoopilla

E²GFP-solujen kalibrointikäyrät määritettiin fluoresenssimikroskoopilla suodatinkuutiopareilla (434 nm & 500LP) ja (485 nm & 500LP) kahdella toistolla sekä suodatinkuutiopareilla (434 nm & 510 nm) ja (485 nm & 500LP) kolmella toistolla. Esimerkit E²GFP-solujen mikroskopointikuvista ovat esitetty kuvissa 32 ja 33.



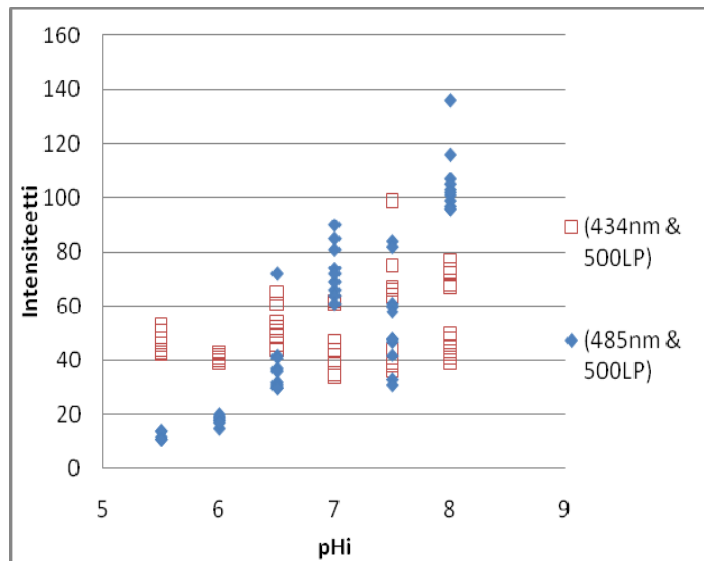
Kuva 32. pH 6, suodatinkuutio (434 nm & 510 nm).



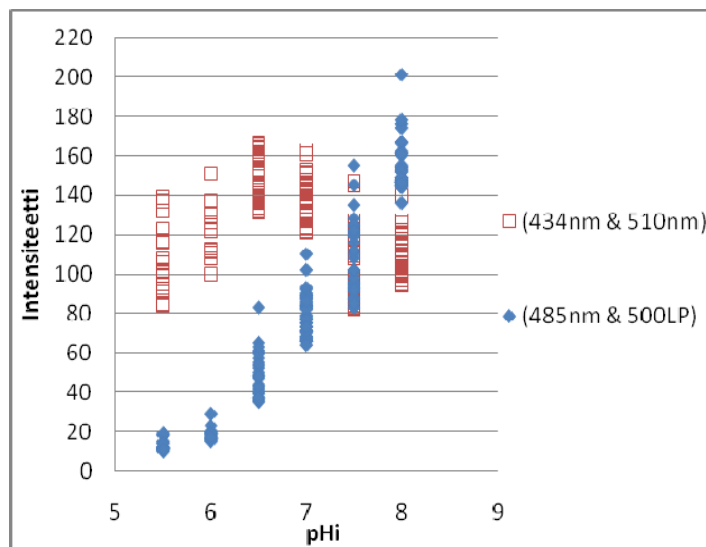
Kuva 33. pH 6, suodatinkuutio (485 nm & 500LP).

Kuvattujen solujen intensiteettien arvot määritettiin kuvankäsittelyohjelmalla mahdollisimman monelle solulle. Solujen intensiteettien jakaumat eri suodatinkuutiopareilla on esitetty kuvissa 34 ja 35. Kuvista havaitaan, että suodatinkuutioilla, joissa oli eksitaatiosuodatin 434 nm, solujen intensiteetit eivät laskeneet pH_i:n noustessa, kuten Bizarrin ym. [8] tutkimuksessa on esitetty.

Eksitaatiosuodattimella 434 nm intensiteettien muutokset riippuivat pH_i :n arvosta hyvin vähän, eikä käyttäytyminen ollut lineaarisesti laskevaa pH -alueella 5,5–8.



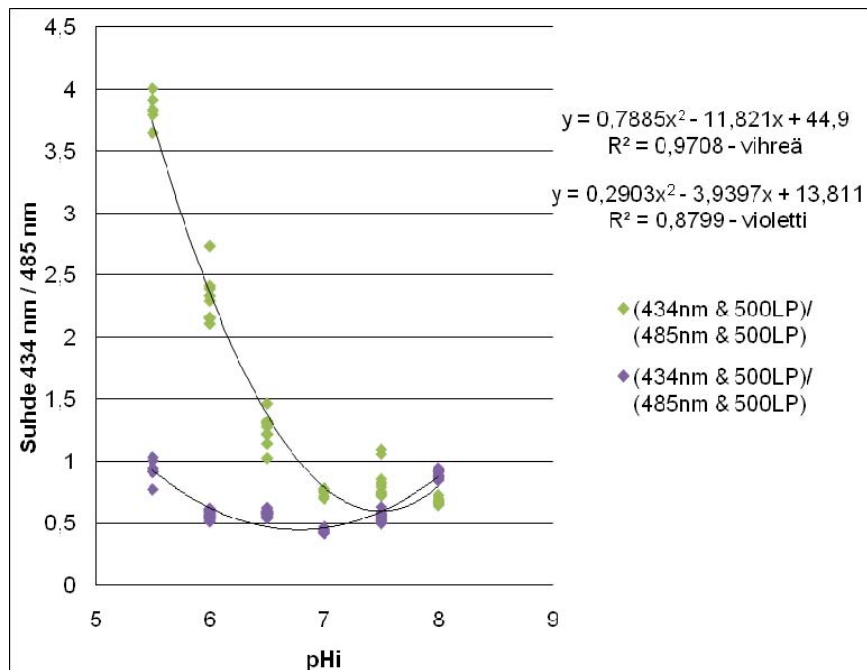
Kuva 34. Solujen intensiteettien jakauma, suodatinkuutioilla (434 nm & 500LP) ja (485 nm & 500LP).



Kuva 35. Solujen intensiteettien jakaumat eri pH :n arvoilla, suodatinkuutioilla (434 nm & 510 nm) ja (485 nm & 500LP).

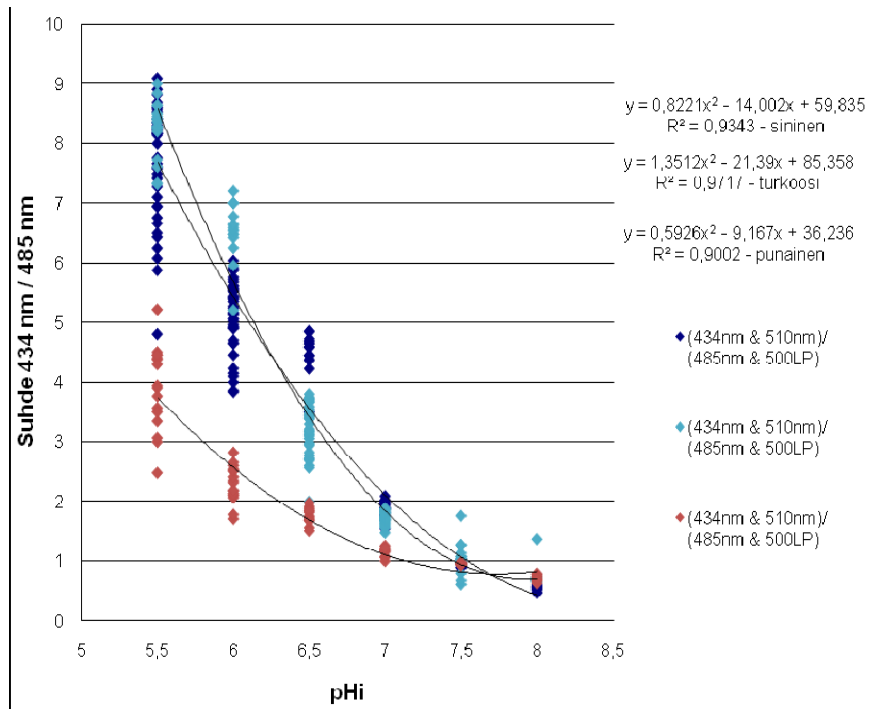
Kuvan 36 kalibrintikäyrät ovat kuitenkin kohtuullisen hyviä tarkasteltaessa pisteiden sovittumista toisen asteen käyrälle ($R^2 = 0,9708$ ja $0,8799$). Kuvan 36 kalibrintikäyrät eivät kuitenkaan olleet optimaalisia, sillä niiden kaarevuus korkeammilla pH -arvoilla oli liian suurta, jolloin sama intensiteetin arvo sai kaksi eri pH_i :n arvoa. Lisäksi kuvan 36 liiloilla pisteillä (suodatinkuutioparit (434nm & 510nm) / (485nm & 500LP)) merkitty kalibrintikäyrä oli aivan liian loiva, jolloin pienikin intensiteetin muutos muutti pH_i :tä rajusti. Tämä ei ollut toivottavaa, sillä solujen intensiteettien määrä vaihteli

solukohtaisesti saman näytteen sisällä, jolloin pH_i :n arvo riippui voimakkaasti siitä, mitkä solut tulivat analysoiduksi.



