

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Elintarviketekniikka

2010

Jaakko Suominen

Agaroosigeelin raaka- ainekoostumuksen karakterisointi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jaakko Suominen

Agaroosigeelin raaka-ainekoostumuksen karakterisointi

Työn tavoitteena oli karakterisoida vaihtoehtoisia agaroosigeelin raaka-ainekoostumuksia, joita voitaisiin käyttää Wallacilla nykyisten geelien raaka-ainekoostumuksien sijaan. Tällaisia geelejä käytetään maailmanlaajuisesti levinneiden verisairauksien, kuten hemoglobiinopatioiden ja talassemioiden, diagnosoinnin apuna. Agaroosin puhtaus on tärkeä tekijä analyysien onnistumisessa. Geelien käytössä hyödynnetään IEF-tekniikkaa. IEF eli isoelektrinen fokusointi, on erotustekniikka, jossa varaukselliset molekyylit liikkuvat geelillä kohti omia pI-pisteitään. Tämän mahdollistaa kantaja-amfolyyttien avulla geeliin luotu pH-gradientti.

Työssä valmistettiin agaroosigeelejä laboratorio-olosuhteissa erilaisten reseptien mukaan ja niitä ajettiin IEF-laitteistolla. Työ voidaan jakaa kolmeen eri osa-alueeseen: "sorbitolipitoisuus ja keittoaika", "agaroosien sekoittaminen" sekä "galaktomannaanin lisäys". Hemoglobiini-kontrolleina käytettiin AFSC-, HAFSC- ja NAFSC-kontrolleja. Kaikissa testeissä käytettiin kahden eri agaroosinvalmistajan agaroosia ja samaa amfolyyttiä. Tuloksia arvioitiin sekä visuaalisesti, että laskemalla geelissä muodostuvien hemoglobiinibandien etäisyyksiä. Työhön kuului yhteensä 23 testiä.

Testien tuloksista voidaan päätellä, että yksi agaroosigeelin raaka-ainekoostumus saattaisi toimia tuotannossa nykyistä paremmin. Hemoglobiinibandit olivat kyseisen reseptin mukaan valmistetuissa geeleissä liikkuneet oikeille kohdilleen ja bandit olivat visuaalisesti tarkasteltuna hieman paremmin fokusoituneita ja erottuneita toisistaan, kuin nykyisen reseptin mukaan valmistetuissa geeleissä. Tästä saatiin myös toistettavia tuloksia. Reseptin siirtäminen tuotantoon vaatisi kuitenkin vielä tuotantomittakaavan testejä. Lisäksi muiden testien tulokset rajasivat ulkopuolelle monta eri agaroosigeelin reseptiä, jotka eivät sovellu IEF-laatuisten geelien valmistukseen.

ASIASANAT:

(agaroosigeeli, isoelektrinen fokusointi, hemoglobiini)

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Food Technology

Date: October 2010 | Total number of pages: 42

Instructors: Kai Rosenberg, Milla Rantala

Jaakko Suominen

The characterization of raw material formula for agarose gel

The objective of this project was to characterize alternative raw material formulae for agarose gel which could be used at Wallac instead of the current raw material formula. These kinds of gels are used to help diagnose globally spread blood diseases, such as hemoglobinopathies and thalassemias, in newborns. The purity of the agarose is an important factor when conducting these analyses. IEF techniques are used together with these gels. IEF or isoelectric focusing is a separation method where charged molecules migrate on the gel towards their own isoelectric points. This is made possible by the pH-gradient on the gel which is created by free carrier ampholytes

In this project agarose gels were prepared in laboratory conditions according to different formulae. Gels were then tested with IEF equipment. The work can be roughly divided into three different sectors: "sorbitol concentration and boiling time", "mixing of agaroses" and "adding of galactomannan". AFSC, HAFSC and NAFSC controls were used as hemoglobin controls. In all tests agarose from two different agarose manufacturers and the same ampholyte were used. The results were estimated both visually and by measuring the distances of hemoglobin bands that formed on the gels. The work included 23 tests.

From the test results it can be concluded that one raw material formula for agarose gel might work better in production than the current one. In this gel the hemoglobin bands migrated to their correct positions and the bands were, when examined visually, slightly better focused and separated from each other than in the gels prepared by the current formula. Repeatable results were also obtained from this test. Before introducing the formula to production some production size tests would be required. In addition the results from the other tests gave useful information relating to gels that do not meet the requirements of IEF technique.

KEYWORDS:

(agarose gel, isoelectric focusing, hemoglobin)

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	1
2 AGAR	2
2.1 Agarin lähteet	2
2.2 Ominaisuudet	3
2.3 Käyttötarkoitukset	4
2.4 Agarosi	5
2.5 Agaropektiini	8
3 GEELIEN VALMISTUKSESSA KÄYTETTÄVIÄ AINEITA	9
3.1 Glyseroli	9
3.1.1 Käyttötarkoitukset	10
3.2 Sorbitoli	11
3.2.1 Käyttötarkoitukset	11
3.3 Galaktomannaanit	12
3.3.1 Käyttötarkoitukset	14
4 ELEKTROFOREESI	14
4.1 Isoelektrinen fokusointi	15
4.2 Geelit	17
4.2.1 Agarosigeelit	17
4.3 Elektroendo-osmoosi	17
4.4 pH-gradientit	18
4.4.1 Vapaat kantaja-amfolyytit	19
5 HEMOGLOBIINI	21
5.1 Aminohapot ja polypeptidiketjut	21
5.2 Hemoglobiinin kehitys	21
5.3 Hemoglobinopatiat	22
5.4 Talassemiat	23
6 KOKEELLINEN OSUUS	24
6.1 Geelien valaminen	25
6.2 IEF-ajo	27
6.3 Loppukäsittely ja tulosten lukeminen	28
6.4 Sorbitolipitoisuus ja keittoaika	31
6.5 Agarosien sekoittaminen	32
6.6 Galaktomannaanin lisäys	33
6.7 Geelien arviointikriteerit testeissä	33

6.8 Poikkeamat karakterisointisuunnitelmasta	34
7 TULOKSET	35
7.1 Sorbitolipitoisuus ja keittoaika	36
7.2 Agaroosien sekoittaminen	38
7.3 Galaktomannaanin lisäys	39
7.4 Riskianalyysi	41
8 PÄÄTELMÄT	41
9 LÄHTEET	
LIITTEET	
LIITE 1 KARAKTERISOINTISUUNNITELMA	
LIITE 2 PIPETOINTIKAAVIO 1	
LIITE 3 PIPETOINTIKAAVIO 2	
LIITE 4 REAGENSsit JA LAITTEET	
LIITE 5 YHTEENVETO TULOKSISTA	

1 Johdanto

Vastasyntyneiden seulonnalla tarkoitetaan prosessia, jossa vastasyntyneen lapsen verinäytteestä etsitään merkkejä mahdollisista sairauksista. Näiden seulontojen tekemiseen on kehitetty erilaisia menetelmiä, sillä sairauksien kirjo on laaja ja kaikkea ei pystytä yhdellä testillä selvittämään

Hemoglobinopatiat ja talassemiat aiheutuvat hemoglobiinivariaatioista, joita seulonnoilla pyritään detektoimaan. Hemoglobinopatioissa hemoglobiiniproteiinit ovat muodostuneet epänormaalilla tavalla johtuen geenivirheestä, kun taas talassemioissa normaalien hemoglobiiniproteiinien tuotanto on vähentynyt. Nämä sairaudet saattavat aiheuttaa ihmisessä anemiasa ja voivat johtaa jopa kuolemaan. Yleisin hemoglobinopatia on sirppisoluanemia, jossa punasolun muoto muistuttaa sirppiä. Kaikki hemoglobiinivariantit eivät kuitenkaan aiheuta anemiasa eikä niitä siten luokitella sairauksiksi.