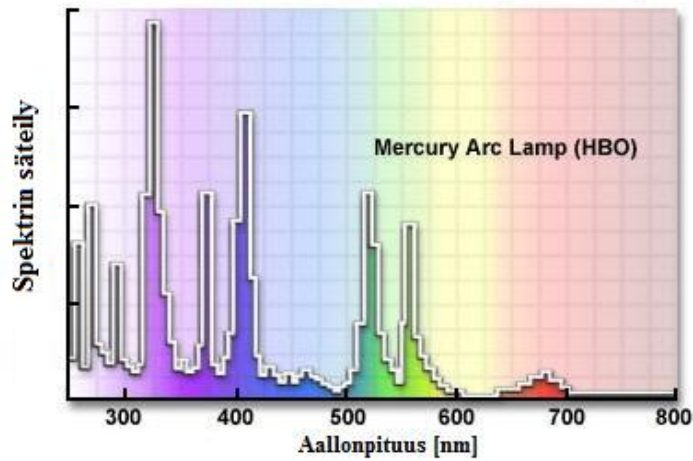
Kuva 36. Kalibrointikäyrien määrittäminen E^2GFP -soluille fluoresenssimikroskoopilla, suodatinkuutiopareilla (434 nm & 500LP)/(485 nm & 500LP).

Suodatinkuutiopareilla (434 nm & 510 nm) ja (485 nm & 500LP) määritetyt kalibrointikäyrät olivat kaarevuudeltaan parempia (kuva 37). Kalibrointikäyrien jyrkkyys oli myös optimaalisempi, jolloin intensiteetin hyvin pieni muutos ei vielä heilauttanut pH_i :n arvoa suuresti, jolloin kuvauksessa ja kuvienkäsittelyssä tapahtuneet virheet eivät näkyneet niin suuresti tuloksissa.



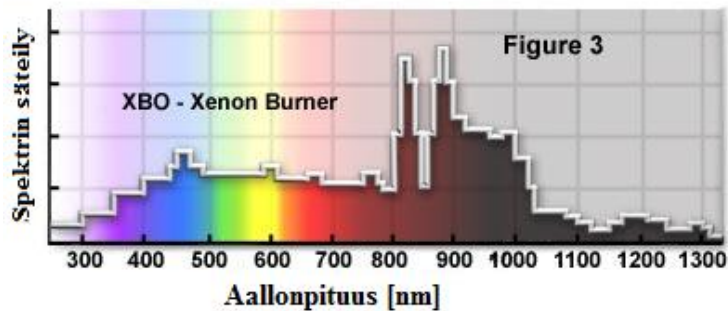
Kuva 37. Kalibrointikäyrien määrittäminen E^2GFP -soluille fluoresenssimikroskoopilla, suodatinkuutiopareilla (434 nm & 510 nm)/(485 nm & 500LP).

E^2GFP :n huono vaste pH_i :n muutoksille eksitaatioaallonpituudella 434 nm saattoi johtua fluoresenssimikroskoopin elohopealampusta, jolla näytteitä valaistiin. E^2GFP :n optimaaliset eksitaatioaallonpituudet olivat fluoresenssispektroskoopilla määritettynä 434 nm ja 485 nm. Elohopealampun emissio oli aallonpituudella 434 nm hyvin korkea, mikä näkyy kuvassa 38 sinisenä piikkinä. Elohopealampun emissio aallonpituudella 485 nm oli taas hyvin paljon matalampi. Koska eri eksitaatiosuodattimilla kuvatut solut altistuvat hyvin erilaiseen eksitaatiovalon määrään, tulokset kahdella eri suodatinkuutiolla mitattuna eivät olleet luotettavasti verrattavissa. Tästä voitiin päätellä, että aallonpituudella 434 nm lampun valo oli todennäköisesti liian kirkas, jolloin näytteiden intensiteetit eivät olleet enää lineaarisella alueella.



Kuva 38. Elohopealampun emissiospektri [17, muokattu.]

Jatkotutkimuksissa kokeet voitaisiin uusia niin, että fluoresenssimikroskoopin valonlähteenä käytettäisiin esimerkiksi ksenonlampua (kuva 39), jolla emissiospektri on melko vakio aallonpituusalueella 434 nm – 485 nm. Tällöin näytteet saataisiin todennäköisesti lineaariselle alueelle molempien eksitaatiohuippujen kohdalla.



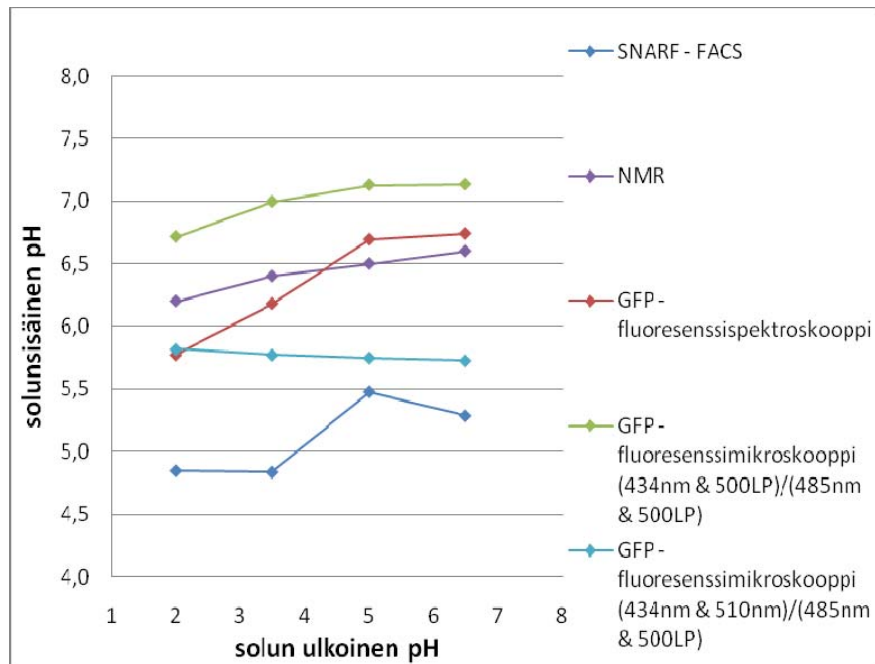
Kuva 39. Ksenon-lampun emissiospektri [17, muokattu.]

7.3 pH_i :n määrittäminen koesarjasta eri analyysimenetelmillä: SNARF-4F-värjätty ja E^2GFP -solu

SNARF-4F-värjättyille soluille sekä E^2GFP -soluille tehtiin koesarja, jossa tutkittiin millainen vaikutus erilaisilla ulkoisilla liuoksilla on solujen sisäiseen pH -arvoon. Koesarjat analysoitiin virtausytometrillä, spektrofotometrillä sekä fluoresenssimikroskoopilla ja tuloksia verrattiin NMR:llä määritettyihin tuloksiin. Kaikki analyysit suoritettiin eri näytteistä ja kullekin analyysimenetelmälle määritettiin oma kalibrointikäyrä. Eri analyysilaitteilla määritetyt tulokset ovat esitetty kuvissa 40–42, joista havaitaan solunsisäisen pH :n muuttuminen ulkoisen pH :n funktiona.

Kuvista 40 ja 41 havaitaan, että SNARF-4F-värillä värjättyjen hiivasolujen pH_i -arvot eroavat selkeästi E^2GFP -soluilla vastaavissa olosuhteissa määritetyistä pH_i -arvoista. SNARF-4F-värjättyillä soluilla solunsisäinen pH on kaikissa tapauksissa E^2GFP -näytteitä alhaisempi. Tämä johtuu luultavasti suurimmaksi osaksi siitä, että SNARF-4F-värillä värjättyt solut permeabilisoitiin. Permeabilisoinnissa solujen läpäisevyyttä parannettiin tarkoituksellisesti, jotta väri saatiin solun sisään. Tällöin on hyvin todennäköistä, että myös muut solun ulkopuolella olleet olosuhteet pääsivät vaikuttamaan solun sisään. Tämän vuoksi ei voida ainakaan suoraan olettaa, että solu kykenisi tällöin ylläpitämään sen luonnollista pH_i :ta.

Fluoresenssimikroskoopilla suodattimilla (434 nm & 500LP)/(485 nm & 500LP) analysoitujen näytteiden tulokset olivat hyvin epäluotettavia (kuvat 40 ja 41), sillä kalibrointikäyrän muoto oli liian kaareutuva (kuva 36, vihreä kalibrointikäyrä), jolloin korkeissa pH_i -arvoissa olleet solut saattoivat saada samalla intensiteetin arvolla kaksi eri pH_i :n arvoa.



Kuva 40. Solujen pH_i :n määrittäminen eri analyysilaitteilla, koesarjan liuoksilla 15 g/l maitohappoa NaCl-liuoksessa (0,9 g/l) pH 2, pH 3,5, pH 5 ja pH 6,5.