Yksi hemoglobinopatioiden ja talassemioiden seulontoihin käytetty menetelmä on isoelektrinen fokusointi eli IEF. Tämä on tekniikka, jolla erilaiset molekyylit pystytään erottelemaan niiden isoelektristen pisteiden (pI-piste) perusteella sähkövirran avulla. Erottelu tehdään yleensä geelissä, johon on luotu tarkka pH-gradientti. Tällöin eroteltavien molekyylien nettovaraus riippuu niistä ympäröivästä pH-alueesta, jolloin ne kulkeutuvat geelissä omien pI-pisteidensä kohdille. IEF-ajon edetessä molekyylit konsentroituvat tarkoiksi bandeiksi geelillä kohtiin, joissa niiden nettovaraus on nolla.

Agaroosi on yksi tärkeimmistä raaka-aineista, kun valmistetaan isoelektriseen fokusointiin sopivia geelejä. Agaroosi on luonnontuote jota saadaan agarista, joten siinä esiintyy laadullista vaihtelua. Onkin tärkeää, että isoelektriseen fokusointiin tarkoitettu agaroosi olisi mahdollisimman puhdasta, eikä siinä esiintyisi varauksellisia ryhmiä, jotka häiritsevät molekyylien kulkua geelillä.

Tämä työ keskittyy IEF-laatuksen geelin raaka-ainekoostumuksen karakterisointiin, jossa agaroosi on tärkeässä osassa. Työn teoreettisessa osiossa kuvataan tarkemmin geeleissä käytettäviä raaka-aineita, isoelektristä

fokusointia, sekä hemoglobiinisairauksia. Työn kokeelliset osuudet suoritettiin Wallac Oy:n geelien laadunvalvonnan laboratoriotiloissa.

2 Agar

Agar on luonnontuote, jota saadaan eristettyä tietyistä punaleivistä. Agar on puhtaassa muodossaan jauhemaista ainetta, jonka väri voi vaihdella kellertävästä valkoiseen. Se on liukenematon kylmään veteen, mutta liukoinen kiehuvaan veteen. Agar on tärkeä tekijä elintarviketeollisuudessa ja biotekniikan alalla hyytelöimisominaisuuksiensa vuoksi. Liuotettaessa agaria pieniä määriä (1-2 %) kiehautettavaan veteen, se muodostaa kiinteän geelin liuoksen jäähtyessä +35 - +50 °C:een. (1, 2, 3)

Agarin kemiallinen rakenne vaihtelee riippuen käytettävästä punaleivästä, niiden ympäristöstä sekä agarin valmistusmenetelmästä. Agarin katsotaan nykyään koostuvan kahdesta eri polysakkaridista, neutraalista agarosista sekä varauksellisesta agaropektiinistä. Agaropektiini sisältää galaktopyranoosin jäämiä, sulfaattia ja muita varauksellisia ryhmiä vaihtelevissa määrin. (1)

2.1 Agarin lähteet

Erilaisten punalevien käyttö agarin tuotannon raakamateriaaleina on johtanut ominaisuuksiltaan erilaisten tuotteiden nousuun, jotka voidaan kuitenkin kaikki sisällyttää agarin määritelmään. Tämän vuoksi agarin mainitsemisen yhteydessä ilmoitetaan yleensä myös sen lähde, sillä tämä saattaa vaikuttaa käyttötarkoituksiin. Näin ollen puhutaan yleensä *Gelidium* -agarista, *Gracilaria* -agarista, *Pterocladia* -agarista jne., joista *Gelidium* -levästä saatavaa agaria käytetään pääasiassa bakteriologisiin tarkoituksiin. Tuotetta voidaan kuvailla tarkemmin mainitsemalla sen kotimaa, sillä esimerkiksi *Gracilaria* -agar Chilestä eroaa ominaisuuksiltaan *Gracilaria* -agarista Argentiinasta. (2)

Alun perin *Gelidium* -agarilla oli aidon agarin asema, jolloin muista levistä saatavia agareita kutsuttiin agarodeiksi. Vaikka agaroidella ei ollut täysin samoja ominaisuuksia kuin *Gelidium* -agarilla, voitiin niitä käyttää korvikkeina tietyissä olosuhteissa. Teollistumisen tuomien uusien prosessien myötä agarin muodostaman geelin vahvuudet paranivat ja *Gelidium* -agarin erot agarodeihin tulivat selvemmiksi. Uudemmat agarin uuttomenetelmät ovat nostaneet huomattavasti myös *Gracilaria* -agarista valmistetun geelin vahvuutta. (2)

Nykyään maailmalla viljellään pääosin seuraavia punaleviä: *Gelidium* -levän eri lajikkeita viljellään mm. Espanjassa, Portugalissa ja Japanissa. *Gracilaria* -levän eri lajikkeita viljellään mm. Chilessä, Argentiinassa ja Etelä-Afrikassa. *Pterocladia capillace* -levää viljellään Portugalissa ja *Pterocladia lucida* -levää Uudessa-Seelannissa. *Gelidiella* -levää viljellään Egyptissä, Madagaskarissa ja Intiassa (2)

2.2 Ominaisuudet

Geelityminen vesiliuoksessa on agarin tärkein ominaisuus. Geelitymistä tapahtuu, kun ketju makromolekyylejä muodostaa verkoston, joka pystyy sitomaan dispergoivan väliaineen. Tällaisen geelin koostumus lähentelee nestettä, mutta voi muistuttaa kiinteää ainetta. Se on elastinen kolloidi, joka säilyttää astiansa muodon, vaikka se poistettaisiin siitä. Agar-geelit voivat sisältää jopa 99,9 % vettä. Tällaiset geelit ilmentävät vahvaa synereesiä (geelin kokoon vetäytymistä) ja käyttäytyvät kuten vapaa vesi, joka voidaan helposti erottaa jäädyttämällä tai sulattamalla. Agar-geelien lujuus saattaa johtua kaksoiskierteiden yhteenkasautumien muodostamasta verkostofaasista, joka voi sisältää jopa 100 osaa vettä jokaista agaroosimolekyyliä kohden. Tällaisella verkostolla on suhteellisen isoja huokosia joiden läpi suuret molekyylit ja partikkelit voivat diffundoitua. (1)

Agarilla on geelitymisen lisäksi myös muita tärkeitä ominaisuuksia. Sitä pystytään käyttämään laajalla pH-alueella, pH 5 - pH 8, ja joissain tapauksissa tämän alueen ulkopuolellakin. Agar kestää yli 100 °C:een lämpökäsittelyjä,

jolloin sen sterilointimahdollisuudet ovat hyvät. Agar muodostaa geelejä ilman häiritseviä makuja, joten sitä voidaan käyttää elintarvikkeissa, jotka maistuvat miedoilta. Toisaalta se omaksuu niiden tuotteiden maut, joihin se sekoitetaan, ja toimii tuoksujen kiinnitteinä. Agarin muodostamilla geeleillä on erinomainen palautuvuus ja niitä voidaan toistuvasti geeliyttää ja sulattaa, ilman että geelien ominaisuudet kärsisivät. Läpinäkyvät geelit on helppo värjätä ja niiden taitekerrointa voidaan myös nostaa lisäämällä sokeria, glukoosia, glyserolia jne. Geeli on myös hyvin stabiili verrattuna esimerkiksi alginaateista valmistettuihin geeleihin. (2)

2.3 Käyttötarkoitukset

Agar oli ensimmäinen leväkolloidi, jota käytettiin elintarviketeollisuudessa, ja sen sovellukset ovat ulottuneet joka puolelle maailmaa. Agarin suosio johtuu sen geeliytymisominaisuuksista, joita ei löydy mistään muusta leväkolloidista, kasvikumista tai gelatiinista. Tämän vuoksi elintarvikkeisiin tarkoitetun agarin hinta on korkeampi kuin minkään muun sitä vastaavan aineen. Lisäksi agaria käytetään sen ominaisuuksiensa vuoksi yksinomaan tietyissä tieteellisissä ja teollisissa sovelluksissa. (2)

Elintarviketeollisuudessa agaria käytetään ensisijaisesti hyytelöimisaineena ja toissijaisesti stabilointiaineena ja viskositeetin hallinnassa. Sitä käytetään lisääaineena, ei ravintoaineena. Koska agarin geeliytymisominaisuudet ovat niin voimakkaat, sen konsentraatio on tuotteessa maksimissaan 1 %. Agar on ihmiskehölle vaikeasti sulatettava aine, mutta johtuen sen pienistä käyttömääristä elintarvikkeissa agaria voidaan käyttää erikoisruokavalioissa. (2)