Kuvan 40 fluoresenssimikroskoopilla analysoiduille tuloksille määritettiin 95 %:n luottamusvälit, jotka on esitetty taulukoissa 6 ja 7. Luottamusvälit on laskettu standardin ISO 8466–2:2001(E) mukaisesti matriisikaavojen avulla. Tulosten luottamusvälit olivat melko kapeita, mutta tulokset eivät kuitenkaan olleet kaiken kaikkiaan kovin luotettavia, koska fluoresenssimikroskoopin tulokset erosivat NMR:llä ja fluoresenssispektroskoopilla määritetyistä tuloksista noin yhden pH-yksikön verran ja koska kalibrointikäyrät eivät olleet optimaalisia.

Taulukko 6. Fluoresenssimikroskoopin suodatinkuutiopareilla (434 nm & 500LP)/(485 nm & 500LP) mitattujen tulosten 95 %:n luottamusvälit.

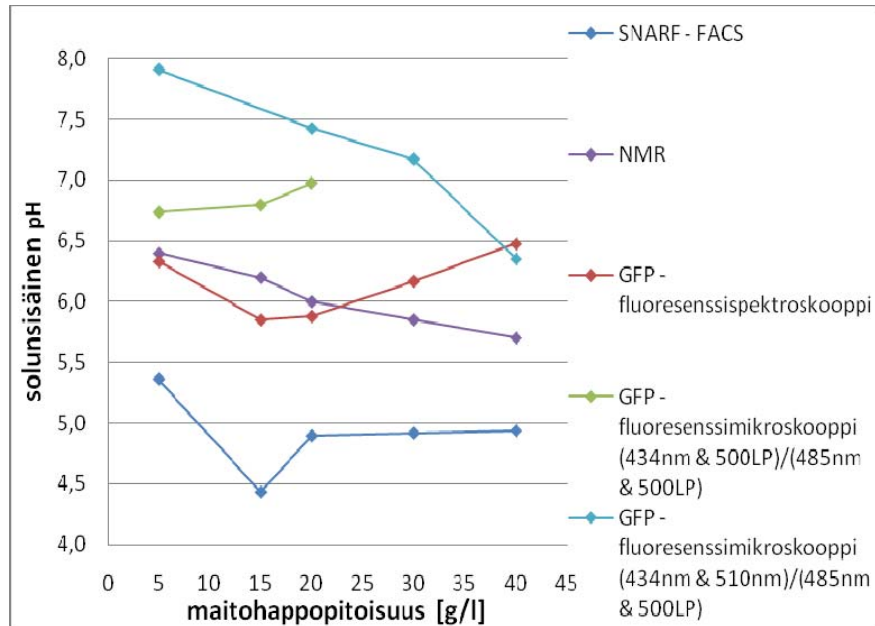
näyte	pH_i	alaraja	yläraja	$I(\hat{x})$
LA (15 g/l) & pH 2	6,72	6,62	6,81	0,10
LA (15 g/l) & pH 3,5	7,00	6,85	7,15	0,15
LA (15 g/l) & pH 5	7,13	6,95	7,31	0,18
LA (15 g/l) & pH 6,5	7,14	6,97	7,30	0,17

Taulukko 7. Fluoresenssimikroskoopin suodatinkuutiopareilla (434 nm & 510nm)/(485 nm & 500LP) mitattujen tulosten 95 %:n luottamusväliä.

näyte	pH_i	alaraja	yläraja	I(\hat{x})
LA 15 g/l, pH2	7,77	7,46	8,08	0,31
LA 15 g/l, pH 3,5	7,48	7,30	7,66	0,18
LA 15 g/l, pH 5	7,54	7,35	7,72	0,19
LA 15 g/l, pH 6,5	7,55	7,36	7,73	0,19

Kuvasta 41 on nähtävissä, että E²GFP-solujen pH_i:n arvot fluoresenssimikroskoopilla ja fluoresenssispektroskoopilla määritettynä eri olosuhteissa eroavat melko merkittävästi toisistaan. Tämä saattaa johtua muun muassa siitä, että fluoresenssispektroskoopilla tehdyissä analyyseissä solupitoisuus oli 10 kertaa suurempi kuin fluoresenssimikroskoopilla analysoidun näytteen kokonaissolupitoisuus. Lisäksi fluoresenssimikroskoopin näytteistä analysoitiin vain noin 20 solua/näyte, jolloin analysoituja soluja oli huomattavasti paljon vähemmän kuin muissa analyysimenetelmissä. Tämä tarkoittaa sitä, että fluoresenssispektroskoopilla määritetyissä analyyseissä otoskoko oli suurempi, jolloin myös tulosten keskivirhe pieneni eli tulosten tarkkuus parani. Suuremmalla solumäärällä olisi voitu saada lisättyä fluoresenssimikroskoopin analyysin tarkkuutta. Otoskoko ei kuitenkaan ollut mahdollista kasvattaa kovinkaan paljon, sillä yhteen kuvaan sai vain rajatun määrän soluja niin, että solut olivat eroteltavissa toisistaan. Lisäksi suuremman solumäärän analysointi olisi tuottanut kuvankäsittelyyn valtavasti lisää töitä.

Fluoresenssimikroskoopin ja fluoresenssispektroskoopin välinen tulosten vaihtelu johtui varmasti myös fluoresenssimikroskoopin valonlähteestä, joka ei ollut E²GFP:lle optimaalinen, jolloin fluoresenssimikroskoopin tulokset eivät olleet kovinkaan todenmukaisia.



Kuva 41. Solujen pH_i :n määrittäminen eri analyysilaitteilla, koesarjan liuoksilla 5 g/l, 15 g/l, 20 g/l, 30 g/l ja 40 g/l maitohappoa NaCl-liuoksessa (0,9 g/l).

Fluoresenssimikroskooppilla määritettyjen näytteiden (kuva 41) solunsisäisten pH-arvojen 95 %:n luottamusvälit ovat esitetty taulukossa 8 ja 9. Luottamusvälit on laskettu standardin ISO 8466–2:2001(E) mukaisesti matriisikaavojen avulla.

Korkeimmilla pH_i :n arvoilla tulosten luotettavuus yleisesti ottaen väheni, sillä intensiteettien pienikin muutos kalibrointikäyrän matalimmassa osassa aiheutti pH_i -arvoon suuren muutoksen.

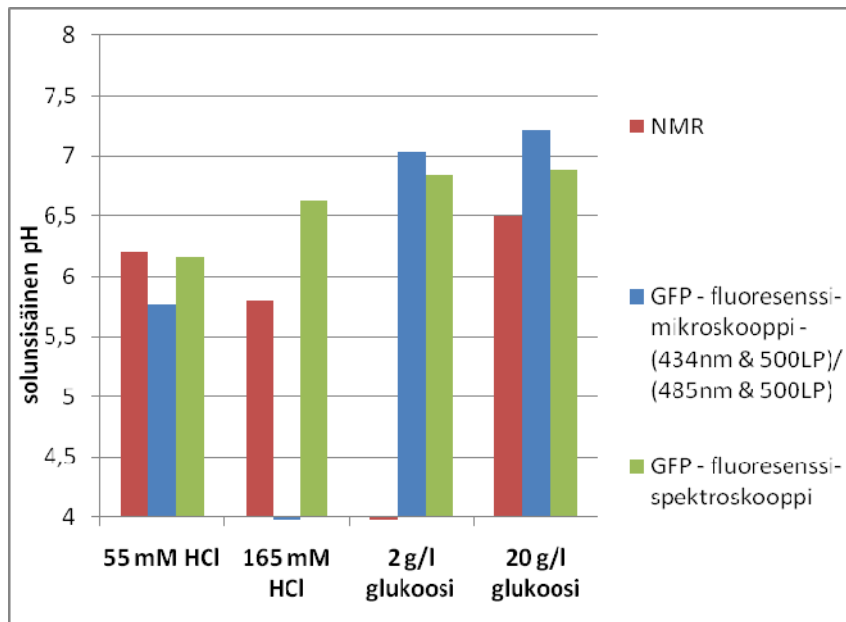
Taulukko 8. Fluoresenssimikroskoopin suodatinkuutiopareilla (434nm&500LP)/(485nm&500LP) mitattujen tulosten 95 %:n luottamusvälit.

näyte	pH_i	alaraja	yläraja	$I(\hat{x})$
LA 5 g/l	6,74	6,64	6,84	0,10
LA 15 g/l	6,80	6,68	6,92	0,12
LA 20 g/l	6,97	6,82	7,13	0,16

Taulukko 9. Fluoresenssimikroskoopin suodatinkuutioparien (434nm&510nm)/(485nm&500LP) tulokset ja tulosten 95 %:n luottamusvälit.

näyte	pH_i	alaraja	yläraja	$I(\hat{x})$
LA 5 g/l	7,89	5,62	10,16	2,27
LA 20 g/l	7,42	7,08	7,27	0,09
LA 30 g/l	7,17	6,29	6,42	0,07
LA 40 g/l	6,35	7,30	7,55	0,13

Kuvista 40–42 havaitaan, että koesarjan tulokset NMR:llä ja fluoresenssispektroskoopilla mitatuina olivat hyvin lähellä toisiaan. Vasta ankarammissa olosuhteissa (matala ulkoinen pH) tulokset poikkesivat enemmän toisistaan. Tämä tulos tukee myös sitä, että fluoresenssimikroskoopin valolähde ei ollut sopiva ja että analysoitujen solujen määrä oli liian alhainen, sillä muilla analyysimenetelmillä E²GFP:lle saatiin keskenään kohtuullisen samanlaisia tuloksia.



Kuva 42. Solujen pH_i:n määrittäminen eri analyysilaitteilla, koesarjan liuoksilla 55 mM ja 165 mM HCl:ä NaCl-liuoksessa (0,9 g/l) sekä 2 g/l ja 20 g/l D-glukoosia YNB-liuoksessa.

Kuvan 42 tulosten 95 %:n luottamusvälit on esitetty taulukossa 10. Luottamusvälit on laskettu standardin ISO 8466–2:2001(E) mukaisesti matriisikaavojen avulla.

Korkeimmilla pH_i:n arvoilla tulosten luotettavuus väheni, sillä intensiteettien pienikin muutos kalibrointikäyrän matalimmassa osassa aiheutti pH_i-arvoon suuren muutoksen.

Taulukko 10. Fluoresenssimikroskoopin suodatinkuutiopareilla (434nm&500LP)/ (485nm&500LP) mitattujen tulosten 95 %:n luottamusvälit.

näyte	pH _i	alaraja	yläraja	I(x̂)
55 mM HCl	5,77	5,71	5,83	0,06
2 g/l Gluc	7,03	6,88	7,18	0,15
20 g/l Gluc	7,22	6,92	7,51	0,30

8 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan solunsisäisen pH:n määrittämiseksi fluoresenssimikroskoopilla. Tutkimuksessa testattiin kalibrointikäyrän määrittämistä sekä koesarjojen pH_i :n määrittämistä myös fluoresenssispektroskoopilla sekä virtausytometrillä. *S. cerevisiae* -hiivan pH_i :n määrittämistä testattiin kahdella erilaisella fluoresoivalla leimalla. Fluoresoivina leimoina käytettiin fluoresoivaa SNARF-4F-väriä, joka tuli siirrostaa soluihin kasvatuksen jälkeen sekä E^2GFP :tä, joka ekspressoitiin hiivasoluihin ennen määrittäystä. Löytämällä menetelmä määrittää pH_i :tä reaaliaikaisesti ja nopeasti voitaisiin päästä bioreaktoreissa parempiin tuotanto-olosuhteisiin.

Tutkimuksen suoritus perustui suurelta osin virtausytometrillä tehtyyn tutkimukseen [2.] Tutkimuksesta saatuja tuloksia verrattiin virtausytometrillä vuonna 2005 saatuihin tuloksiin [2] sekä VTT:llä tehtyihin NMR:llä analysoituihin tuloksiin.

SNARF-4F-värjättyjen solujen kalibrointikäyrän määrittäminen ei onnistunut fluoresenssimikroskoopilla. Tutkimuksessa tehdyt virtausytometrillä määritetyt kalibrointikäyrät saatiin vastaamaan paremmin Vallin ym. [2] tuloksia. Virtausytometrillä määritetyt tulokset vastasivat todennäköisesti paremmin Vallin ym. tuloksia, sillä määrittämisessä pystyttiin analysoimaan tarpeeksi suuri määrä soluja, jotta tuloksista saatiin luotettavia. Virtausytometrianalyseissä havaittiin myös, että kalibrointikäyrä oli määritettävä jokaiselle näyte-erällä erikseen, sillä kalibrointikäyrät eivät olleet toistettavissa.

SNARF-4F-värjättyjen solujen pH_i :n määrittämissä ulkoisen pH:n muutuessa virtausytometrillä analysoituina onnistuivat melko hyvin verrattaessa tuloksia Vallin ym. [2] tutkimuksen tuloksiin. Tulokset olisivat voineet olla vieläkin lähempänä toisiaan, jos toista virtausytometrin emissiosuodatinta ei olisi valittu virheellisesti. Näin ollen SNARF-4F-värjättyjä soluja voisi teoreettisesti ajatella käytettäväksi hiivasolujen pH_i :n määrittämiseen, kun analyysit suoritetaan virtausytometrillä.

Bioreaktorikasvatuksissa SNARF-4F-värin käyttö saattaisi kuitenkin muodostua ongelmaksi, sillä SNARF-4F-värjäys tulisi tehdä kasvatettuihin soluihin. Tällöin

kasvatetut solut täytyisi permeabilisoida ja värjäys tulisi suorittaa erillisessä puskuriliuoksessa. Nämä kaikki tekijät kuitenkin vaikuttaisivat solujen solunsisäiseen pH-arvoon virheellisesti, sillä solut eivät olisi enää siinä tilassa, mistä todellisudessa oltiin kiinnostuneita. Permeabilisoinnissa soluihin muodostuvat reiät sekä puskuriliuoksen erilaiset olosuhteet kasvatuliukseen verrattuna saattaisivat muuttaa solujen alkuperäistä pH_i :tä hyvinkin oleellisesti.

E^2GFP :n kalibrointikäyrän määrittäminen ei onnistunut fluoresenssimikroskoopilla. Todennäköisesti suurin syy määrittämisen epäonnistumiseen oli fluoresenssimikroskoopin valolähde, jonka intensiteetti ei ollut sama molemmille eksitaatiosuodattimille. Tällöin matalamman aallonpituusalueen eksitaatiosuodatinta (434 nm) käytettäessä solut altistuivat paljon voimakkaammalle valolle, mikä todennäköisesti aiheutti sen, että intensiteettien riippuvuus pH_i :stä ei ollut enää lineaarisella alueella. Tämä havaittiin erityisesti kuvaajissa, joissa suodatinkuutioiden intensiteettejä tarkasteltiin erikseen.

Mikäli kalibrointikäyrillä määritettyjen koesarjojen tulokset olisivat olleet lähempänä Vallin ym. [2] tuloksia, olisi voitu yrittää sovittaa pisteisiin paremmin sovittavia kalibrointikäyriä. Tällöin tulosten tarkkuus olisi voinut hieman parantua ja käyrän ulkopuolisten pisteiden määrittäminen onnistua. Koska kokeet eivät kuitenkaan onnistuneet toivotulla tavalla, ei kannattanut nähdä suurempaa vaivaa paremman kalibrointikäyrän määrittämiseksi, koska tällöin myös esimerkiksi virherajojen laskeminen olisi voinut monimutkaistua.

Verrattaessa fluoresenssispektroskoopilla saatuja E^2GFP :n koesarjan tuloksia NMR:llä määritettyihin tuloksiin havaittiin, että tulokset ovat hyvin lähellä toisiaan. Tulokset erosivat toisistaan enemmän vain hyvin happamissa olosuhteissa.

Vaikka E^2GFP :n kalibrointikäyrien määrittäminen olisi saatu onnistumaan, saattaisi sen käyttöä pH_i :n määrittämiseksi bioreaktorikasvatuksissa rajoittaa kuitenkin se, että tuotantokantoja täytyisi geenimuunnella, jotta E^2GFP -plasmidi saataisiin siirrostettua soluihin. Tuotantokannoilla tämä on ongelma siksi, että tuotantokantojen geenimuuntelusta on tiukat säännökset eikä tällaisia ”ylimääräisiä” geenimuunteiluita yleisesti ottaen kannateta. Geenimuuntelu on tiukasti valvottua, sillä geenimuuntelun vaikutuksia muihin organismeihin ja ympäristöön ei tunneta vielä riittävän tarkasti.

Jotta *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan solunsisäistä pH:ta kyettäisiin määrittämään fluoresenssimikroskoopilla bioreaktorikasvatuksista, tarvitaan vielä paljon lisää kokeita. Tutkimuksen tulokset antoivat lähinnä kuvaa siitä, mihin suuntaan tulevissa kokeissa kannattaisi lähteä. Käytettäessä E₂GFP:tä pH_i:n määrittämisessä kannattaisi seuraavaksi kokeilla esimerkiksi fluoresenssimikroskoopin valonlähteenä ksenonlamppua ja selvittää, ovatko molempien suodattimien intensiteetit tällöin lineaarisella alueella.

Käytettäessä SNARF-4F-värjättyjä hiivasoluja pH_i:n määrittämiseksi ei tutkimuksen tulosten perusteella saada optimaalisia tuloksia, kun näytteet on analysoitu fluoresenssimikroskoopilla. SNARF-4F-väriin soveltuvuus onkin todennäköisesti parempi virtausytometriin analyysiin, jolloin soluja saadaan analysoitua suurempi määrä. SNARF-4F-väriä tulee kuitenkin pohtia tulevissa kokeissa – saavutetaanko värjäyksellä tarpeeksi tarkka kasvatusliuoksessa olleiden solujen pH_i-arvo.

Yleisesti ottaen fluoresenssimikroskooppi ei todennäköisesti ole riittävän tarkka määrittämään pH_i:tä. Fluoresenssimikroskoopilla analysoitujen solujen määrä jää liian pieneksi ja kuvien analysointi teettää ainakin toistaiseksi liian paljon töitä, jotta reaaliaikainen määrittäminen olisi mahdollista.