Agaria käytetään elintarviketeollisuudessa moninlaisiin tuotteisiin. Konditorioissa sitä käytetään hyytelöiden, vaahtokaramellien ja makeisten tuotannossa. Marmeladeissa agaria käytetään sakeutus- ja hyytelöimisaineena. Japanissa agaria käytetään Mitsumamen tuotannossa, joka on eräänlainen hedelmäsalaatti. Leipomoissa agaria käytetään kakkujen päällysteissä, donitsien kuorrutteissa sekä suklaassa. Sen tehtävä on näissä

leipomotuotteissa estää kuivumista. Agarilla on tärkeä osa myös hedelmähyytelöiden valmistuksessa, sillä verrattaessa perinteisempään pektiiniin, agar ei tarvitse korkeaa sokeripitoisuutta muodostaakseen hyytelön. Näiden lisäksi agaria käytetään myös jogurteissa, lihateollisuudessa, monenlaisissa säilykkeissä sekä joissain alkoholituotteissa. (2)

Agarin monet ominaisuudet ovat laajentaneet sen käytön myös muille aloille. Muottien valmistuksessa agaria lisätään veteen suuremmissa konsentraatioissa (8 %) yhdessä glyserolin tai glykolien ja homekasvuston välttämiseksi säilöntäaineiden kanssa. Bakteerikontaminaatio on käytännössä mahdoton, sillä tällaisen geelin vapaan veden määrä on hyvin pieni. Näitä geelejä käytetään myös kuvanveistossa, arkeologiassa sekä muilla aloilla, joissa tarkka jäljentäminen on olennaista. Tästä syystä agaria käytetään myös hammasmuottien valmistuksessa, vaikka se on kalliimpaa kuin alginaattitahnan käyttö. Myös glyserolia käytetään näissä sovelluksissa, sillä se estää muottien kuivumista ja kiihdyttää lämmönsiirtoa, jolloin geeli sulaa nopeammin kiehuvässä vedessä. Agarin käyttö laksatiivina on hyvin tunnettu farmasian alalla. Sitä on myös käytetty täyteaineena lääkevalmisteissa. Agar on käytetty stabiloimaan kolesteroliliuoksia ja joissakin länsimaissa sitä on käytetty reumalääkkeenä. (2)

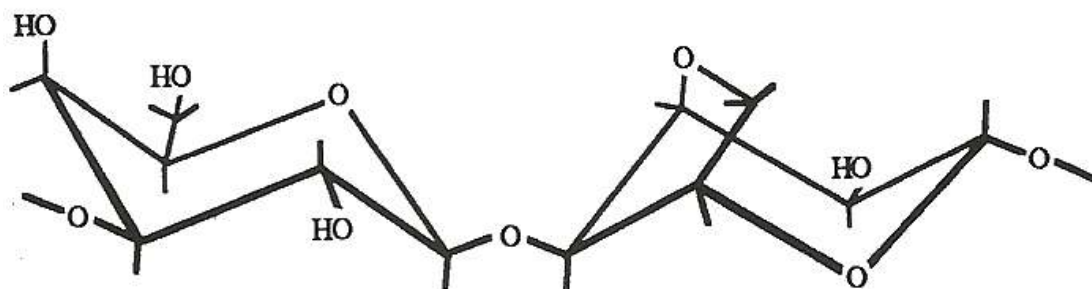
Agaria on käytetty orkideatarhoissa jo pitkän aikaa. Edistysaskeleet soluviljelyssä ovat tuoneet esiin tärkeitä sovelluksia liittyen tekniikoihin, joissa kasvisolukosta kasvatetaan täydellisiä ja viruksista vapaita klooneja. Agarin, jota käytetään tällaisiin tarkoituksiin, on oltava tietyllä tavalla valmisteltu, jotta voidaan olla varmoja että inhibiittoreita ei esiinny. (2)

2.4 Agaroosi

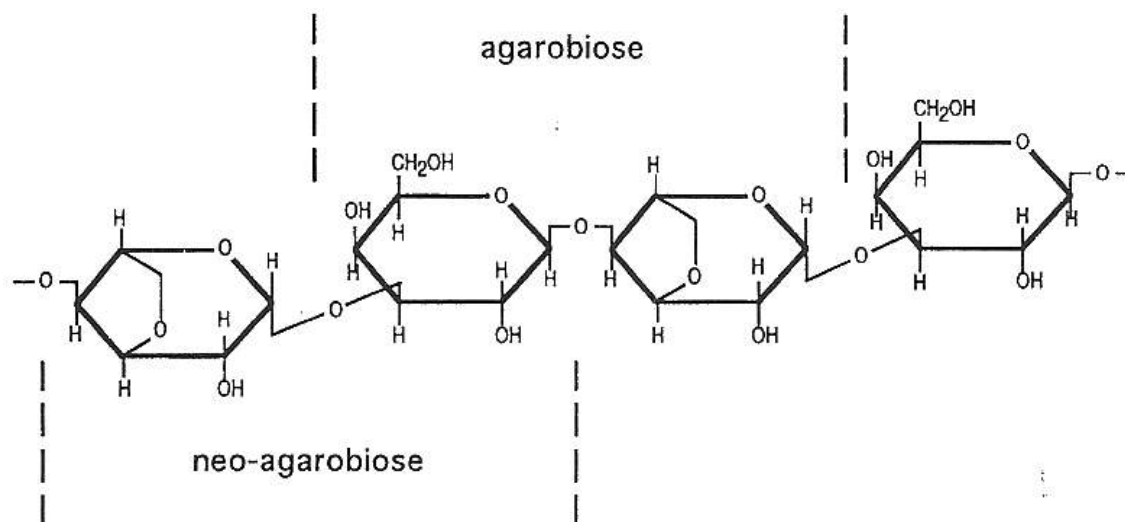
Agaroosi on vastuussa agarin geeliytymisominaisuuksista. Se on polysakkaridi, joka koostuu vuorottelevista D-galaktoosista ja 3,6-anhydro-L-galaktoosista ja muodostaa täten agarin rungon. Näistä ensimmäinen on sidoksissa C-1- ja C-3- ja jälkimmäinen C-2- ja C-4-hiilien kautta. Näiden kahden monomeerin välisillä

sidoksilla on erilainen vastustuskyky kemialliseen ja entsymaattiseen hydrolyysiin. α -1,3-sidokset hydrolysoituvat helpommin entsyymien toimesta, kun taas β -1,4-sidokset hydrolysoituvat helpommin happamien katalyyttien toimesta. β -1,4-sidos tekee agarosista kuitenkin hyvin kompaktin ja vahvan yhdisteen. (2)

Agarosin ideaalista kemiallista rakennetta voidaan kuvata toistuvalla disakkaridilla, agarobioosilla, jossa D-galaktoosi on liittynyt 3,6-anhydro-L-galaktoosiin. Vaihtoehtoisesti tätä rakennetta voidaan kuvata niin, että 3,6-anhydro-L-galaktoosi on liittynyt D-galaktoosiin, jolloin muodostuvaa rakennetta kutsutaan neoagarobioosiksi. Agarobioosin ja neoagarobioosin ero on siis D-galaktoosia ja 3,6-anhydro-L-galaktoosia yhdistävässä sidoksessa. Puhtaan agarosin molekyylipaino on noin 120 000, jota edustaa 400 agarobioosiyksikköä sidoksissa toisiinsa. Agarin ja agarosin perusrakenne käy ilmi kuvasta 1. Agarosin ideaalinen rakenne näkyy kuvassa 2. (1, 2, 4)



Kuva 1. Agarin ja agarosin perusrakenne. (4)



Kuva 2. Agarosin ideaalinen rakenne. (4)

Jotkut 3,6-anhydro-L-galaktoosiyksiköt voivat olla korvautuneet L-galaktoosilla riippuen raaka-aineen alkuperästä. Lisäksi jotkut D-galaktoosi- ja L-galaktoosiyksiköt voivat olla metyloituneet, jolloin niistä muodostuu 6-O-metyyli-D-galaktoosia ja 2-O-metyyli-L-galaktoosia. Tämä metylaatio, joka johtuu prosessissa käytettävästä merilevästä, määrittää agarosin geeliytymispisteen ja siten agarin laadun. D-ksyloosia on löydetty hyvin pienissä määrin hydrolysoituneesta agarosista, mutta sille ei ole löydetty paikkaa agarosin rakenteesta. (2)