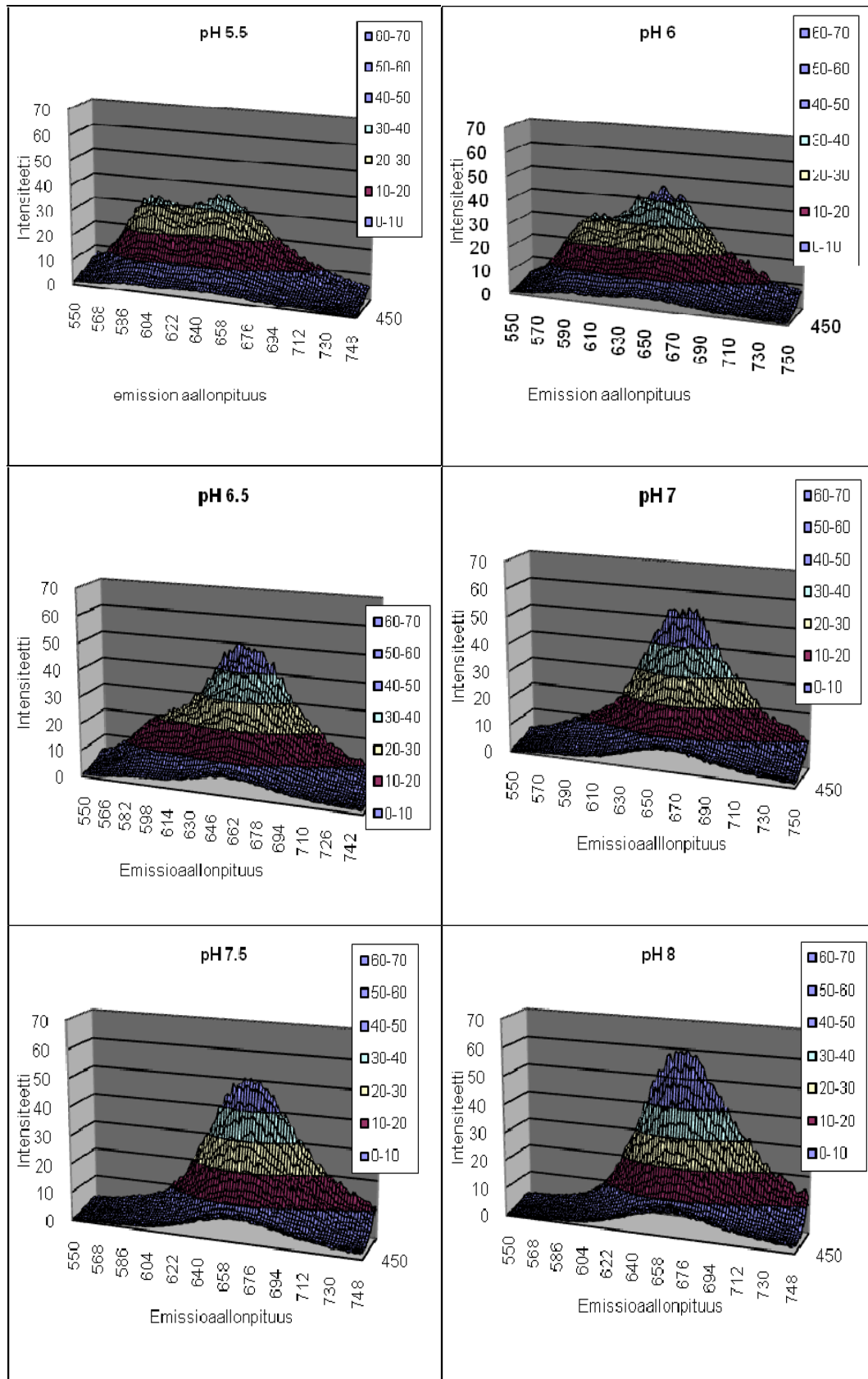
Lähteet

1. Pitkänen, Juha-Pekka. Impact of xylose and mannose on central metabolism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Väitöskirja. Teknillinen korkeakoulu, 2005.
2. Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D & Mattanovich, D. Intracellular pH Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analysed by flow cytometry. *Applied and environmental microbiology*, 2005. Vol. 3, s. 1515–1521.
3. VTT:n kotisivut. (WWW-dokumentti.) VTT. < <http://www.vtt.fi/vtt/index.jsp> >. Luettu 16.9.2009.
4. Madigan M. T., Martinko J. M. & Parker J. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2003.
5. Watanabe S., Saleh A. A., Pack S. P., Annaluru N., Kodaki T. & Makino K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing proteinengineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*, 2007. s. 3044–3054.
6. Dombek K. M. & Ingram L. O. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and environmental microbiology*, 1987. Vol. 53, s. 1286-1291.
7. Kresnowati, M.T.A.P., Suarez-Mendez, C., Groothuizen, M.K., van Winden, W.A. & Heijnen, J.J. Measurement of fast dynamic intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae* using benzoic acid pulse. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007. Vol. 97, s. 86–98.
8. Bizzarri R., Arcangeli C., Arosio D., Ricci F., Faraci P., Cardarelli F. & Beltram F. Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies. *Biophysical Journal*, 2006. Vol. 90, s. 3300–3314.

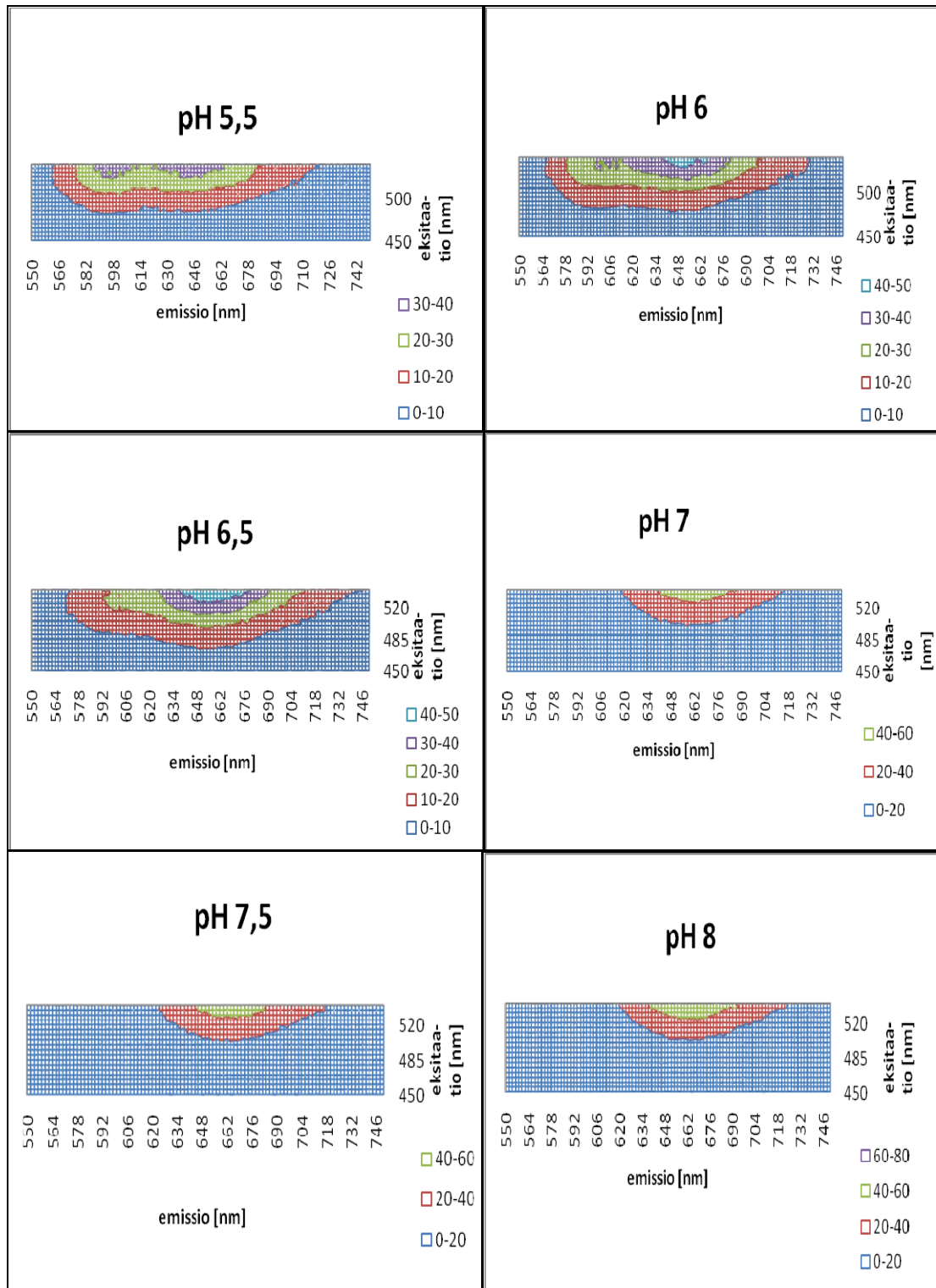
9. Haugland, Richard P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Eugene: Molecular Probes Incorporated, 1996.
10. Pitkänen, Juha – Pekka, VTT: suullinen tiedonanto 30.3 – 31.8.2009.
11. Herman, B. Fluorescence Microscopy. New York: Taylor and Francis Group, 1998.
12. Fluoresenssi. (WWW-dokumentti.) Olympus.
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>>. Luettu 22.12.2009.
13. Clegg, R M. Fluorescence resonance energy transfer. Current Opinion in Biotechnology, 1995. Vol. 6, s. 103–110.
14. Kemian Nobelin palkinto GFP:n löytämisestä ja kehittämisestä. (WWW-dokumentti.)
<http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/info.pdf>. 2008. Luettu 20.1.2010.
15. SNARF-4F. (WWW-dokumentti.) Invitrogen Corporation.
<<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/pH-Indicators/Probes-Useful-at-Near-Neutral-pH.html>>. Luettu 22.11.2009.
16. Virtaussytometri. (WWW-dokumentti.) AbD Serotec.
<<http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>>. 2006. Luettu 18.6.2009.
17. Fluoresenssimikroskoopin valonlähde. (WWW-dokumentti.) Olympus.
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorosources.html>>. Luettu 22.12.2009.
18. Suodatinkuutio. (WWW-dokumentti.) Nikon.
<<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>>. Luettu 11.12.2009.