Poolisia yhdisteitä, kuten palorypälehappoa ja rikkihappoa, on myös löydetty pienissä määrin agarosista. Nämä yhdisteet saattavat olla peräisin agaropektiinistä, jota on jäänyt agarosiin sen prosessoinnin jälkeen tai ne saattavat olla kytköksissä suoraan agarosin rakenteeseen riippuen käytettävästä levästä. Monista agarosin valmistusmenetelmistä huolimatta täysin varauksista vapaata agarosia ei ole saatu valmistettua. Monet tutkijat ovat käyttäneet kahta tai kolmea eri menetelmää yhdessä tehostaakseen erotusta ja vähentääkseen elektronegatiivisten ryhmien määrää. Elektroendo-osmoosin (luku 4.3), jonka elektronegatiiviset ryhmät saattavat aiheuttaa, poistamiseksi on ollut tarpeellista käyttää elektroposiivisia ryhmiä tai käyttää joitakin muita keinoja kationien migraation estämiseksi. (2)

Nykyään kaupallisia agarooseja, joita käytetään biokemiallisissa erotustekniikoissa, muokataan kemiallisesti, jolloin niiden rakenteet poikkeavat alkuperäisestä. Agarosin kemiallista rakennetta on yleensä muokattu ellei valmistaja toisin ilmoita (2)

Agaroosia tuotetaan leväsuvuista *Gelidium* ja *Gracilaria*, joiden tuotokset ovat hyvin erilaisia ominaisuuksiltaan. Agaroosia käytetään biokemian alalla proteiinien erottelemiseen lähinnä analyttisissä laboratorioissa, mutta myös joissain isommissa tuotannon sovelluksissa. Sitä voidaan käyttää immunodiffuusiassa ja diffuusiotekniikoissa sekä elektroforeesi- ja kromatografiatekniikoissa. Mikrobiologiassa agaroosia käytetään erityisiin viljelyihin, joista monet liittyvät kasvien tutkimiseen. (2)

2.5 Agaropektiini

Agaropektiineillä on matala geeliytymiskyky vesiliuoksissa. Agaropektiineille ei ole määrätty tarkkaa rakennetta, mutta yleisesti on hyväksytty, että ne koostuvat vuorottelevista yksiköistä D-galaktoosia ja L-galaktoosia, ja että ne sisältävät kaikki pooliset ryhmät, jotka agar sisältää. (2)

On tutkittu, että L-galaktoosi-6-sulfaatti ja D-galaktoosi-4-sulfaatti ovat suurimmat jäännössulfaatit agarissa. Pieniä ja keskinkertaisia määriä 3,6-anhydro-L-galaktoosia on myös havaittu. Nämä pienet määrät riippuvat merilevän alkuperästä, sadonkorjuun ajasta ja menettelystä, jota käytetään agarosin erottelemiseen. Agarista on myös havaittu 4,6-O-(1-karboksietyliidiini)-D-galaktoosia. Tämä yhdiste on suhteellisen tärkeä agaropektiinissa, mutta agaroosissa sitä on paljon vähemmän. Palorypälehapon määrä vaihtelee suuresti riippuen raaka-aineena käytetystä merilevästä. Agarista on vahvistettu löytyvän palorypälehappoa 0,2 - 2,50 % ja agaroosista 0,02 - 1,30 %. (2)

Vaikka agaropektiinin perusrakenne koostuu vuorottelevista D-galaktoosista ja L-galaktoosista, voi D-galaktoosi olla korvautunut D-galaktoosi-4-sulfaatilla, 4,6-O-(1-karboksietyliidiini)-D-galaktoosilla tai mahdollisesti D-galaktoosi-2,6-

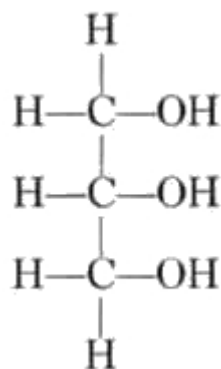
disulfaatilla. Samalla osa L-galaktoosista voi olla korvautunut 3,6-anhydro-L-galaktoosilla. Nämä substituutiot antavat agaropektiinille valtavan määrän erilaisia kemiallisia rakennevaihtoehtoja. (2)

3 Gealien valmistuksessa käytettäviä aineita

Isoelektriseen fokusointiin tarkoitettuihin geeleihin lisätään yleensä valmistusvaiheessa glyserolia tai sorbitolia, joista ensimmäinen on kolmen arvoinen ja jälkimmäinen kuuden arvoinen alkoholi. Näiden tehtävänä on parantaa gealien mekaanisia ominaisuuksia. Lisäksi ne pienentävät elektroendo-osmoosia hygroskooppisten ominaisuuksiensa ansiosta. Galaktomannaanit ovat heterogeenisiä polysakkarideja, joiden tehtävänä on tehdä geeleistä kiinteämpiä, vähemmän hauraita ja elastisempia. Näistä aineista kerrotaan lisää seuraavissa kappaleissa. (5, 6, 7, 8)

3.1 Glyseroli

Glyseroli on kirkas, viskoosinen ja lähes väritön neste, joka maistuu makealta mutta on hajuton. Glyserolilla on kolme hydrofiilistä hydroksyyli ryhmää, jotka ovat vastuussa sen liukoisuudesta veteen, sekä sen hygroskooppisista ominaisuuksista. Glyserolia löytyy rasvoista ja öljyistä ja se on tärkein triasyyliglyseroli kookospähkinöissä ja oliiviöljyssä. Glyserolia pystytään tuottamaan monilla erilaisilla metodeilla kuten esimerkiksi öljyjen ja rasvojen saippuoimisen sivutuotteena. Sitä saadaan myös biodieselin valmistuksen sivutuotteena. Luonnollista glyserolia tuotetaan triasyyliglyserolien suorassa hydrolyysissä, joka tapahtuu suurissa jatkuvatoimisissa reaktoreissa korkeassa lämpötilassa ja paineessa katalyytin läsnä ollessa. Glyserolin rakennekaava käy ilmi kuvasta 3. (5, 9, 10)



Kuva 3. Glyserolin kemiallinen rakennekaava. (11)

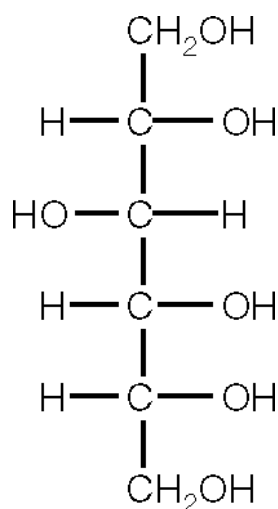
3.1.1 Käyttötarkoitukset

Glyserolin yksi tärkeimmistä ominaisuuksista on se, että se ei ole myrkyllinen ihmisille. Tämän vuoksi sitä voidaan käyttää ruuissa, siirapeissa, voiteissa, lääkkeissä ja kosmetiikkatuotteissa. Ruuissa glyseroli toimii kostuttimena, liuottimena ja makeuttajana ja se voi myös pidentää säilyvyyttä. Sitä voidaan myös käyttää täyteaineena vähärasvaisissa ruuissa ja sakeutusaineena likööreissä. Glyserolia käytetään myös liukastusaineena ruuan, lääkkeiden ja kosmetiikkatuotteiden valmistuksessa öljyn sijasta tuotteiden turvallisuuden vuoksi. (5, 10)

Glyserolia käytetään nitroglyseriinin valmistuksessa, joka on tärkeä raaka-aine savuttomassa ruudissa, dynamiitissa ja korditissa. Glyserolia löytyy myös alle 0 °C:ssa säilytettävistä entsyymaattisten reagenssien liuottimista, joissa sen tehtävä on alentaa jäätymislämpötilaa. Lääke- ja kosmetiikkatuotteista glyserolia löytyy muun muassa yskänlääkkeistä, hammastahnoista, hius- ja ihonhoitotuotteista. Näissä sen tehtävä on toimia liukastimena, kosteuttajana ja homogenisuuden parantajana. Tässä mainitut tuotteet ovat kuitenkin vain murto-osa siitä, mihin glyserolia käytetään. (5, 10)

3.2 Sorbitoli

Sorbitoli, toiselta nimeltään glukitoli, on valkoinen, kiteinen aine, joka maistuu makealta. Myös sorbitolilla, kuten glyserolilla, on hygroskooppisia ominaisuuksia, josta ovat vastuussa sen kuusi hydroksyyli ryhmää. Pieniä määriä sorbitolia esiintyy monissa eri hedelmissä, mutta muuten sitä syntetisoidaan laajalti teollisessa mittakaavassa glukoosia pelkistämällä. Se on myös tärkeä raaka-aine C-vitamiinin teollisessa synteesissä. Sorbitolin ja alempien alkoholien (glykoli, glyseroli) kemiallisen samankaltaisuuden vuoksi näiden aineiden fysikaaliset ominaisuudet sekä sovellukset teollisuudessa ovat lähellä toisiaan. Sorbitolin kemiallinen rakennekaava käy ilmi kuvasta 4. (12, 13)



Kuva 4. Sorbitolin kemiallinen rakennekaava. (14)

3.2.1 Käyttötarkoitukset

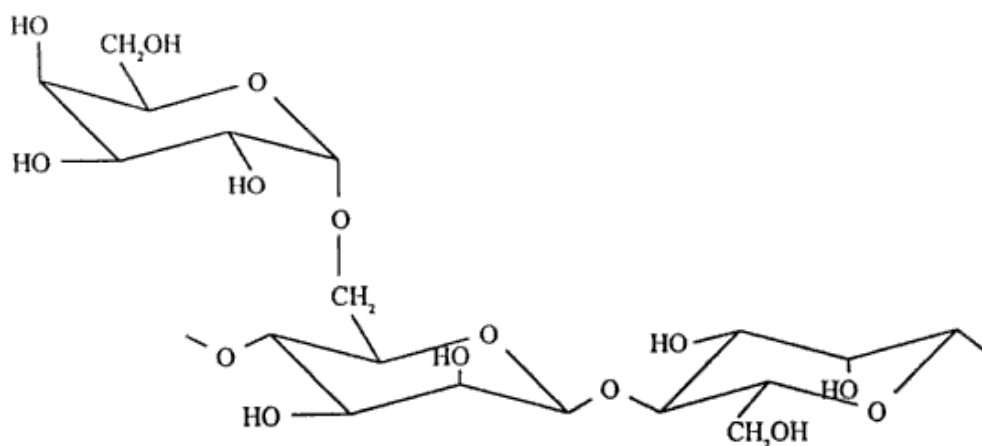
Heksitoleja ja niiden johdannaisia, erityisesti sorbitolia, käytetään monissa eri teollisuudenalojen tuotteissa kuten lääkkeissä, kosmetiikassa, hammastahnoissa, savukkeissa, tekstiileissä, liima-aineissa, elintarvikkeissa jne. Sorbitolin tehtävänä on yleensä toimia kosteudensäilyttäjänä, jota monet tuotteet tarvitsevat säilyttääkseen tuoreutensa, pehmeytensä ja joustavuutensa. Sitä käytetään esimerkiksi makeisten, leivonnaisten ja suklaan tuotannossa,

sillä muuten nämä tuotteet voisivat kuivua ja kovettua. Sorbitolin kosteuden stabilointiominaisuudet suojaavat näitä tuotteita kuivumiselta sekä säilyttävät alkuperäisen kosteuden varastoinnin aikana. (13)

Sorbitolia käytetään paljon sakeuttamisaineena apteekista saatavissa yskänlääkkeissä ja eliksiireissä. Sen käyttö yskänlääkkeissä vähentää pullonkorkin taipumusta liimautua kiinni pulloon johtuen sorbitolin kiteytymisestä. Sorbitolia käytetään myös erilaisissa voiteissa ja tahnoissa lisäämään näiden leviämiskykyä. Sorbitolin vesiliuokset eivät pilaannu käymisteitse, joten sille löytyy käyttöä myös hammashuollon sovelluksissa. Näiden tuotteiden lisäksi sorbitolilla on monia muita käyttökohteita, joita ei tässä työssä käydä läpi. (13)

3.3 Galaktomannaanit

Kaksi tärkeintä luonnonkumia, guarkumi ja karobikumiliima, ovat sakeuttajina käytettyjä polysakkarideja. Guarkumilla on mahdollista saada aikaan korkein viskositeetti verrattuna muihin luonnollisiin ja kaupallisiin kumeihin. Molemmat kumit koostuvat siementen jauhetuista endospermeistä ja molempien endospermien pääkomponenttina on galaktomannaani, jonka pääketjuna toimii 1,4-linkitetty D-mannopyranoosi (Man), johon on liittynyt 1,6-linkitettyä D-galaktopyranosyyli (Gal) yksiköitä. Guarkumissa noin puolella pääketjun D-mannopyranoosiyksiköistä on D-galaktopyranosyylisivuketju. Karobikumiliimalla on vähemmän haarautuneita yksiköitä ja sen rakenne on epäsäännöllisempi. Guarkumin ja karobikumiliiman lisäksi on olemassa satoja muita lajikkeita, joilla on erilaisia käyttömahdollisuuksia. Galaktomannaanimolekyylin perusrakenne selviää kuvasta 5. (15, 7)



Kuva 5. Galaktomannaanimolekyylin rakenne. (15)

Guarkumin ja karobikumiliiman rakenteellisista eroista johtuen niillä on myös eroavia fysikaalisia ominaisuuksia. Koska guarkumin galaktopyranosyyliyksiköt ovat melko tasaisin välein liittyneet pääketjuun, ei siinä ole tilaa liittymävyöhykkeiden muodostuksille. Karobikumiliiman pääketjussa on paljon ”paljaita” kohtia, jotka voivat muodostaa tällaisia liittymävyöhykkeitä. Sen molekyylit voivat reagoida selluloosan johdannaisien kanssa muodostaakseen liittymävyöhykkeitä, joka vuorostaan vaikuttaa viskositeetin kasvuun. Karobikumiliimaa voidaan myös käyttää yhdessä ksantaanin tai karrageenin kanssa jäykkien geelien muodostukseen. (15)

Galaktomannaaneja on tutkittu, koska ne muodostavat viskoosisia vesiliuoksia. Vesiliuoksissa ne esiintyvät satunnaisessa konformaatiossa, ja järjestäytyneempiä muotoja esiintyy vain tietyissä, suotuisissa olosuhteissa, jotka sallivat aggregoitumisen ja/tai vuorovaikutuksen muiden lajien (esim. agarosi) kanssa. On tutkittu, että karobikumiliima vaikuttaa jo pieninä lisäyksinä suotuisasti agarosigeelien lujuuteen ja elastisuuteen. On myös havaittu, että se karobikumiliiman osa, joka liukenee kuumaan veteen, on pääosin vastuussa agarosigeelien vahvistamisesta. Näiden luonnonkumiin (karobikumiliima, guarkumi) teollinen merkittävyys johtuu myös siitä, että ne ovat paljon halvempia kuin karrageeni ja agar. (7)

3.3.1 Käyttötarkoitukset

Luonnonkumeja voidaan usein käyttää ihmisravintona erilaisissa muodoissa kuten esimerkiksi meijerituotteissa ja pakastejälkiruuissa. Kumien erilaiset kemialliset ominaisuudet tekevät niistä monikäyttöisiä raaka-aineita, joita voidaan käyttää monissa sovelluksissa. Man/Gal -suhteet vaihtelevat riippuen kumista, jolloin myös rakenteet vaihtelevat. Tämä määrittää sen, mihin teollisuuden sovellutuksiin mitäkin kumia käytetään. Galaktomannaanit ovat tärkeitä muun muassa paperi-, tekstiili-, öljynporausta-, lääke-, kosmetiikka-, räjähdysaine-, ja elintarviketeollisuudessa. Joitakin kumien tärkeimpiä ominaisuuksia ovat veden sitominen, sakeuttaminen, geeliytyminen, suspendoiminen, emulgoiminen ja filmien muodostus. Näitä ominaisuuksia voidaan vielä tehostaa muiden monomeerien ja polymeerien avulla, johtuen galaktomannaanien kyvyistä muodostaa synergistisiä vuorovaikutuksia lukuisien OH-ryhmien avulla. (7)