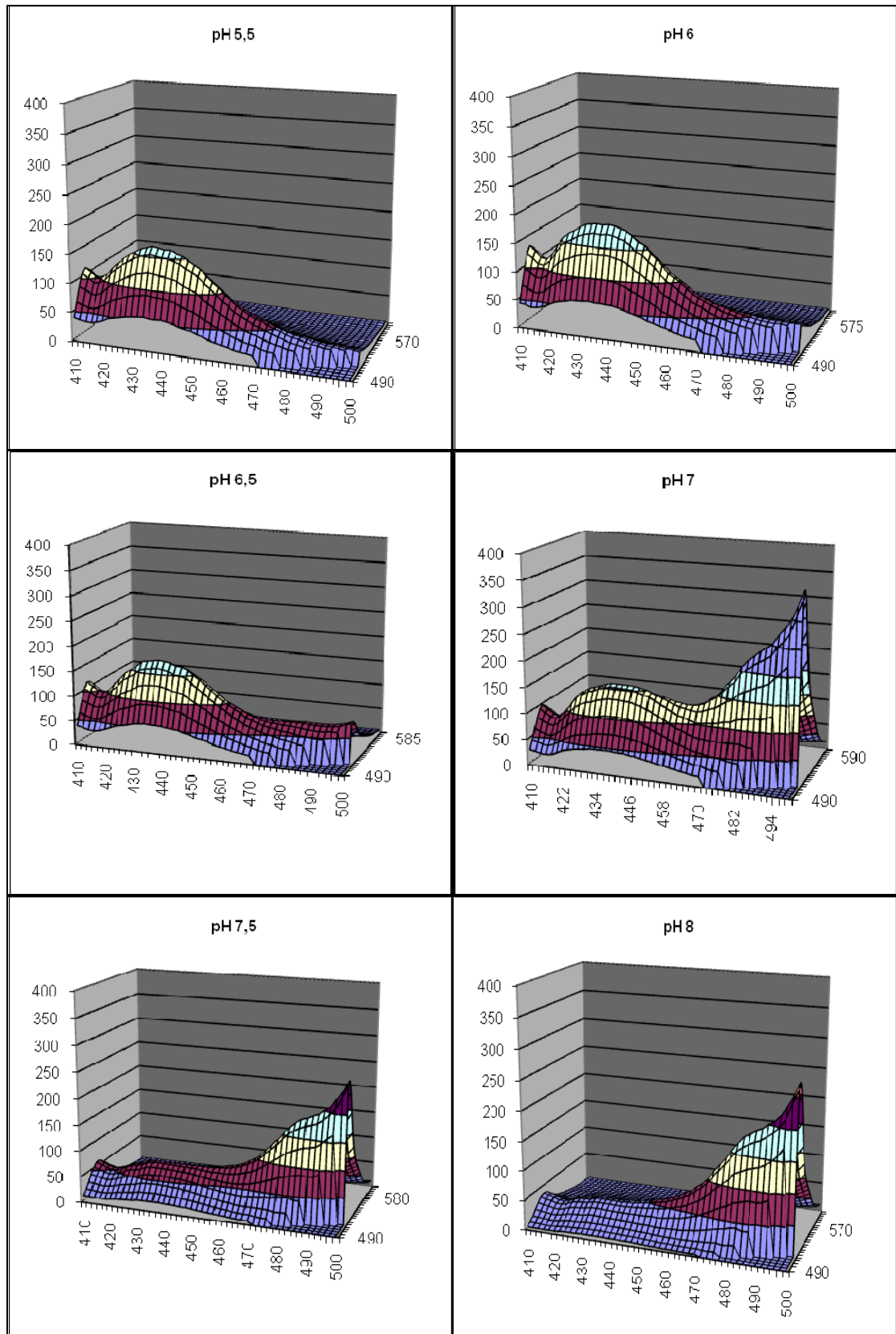
19. Kapean aallonpituusalueen suodattimen spektri. (WWW-dokumentti.) Semrock.
<<http://www.semrock.com/Catalog/Detail.aspx?FilterPartID=500&CategoryID=34>>.
2009. Luettu 11.12.2009.
20. Laajan aallonpituusalueen suodattimen spektri. (WWW-dokumentti.) Semrock.
<<http://www.semrock.com/Catalog/Detail.aspx?FilterPartID=405&CategoryID=27>>.
2009. Luettu 11.12.2009.
21. Dikromaattisen peilin spektri. (WWW-dokumentti.) Semrock.
<<http://www.semrock.com/Catalog/Detail.aspx?FilterPartID=282&CategoryID=29>>.
2009. Luettu 11.12.2009.
22. Esa Koivisto. Konfokaalimanuaali. (WWW-dokumentti.) Kuopion yliopisto.
<<http://www.uku.fi/~ekoivist/konfmankuvilla.htm#kute>>. 11.12.1996. Luettu
30.12.2009.
23. Thermo Electron Corporation: VarioskanTM user manual Rev. 2.0. 2005, s. 15–21.
24. Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita, 2005.
25. NMR. (WWW-dokumentti.)
<<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>>. Luettu
28.1.2010.
26. Takeo Imai & Toshihiko Ohno. Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *Journal of Biotechnology*, 1994. Vol 38, s. 165–172.
27. SFS 8466-2. 2002. Veden laatu. Analyyttisten menetelmien kalibrointi ja arviointi sekä suorituservojen määrittäminen. Osa 2: Epälineaaristen toisen asteen kalibrointifunktioiden kalibrointikäytäntö. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
28. Neter J., Kutner M., Nachtsheim C. & Wasserman W. *Applied linear statistical models* – 4th edition. Chicago: WCB/McGraw-Hill, 1996.

Liite 1: SNARF-4F-värjättyjen solujen spektrit eri pH:n arvoilla.

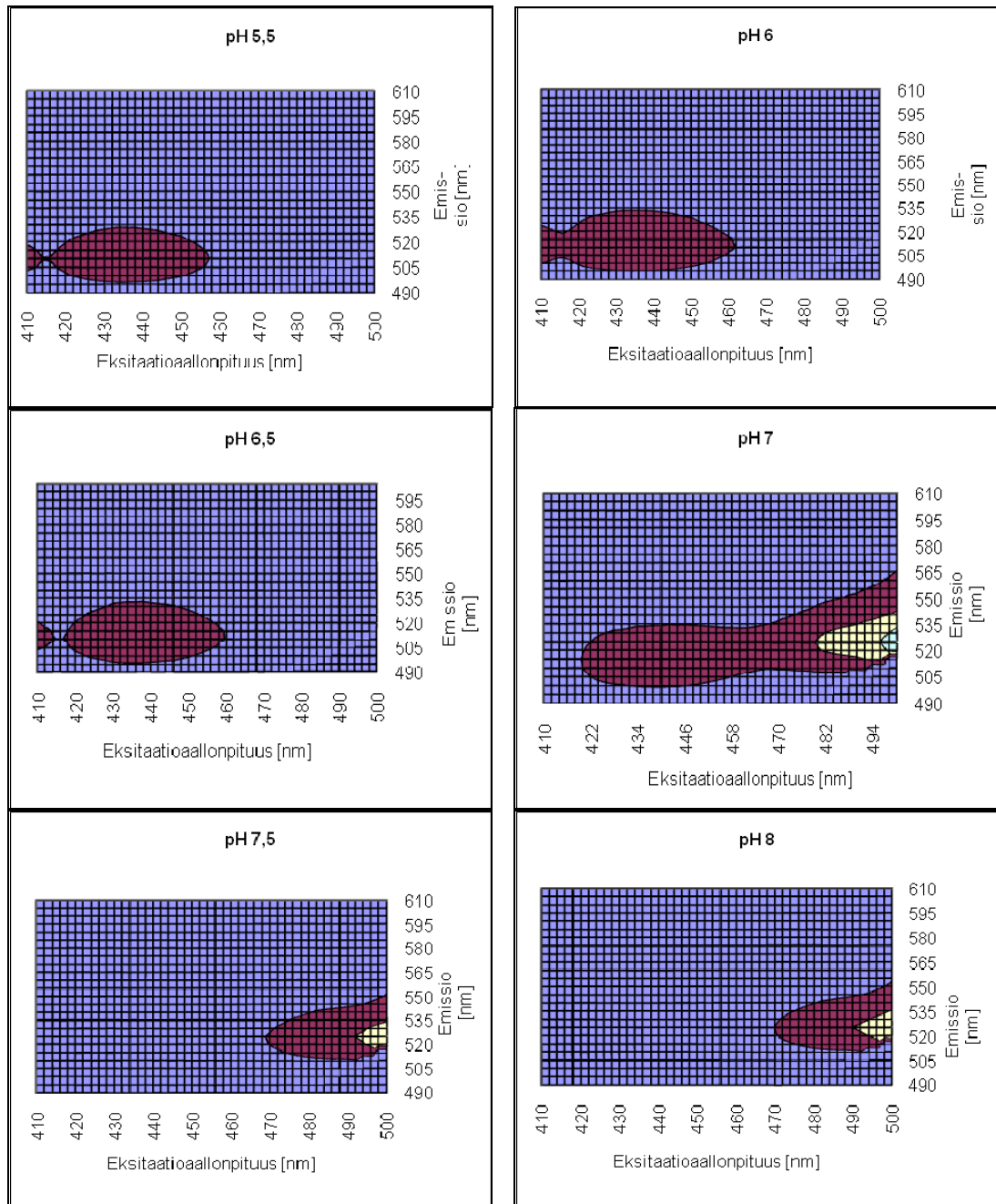


Liite 2: SNARF-4F-värjättyjen solujen intensiteetit eksitaatio- ja emissioaallonpituuden funktiona.

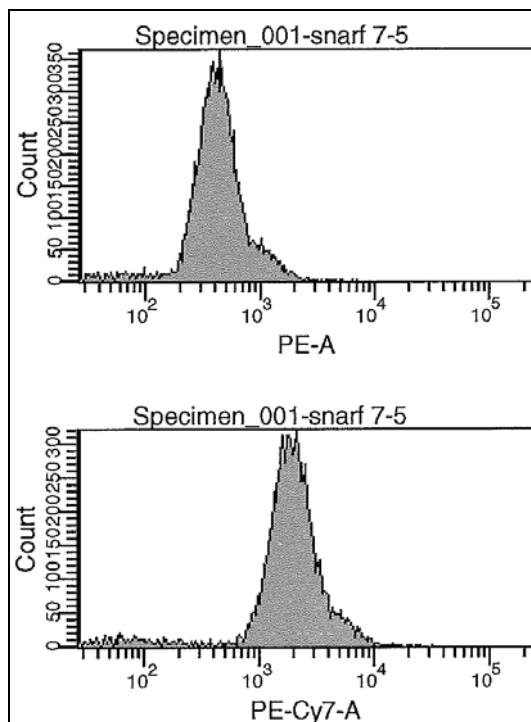
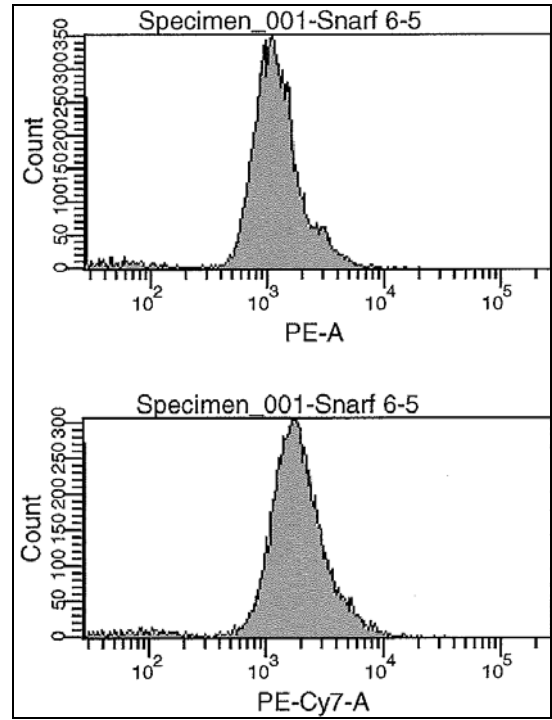
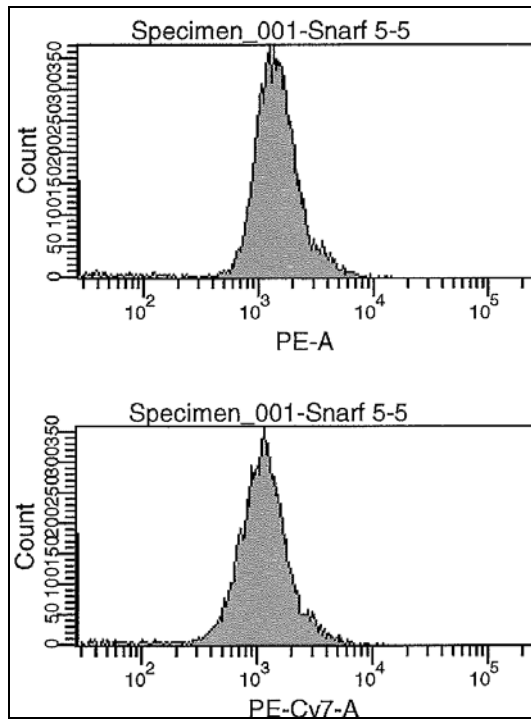


Liite 3: E²GFP-solujen spektrit.

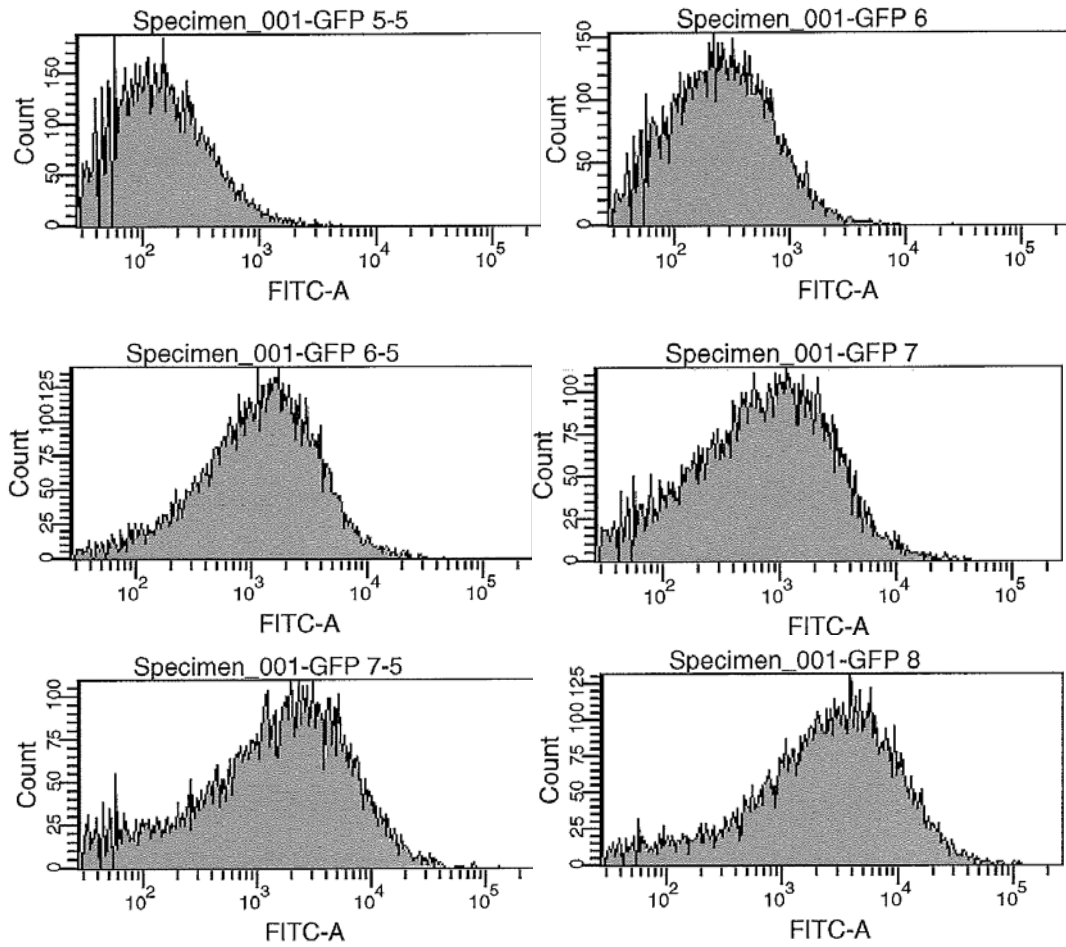
Liite 4: E²GFP-solujen intensiteetit eksitaatio- ja emissioaallonpituuden funktiona.



Liite 5: SNARF-4F-värjättyjen solujen virtausytometrin tulokset (eks. 488 nm sekä em. 578 nm (PE-A) ja 785 nm (PE-Cy7-A)).



Liite 6: E²GFP-solujen virtaussytometrin tulokset, eks. 488 nm, em. 519 nm (FITC-A).