4 Elektroforeesi

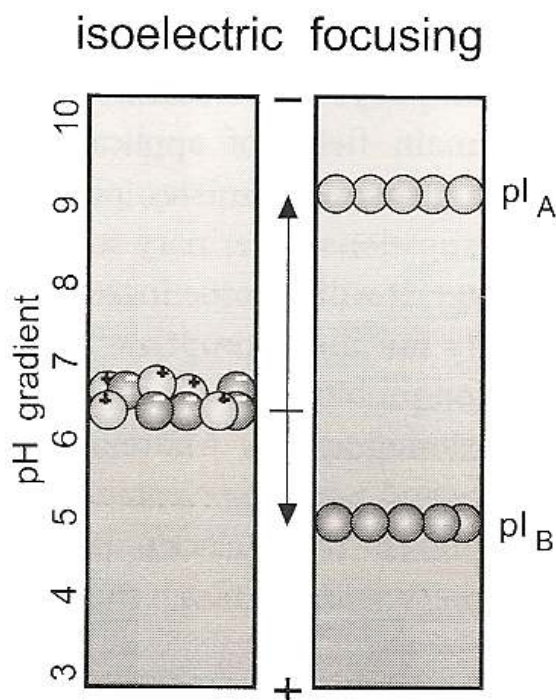
Elektroforeesitekniikoita käytetään vähintäänkin yhtä laajalti kuin kromatografisia menetelmiä. Elektroforeesin avulla voidaan saavuttaa korkea erotustehokkuus suhteellisen pienellä välineistön määrällä. Uusien teknologioiden, kuten PCR:n ja massaspektrometrian, avulla voidaan elektroforeettisesti eroteltuja fraktioita analysoida yhä pidemmälle. Elektroforeesia käytetään muun muassa biologian, biokemiallisen tutkimuksen, proteiini kemian, farmakologian, oikeuslääketieteen, eläinlääketieteen ja molekyylibiologian aloilla. (8)

Elektroforeesissa varautuneet molekyylit ja partikkelit kulkeutuvat vastakkaisen varauksen omaavan elektrodin suuntaan sähkökentän vaikutuksesta. Tämän prosessin aikana kaikki aineet ovat yleensä vesiliuoksessa. Molekyylien ja partikkelien erilaisista massoista ja varauksista johtuen, ne kulkeutuvat eri nopeuksilla ja erottuvat siten eri fraktioiksi. (8)

Elektroforeettinen liikkuvuus, joka tarkoittaa kulkeutumisen nopeutta, on merkittävä, varautuneen molekyylin tai partikkelin mittasuure. Se riippuu varautuneiden ryhmien pK-arvoista ja molekyylien tai partikkelien koosta. Siihen vaikuttaa käytettävän puskuriliuoksen tyyppi, konsentraatio ja pH sekä lämpötila ja sähkökentän voimakkuus kuin myös tukimateriaalin luonne. Elektroforeettiset erottelut toteutetaan vapaissa liuoksissa kuten kapillaari- tai kiitovirtaussysteemeissä tai tukiaineissa kuten filmeissä tai geeleissä. Nykyään on käytössä kolme erilaista elektroforeettista erotusmenetelmää, vyöhyke-elektroforeesi, isotakoforesi ja isoelektrinen fokusointi, eli IEF, josta kerrotaan lisää seuraavissa kappaleissa. (8)

4.1 Isoelektrinen fokusointi

Isoelektrinen fokusointi on tekniikka, joka tapahtuu pH-gradientissa ja sitä voidaan käyttää ainoastaan amfoteeristen aineiden, kuten peptidien ja proteiinien, erotteluun. IEF-ajossa molekyylit liikkuvat kohti anodia tai katodia kunnes ne saavuttavat kohdan pH-gradientissa, jossa niillä ei ole nettovarausta. Tämä pH-arvo on kyseisen aineen isoelektrinen piste. Koska molekyylit eivät ole enää varautuneet, sähkökentällä ei ole niihin vaikutusta. Jos aine kuitenkin kulkeutuisi pois omalta pI-pisteeltään, sille muodostuisi uudestaan nettovaraus ja se kulkeutuisi sähkövirran vaikutuksesta takaisin. Isoelektrisessä fokusoinnissa on tärkeää löytää oikea pH-alue näytteelle, sillä jotkin aineet ovat epävakaita tietyissä pH-arvoissa. Isoelektrisen fokusoinnin periaate selviää kuvasta 6. (8)



Kuva 6. Isoelektrinen fokusointi. (8)

Isoelektrisen fokusoinnin käyttö on siis rajoittunut joko positiivisesti tai negatiivisesti varautuneisiin molekyyleihin. Näillä molekyyleillä täytyy myös olla isoelektrinen piste, jossa ne eivät ole varautuneet. Proteiinit ja peptidit ovat tällaisia amfoteerisia molekyylejä. Proteiinin nettovaraus on sen sivuketjuissa olevien aminohappojen negatiivisten ja positiivisten varausten summa. Yhdistelmäproteiineilla, kuten glyko- ja nukleoproteiineilla, nettovaraus riippuu myös sokeri- tai nukleiinihappopuolikkaista. Myös fosforylaation määrä vaikuttaa nettovaraukseen. (8)

Verrattuna esimerkiksi perinteisempään vyöhyke-elektroforeesiin, isoelektrisella fokusoinnilla on tarkka päätekohta. Tämä tarkoittaa sitä, että proteiinien ryhmittyminen, kun ne ovat saavuttaneet pI -pisteensä, on vakaa ilman aikarajoitusta. Tämä ei kuitenkaan päde kaikkien proteiinien kohdalla. Isoelektrisessä fokusoinnissa saadaan kuitenkin tarkkoja proteiinivyöhykkeitä ja korkean erotuskyvyn tuloksia. (8)

4.2 Geelit

Analyttinen fokusointi toteutetaan joko polyakryyliamidigeeleissä tai agarosigeeleissä, joista jälkimmäistä käsitellään seuraavissa kappaleissa. Näissä on suotuisaa käyttää hyvin ohuita geelejä, joilla on suuri huokoskoko, valettuna tukikalvoille. (8)

4.2.1 Agarosigeelit

IEF-laatuisia agarosigeelejä on ollut markkinoilla vuodesta 1975, jolloin tuli mahdolliseksi eliminoida agarosin varaukset poistamalla agaropektiinijäämät raakamateriaalista tai peittämällä ne. Agarosigeelit ilmentävät suurempaa elektroendo-osmoosia kuin polyakryyliamidigeeelit. (8)

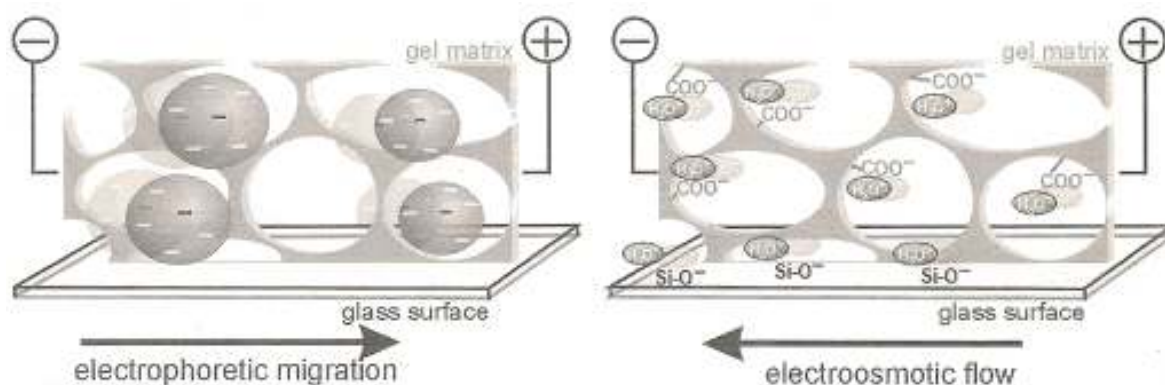
Agarosigeelit sisältävät yleensä 0,8 - 1,0 % agarosia ja niissä tapahtuvat separaatiot ovat nopeampia kuin polyakryyliamidigeeleissä. Lisäksi agarosigeeleillä voidaan erotella yli 500 kDa:n makromolekyylejä, sillä agarosin huokoset ovat huomattavasti suurempia kuin polyakryyliamidigeeleissä. IEF-laatuista agarosia käytetään geelien valmistukseen myös siksi, että se ei ole myrkyllistä eikä se sisällä katalyyttejä, jotka voisivat häiritä separointia. Korkean ureakonsentraation omaavia agarosigeelejä on vaikea valmistaa, sillä urea häiritsee polysakkaridiketjujen kierremäisen rakenteen konfiguraatiota. Tässä tapauksessa uudelleen kosteutettavat agarosigeelit ovat kannattavampia. (8)