Liite 7: Esimerkki luottamusvälien laskemisesta.

vakio	pH	pH ²	suhde(434/485)
1	5,5	30,25	7,315789474
1	5,5	30,25	7,333333333
1	5,5	30,25	7,611111111
1	5,5	30,25	7,727272727
1	5,5	30,25	8,2
1	5,5	30,25	8,25
1	5,5	30,25	8,272727273
1	5,5	30,25	8,285714286
1	5,5	30,25	8,357142857
1	5,5	30,25	8,4
1	5,5	30,25	8,416666667
1	5,5	30,25	8,454545455
1	5,5	30,25	8,5
1	5,5	30,25	8,5
1	5,5	30,25	8,636363636
1	5,5	30,25	8,636363636
1	5,5	30,25	8,833333333
1	5,5	30,25	9
1	6	36	5,206896552
1	6	36	5,956521739
1	6	36	6,25
1	6	36	6,421052632
1	6	36	6,473684211
1	6	36	6,473684211
1	6	36	6,529411765
1	6	36	6,55
1	6	36	6,588235294
1	6	36	6,631578947
1	6	36	6,647058824
1	6	36	6,777777778
1	6	36	7
1	6	36	7
1	6	36	7
1	6	36	7,2
1	6,5	42,25	2
1	6,5	42,25	2,569230769
1	6,5	42,25	2,603174603
1	6,5	42,25	2,68852459
1	6,5	42,25	2,704918033
1	6,5	42,25	2,716666667
1	6,5	42,25	2,733333333

vakio	pH	pH ²	suhde(434/485)
1	6,5	42,25	2,962962963
1	6,5	42,25	2,981132075
1	6,5	42,25	3,057692308
1	6,5	42,25	3,06
1	6,5	42,25	3,102040816
1	6,5	42,25	3,125
1	6,5	42,25	3,125
1	6,5	42,25	3,162790698
1	6,5	42,25	3,166666667
1	6,5	42,25	3,1875
1	6,5	42,25	3,212765957
1	6,5	42,25	3,295454545
1	6,5	42,25	3,380952381
1	6,5	42,25	3,395348837
1	6,5	42,25	3,4
1	6,5	42,25	3,435897436
1	6,5	42,25	3,43902439
1	6,5	42,25	3,45
1	6,5	42,25	3,475
1	6,5	42,25	3,525
1	6,5	42,25	3,55
1	6,5	42,25	3,58974359
1	6,5	42,25	3,594594595
1	6,5	42,25	3,666666667
1	6,5	42,25	3,675675676
1	6,5	42,25	3,675675676
1	6,5	42,25	3,702702703
1	6,5	42,25	3,722222222
1	6,5	42,25	3,722222222
1	6,5	42,25	3,742857143
1	6,5	42,25	3,742857143
1	6,5	42,25	3,8
1	7	49	1,481818182
1	7	49	1,558139535
1	7	49	1,578431373
1	7	49	1,595505618
1	7	49	1,617977528
1	7	49	1,623655914
1	7	49	1,652173913
1	7	49	1,659090909
1	7	49	1,678571429

Liite 7: Esimerkki luottamusvälien laskemisesta.

vakio	pH	pH²	suhde(434/485)		vakio	pH	pH²	suhde(434/485)
1	7	49	1,681818182		1	7,5	56,25	0,979166667
1	7	49	1,682926829		1	7,5	56,25	0,979591837
1	7	49	1,7		1	7,5	56,25	0,98019802
1	7	49	1,701149425		1	7,5	56,25	0,983333333
1	7	49	1,701298701		1	7,5	56,25	0,983606557
1	7	49	1,702380952		1	7,5	56,25	0,987951807
1	7	49	1,705882353		1	7,5	56,25	0,988235294
1	7	49	1,706666667		1	7,5	56,25	0,988764045
1	7	49	1,722891566		1	7,5	56,25	0,990909091
1	7	49	1,722891566		1	7,5	56,25	0,991071429
1	7	49	1,726190476		1	7,5	56,25	1
1	7	49	1,742857143		1	7,5	56,25	1
1	7	49	1,746835443		1	7,5	56,25	1
1	7	49	1,756410256		1	7,5	56,25	1
1	7	49	1,780821918		1	7,5	56,25	1,008264463
1	7	49	1,794520548		1	7,5	56,25	1,010752688
1	7	49	1,802816901		1	7,5	56,25	1,010752688
1	7	49	1,802816901		1	7,5	56,25	1,010869565
1	7	49	1,802816901		1	7,5	56,25	1,013793103
1	7	49	1,805194805		1	7,5	56,25	1,025
1	7	49	1,808219178		1	7,5	56,25	1,032608696
1	7	49	1,813333333		1	7,5	56,25	1,044444444
1	7	49	1,820895522		1	7,5	56,25	1,068965517
1	7	49	1,830985915		1	7,5	56,25	1,074074074
1	7	49	1,845070423		1	7,5	56,25	1,081395349
1	7	49	1,848484848		1	7,5	56,25	1,137614679
1	7	49	1,848484848		1	7,5	56,25	1,275510204
1	7	49	1,863636364		1	7,5	56,25	1,279569892
1	7	49	1,867647059		1	7,5	56,25	1,761363636
1	7	49	1,867647059		1	7,5	56,25	0,970588235
1	7	49	1,878787879		1	8	64	0,652777778
1	7	49	1,878787879		1	8	64	0,659722222
1	7	49	1,890625		1	8	64	0,668965517
1	7,5	56,25	0,619047619		1	8	64	0,668965517
1	7,5	56,25	0,68503937		1	8	64	0,675862069
1	7,5	56,25	0,8		1	8	64	0,678082192
1	7,5	56,25	0,942622951		1	8	64	0,678082192
1	7,5	56,25	0,945652174		1	8	64	0,678082192
1	7,5	56,25	0,956043956		1	8	64	0,684931507
1	7,5	56,25	0,960784314		1	8	64	0,684931507
1	7,5	56,25	0,9609375		1	8	64	0,68707483
1	7,5	56,25	0,966666667		1	8	64	0,651006711

Liite 7: Esimerkki luottamusvälien laskemisesta.

vakio	pH	pH²	suhde(434/485)
1	8	64	0,68707483
1	8	64	0,689655172
1	8	64	0,691275168
1	8	64	0,691780822
1	8	64	0,693877551
1	8	64	0,695945946
1	8	64	0,695945946
1	8	64	0,696517413
1	8	64	0,696551724
1	8	64	0,698630137
1	8	64	0,700680272
1	8	64	0,700680272
1	8	64	0,706586826
1	8	64	0,707865169
1	8	64	0,709459459
1	8	64	0,709876543
1	8	64	0,710526316
1	8	64	0,712328767
1	8	64	0,7125
1	8	64	0,714285714
1	8	64	0,715909091
1	8	64	0,719178082
1	8	64	0,720496894
1	8	64	0,723684211
1	8	64	0,724550898
1	8	64	0,727272727
1	8	64	0,729885057
1	8	64	0,731543624
1	8	64	0,734939759
1	8	64	0,741935484

Liite 7: Esimerkki luottamusvälien laskemisesta.

$$y=a+b*x+c*x^2$$

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,993646425
R Square	0,987333219
Adjusted R Square	0,982180789
Standard Error	0,403644862
Observations	202

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	3	2527,256974	842,42	5170,461	9,984E-188
Residual	199	32,42290573	0,1629		
Total	202	2559,679879			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	0	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
a	85,3580516	2,181645845	39,126	2,15E-95	81,0559409	89,660162
b	-21,38986205	0,640433816	-33,399	1,61E-83	-22,65277	-20,12695
c	1,351166875	0,046556278	29,022	1,93E-73	1,25935992	1,4429738

	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	#N/A	#N/A
a	81,0559409	89,6601623
b	-22,65276968	-20,12695443
c	1,25935992	1,44297383

$$\text{cov} = \text{MINVERSE}(\text{MMULT}(\text{TRANSPOSE}(X); X)) * s_{\text{res}}^2$$

4,759578592	-1,394521293	0,1009
-1,394521293	0,410155473	-0,0298
0,100858047	-0,029767533	0,0022

	y_u	laskettu pH	1 vakio	x pH	x ² ph ²	r
5 g/l	0,705172674	7,887798726	1	7,887799	62,2173687	32
20 g/l	1,032333806	7,422490544	1	7,422491	55,0933659	27
30 g/l	1,451082166	7,171820031	1	7,17182	51,4350026	21
40 g/l	4,007439336	6,351753818	1	6,351754	40,3447766	9

Liite 7: Esimerkki luottamusvälien laskemisesta.

$$\text{sigma}_y^2 (5\text{g/l}) = \text{MMULT}(\text{D37:F37};\text{MMULT}(\text{Cov};\text{TRANSPOSE}(\text{D37:F37}))) + (\text{s_res}^2/\text{G37})$$

	σ_y^2	alaraja	yläraja	+/-
5 g/l	0,007331668	5,618240425	10,157	2,269558
20 g/l	0,007288554	7,296082709	7,5489	0,126408
30 g/l	0,009207974	7,077641072	7,266	0,094179
40 g/l	0,019750892	6,286164547	6,4173	0,065589