4.3 Elektroendo-osmoosi

Geelin alusta, itse geeli ja isoelektriseen fokusointiin käytettävän muun välineistön pinnat, kuten aluslevyt, putket ja kapillaarit, voivat kantaa varauksellisia ryhmiä kuten esimerkiksi karboksyyli-ryhmiä tärkkelyksessä ja agarosissa, sulfoniryhmiä agarosissa ja pihapporyhmiä lasitarvikkeiden pinnoilla. Nämä ryhmät ionisoituvat emäksisissä ja neutraaleissa puskureissa,

jolloin anodi vetää niitä puoleensa sähkökentässä. Ne ovat kuitenkin kiinnittyneet geeliin, jolloin kulkeutuminen ei ole mahdollista. Tämä ilmenee H_3O^+ -ionien vastavirran kompensaatina katodia kohden eli elektroendo-osmoosina. (8)

Geeleissä tätä ilmiötä tarkkaillaan veden virtaamisena katodia kohden, joka kantaa liuenneita aineita mukanaan. Elektroendo-osmoosin vaikutuksesta geeleihin muodostuu sumeita alueita ja ne kuivuvat anodipuolelta. Elektroendo-osmoosin toimintaperiaate selviää kuvasta 7. (8)



Kuva 7. Elektroendo-osmoosi. Negatiivisesti varautuneet ryhmät, jotka ovat kiinnittyneet geeliin tai välineistön pinnalle aiheuttavat vesi-ionien virtauksen. Tämä ilmenee veden kulkeutumisena kohti katodipäätä, joka johtaa epäselviin alueisiin geelissä. (8)

4.4 pH-gradientit

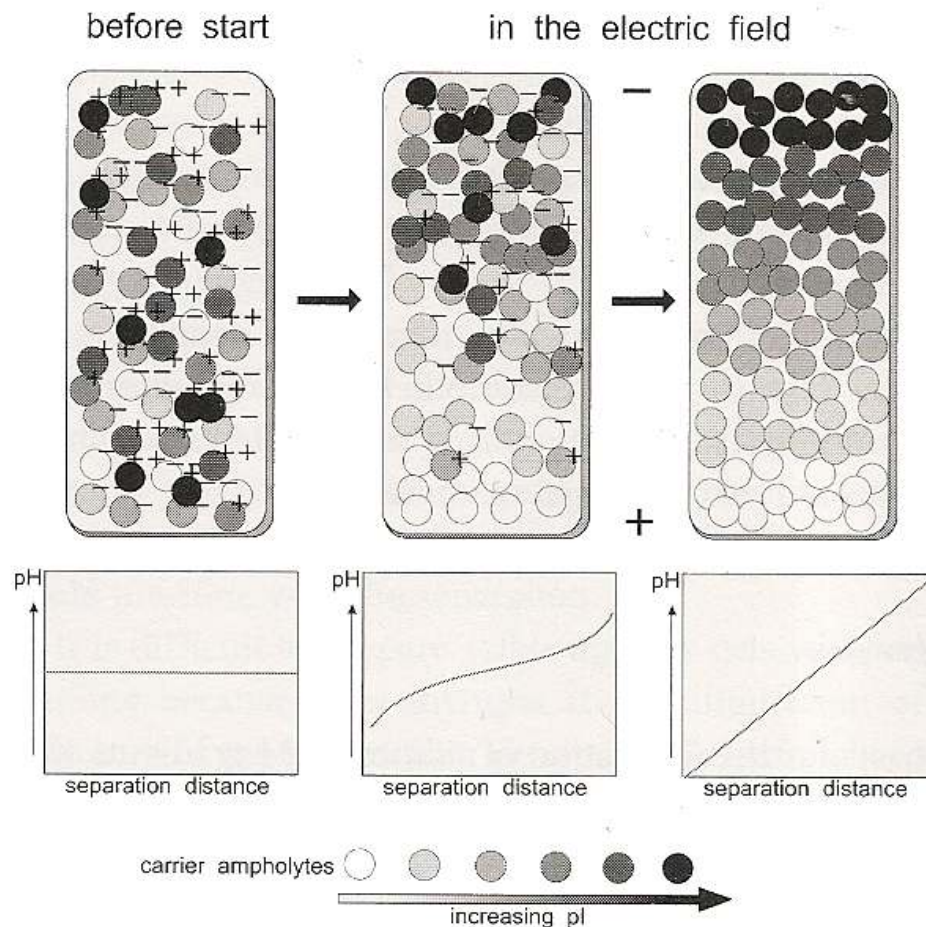
Yhtenä edellytyksenä toimiville ja toistettaville separaatioille on vakaa ja yhtenäinen pH-gradientti, jolla on tasainen ja jatkuva johtokyky sekä puskurointikapasiteetti. (8)

On olemassa kaksi eri sovellutusta, jotka sopivat näihin kriteereihin: pH-gradientit, jotka muodostuvat sähkökentässä amfoteeristen puskurien eli kantaja-amfolyyttien vaikutuksesta tai kiinnitetyt pH-gradientit, joissa puskurointiryhmät ovat osa geeliä. (8)

4.4.1 Vapaat kantaja-amfolyytit

“Luonnollisen” pH-gradientin teoreettinen pohja ymmärrettiin jo vuosia ennen kuin se osattiin toteuttaa käytännössä. Tällä tarkoitetaan synteesiä, jossa muodostuu heterogeeninen sekoitus alifaattisia oligoamino-oligokarboksyliihappojen isomeerejä. Nämä puskurit kattavat spektrin amfolyyttejä, joilla on pieni molekyylipaino ja toisiaan lähellä olevat isoelektriset pisteet. Näillä kantaja-amfolyyteillä on seuraavia ominaisuuksia: korkea puskurointikapasiteetti ja liukoisuus sekä hyvä ja tasainen johtavuus pl-pisteessä, biologisten ilmiöiden puuttuminen sekä pieni molekyylipaino. Luonnollisesti esiintyvillä amfolyyteillä, kuten peptideillä ja aminohapoilla, ei ole korkeinta puskurointikapasitettia pl-pisteissään, jolloin niitä ei myöskään voida käyttää isoelektrisessä fokusoinnissa. (8)

pH-gradientti muodostuu geelille sähkövirran vaikutuksesta. Esimerkiksi geelissä, jossa on yleisimmin käytetty määrä kantaja-amfolyyttejä (2 - 2,5 %), on yhtäläinen pH-alue. Melkein kaikki kantaja-amfolyytit ovat varautuneita: korkean pl-pisteen omaavat positiivisesti ja matalan pl-pisteen omaavat negatiivisesti. Kantaja-amfolyyttien jakautumisen periaate selviää kuvasta 8. (8)



Kuva 8. Kantaja-amfolyyttien jakautuminen sähkökentässä. (8)

Kun sähkökenttä kytketään päälle, negatiivisesti varautuneet kantaja-amfolyytit kulkeutuvat kohti anodia ja positiivisesti varautuneet kohti katodia ja niiden nopeus riippuu varauksen suuruudesta. Tällöin geelin anodipäästä tulee happamampi ja katodipäästä emäksisempi. (8)

Kantaja-amfolyyttimolekyylit joilla on alhaisin pI kulkeutuvat anodia kohden ja ne, joilla on korkein pI kulkeutuvat katodia kohden. Muut kantaja-amfolyytit asettuvat tähän väliin riippuen niiden pI-arvoista sekä määrittävät ympärillään vallitsevat pH-arvot. Näin muodostuu asteittain nouseva pH-gradientti esim. välillä pH 3 - pH 10. (8)

Koska kantaja-amfolyyteilla on pieni molekyylipaino, niillä on korkea diffuusionopeus geelissä. Tämä tarkoittaa sitä, että ne diffundoituvat nopeasti ja jatkuvasti pois pI-pisteestään ja kulkeutuvat taas takaisin. Tämän vuoksi

tasainen pH-gradientti muodostuu myös silloin, kun on käytettävissä vain rajallinen määrä isomeereja. (8)

5 Hemoglobiini

Hemoglobiini eli verenpuna on rautapitoinen proteiini. Sen tärkein tehtävä on kuljettaa happea keuhkoista kudoksiin, ja palauttaa hiilidioksidi takaisin keuhkoihin. Sitä löytyy elimistössä kiertävistä punasoluista, jotka muodostavat noin puolet veren tilavuudesta. Hemoglobiini käsittää noin 15 % veren kokonaispainosta. (16)

5.1 Aminohapot ja polypeptidiketjut

On olemassa kaksikymmentä erilaista aminohappoa, jotka ovat liittyneet toisiinsa tietyssä järjestyksessä muodostaakseen polypeptidiketjuja. Jokaisen aminohapon sivuketju on erilainen. Suurin osa näistä sivuketjuista on sähköisesti neutraaleja, mutta jotkin ovat negatiivisesti tai positiivisesti varautuneita. (17)

Proteiinimolekyylit koostuvat näistä polypeptidiketjuista. Aminohappojen järjestys polypeptidiketjussa määräytyy sen geenin mukaan, mikä on vastuussa kyseisen proteiinin tuotannosta. Neljä tärkeää polypeptidiketjua, jotka muodostavat ihmisessä eri hemoglobiinimolekyylit, on merkitty alfa (α)-, beeta (β)-, gamma (γ)-, ja delta (δ)-kirjaimilla. Hemoglobiinimolekyyli koostuu aina neljästä proteiiniketjusta (globiini), joista jokaista ympäröi prosteeattinen ryhmä (hemi). (16, 17)

5.2 Hemoglobiinin kehitys

Alkioasteella olevasta ihmisestä löytyy muutaman ensimmäisen kuukauden aikana Hb E-hemoglobiinia, jolla on hyvin vähän kliinistä merkitystä. (17)

Vastasyntyneen lapsen hemoglobiinista noin 70 % on Hb F-hemoglobiinia. Tämä määrä putoaa kuitenkin noin 1 %:iin ensimmäisen elinvuoden aikana. Hb F:n ketjurakenne on $\alpha_2\gamma_2$. Sikiöstä löytyvät γ -polypeptidiketjut korvautuvat ensimmäisen vuoden aikana β - ja δ -polypeptidiketjuilla, jotka muodostavat aikuisen hemoglobiinin Hb A ($\alpha_2\beta_2$) ja hemoglobiini A₂:n ($\alpha_2\delta_2$). (17)

A₂-hemoglobiini on toiminnallisesti merkityksetön, sillä se muodostaa vain alle 3 % aikuisen hemoglobiinista. Sitä käytetään kuitenkin mittauksissa β -talassemiaa diagnosoitaessa. (17)

Aikuisen ihmisen hemoglobiinista yli 95 % sisältää $\alpha_2\beta_2$ -ketjurakenteen. Jokaisella hemoglobiinimolekyylillä on siis kaksi α -polypeptidiketjua ja kaksi β -polypeptidiketjua. Tähän liittyvät yleisimmät sairaudet johtuvat epänormaalien β -polypeptidiketjun (sirppisoluanemia) tai normaalia vähäisemmän β -polypeptidiketjun (β -talassemia) tuotannosta. (17)

Kolmella fysiologisesti tärkeällä hemoglobiinilla, Hb A, Hb F ja Hb A₂, on kaikilla α -ketjut mutta ne eroavat kuitenkin muiden ketjujensa osalta. Mikä tahansa poikkeavuus α -ketjuissa vaikuttaa siten Hb A-, Hb F- ja Hb A₂-hemoglobiineihin. Poikkeavuudet β -ketjuissa vaikuttavat ensisijaisesti vain Hb A:n, sillä se on ainoa hemoglobiini joka sisältää β -ketjun. (17)

5.3 Hemoglobinopatiat

Varianttihemoglobiinit johtuvat aminohappojärjestyksen muutoksista α -, β -, γ - tai δ -ketjuissa, jotka toimivat rakennusaineina Hb A-, Hb F- ja Hb A₂-tetrameereille. Muutokset voivat johtua aminohappojen korvautumisista, deleetioista, lisäyksistä, pidennyksistä tai fuusioitumisista globiiniketjuissa. (16)

Suurin osa varianttihemoglobiineista on seurausta aminohappojen korvautumisista yksittäisessä globiiniketjussa. On olemassa alfa-, gamma-, beeta- ja delta-ketjuvariantteja, joista suurin osa ei kuitenkaan tuota kliinisesti merkittäviä epänormaalisti toimivia hemoglobiineja. Noin 25 % varianttihemoglobiineista toimii epänormaalisti tavalla. (16)

Hb S (sirppisoluanemia) on hemoglobinopatia, jossa glutamiinihappo on korvautunut beeta-ketjussa valiinilla. Tämä korvautuminen johtaa erittäin suureen liukoisuuden laskuun Hb molekyylin pelkistytessä, jolloin muodostuu sirpin muotoinen punasolu. Tämä voi johtaa punasolujen vähäiseen määrään eli anemiaan. (16)

Muutamilla varianteilla on kaksi aminohapposubstituutiota, eli kaksi pistemutaatiota. Tällaisia ovat esimerkiksi Hb C-Harlem ja Hb Korle Bu. Suurimmassa osassa näistä varianteista mutaatio on tapahtunut beeta-ketjussa. (16)

Muita yleisimpiä variaatioita ilmenee, kun aminohappoja puuttuu globiiniketjuista tai niitä on liikaa. Myös näiden kahden yhdistelmä on mahdollinen. Nämä variantit aiheuttavat yleensä hemoglobiinin epänormaalin hapensitomiskyvyn, ja/tai epävakaa hemoglobiinityyppiä. (16)

5.4 Talassemiat

Talassemioista on kyse silloin, kun tietyn globiiniketjun tuotanto on normaalia pienempi. Yksilö, jolla on talassemia, tuottaa siis normaaleja globiiniketjuja poikkeavan hitaasti tai ei ollenkaan. Talassemiat ovat yleisimpiä geneettisiä sairauksia maailmassa ja ne voivat olla keskenään hyvin erilaisia. (16)

Beeta-talassemia on tila, jossa beeta-globiinin tuotantoa säätelevä DNA-informaatio on osittain tai täysin viallinen. Tämä johtaa beeta-ketjujen alituotantoon (β^+ -thal) tai täydelliseen puuttumiseen (β^0 -thal). Henkilöillä, joilla on vain yksi beeta-globiinigeeni ovat kantajia, mutta eivät välttämättä kärsi epäsuotuisista terveydellisistä vaikutuksista. Hb A:n tuotanto on kuitenkin vähentynyt, koska vain yksi β -geeni toimii normaalisti. (16)

Alfa-talassemia on heterogeeninen geneettinen sairaus. Sairautta monimutkistaa se, että jokainen henkilö perii vanhemmiltaan neljä alfa-geeniä, eli kaksi geeniä kummaltakin (α_1 ja α_2). Nämä kaksi geeniä eivät tuota

alfaketjuja samassa tahdissa, joten α -talassemia voi johtua yhdestä, kahdesta, kolmesta tai neljästä viallisesta tai puuttuvasta geenistä. (16)

Heterotsygoottinen alfa-talasseemia (α -thal-2) ilmenee, kun ainoastaan yksi alfa-geeni puuttuu. Tällöin alfa-ketjujen tuotanto voi vähentyä 25 %:iin asti. Tätä sairautta on vaikea diagnosoida aikuisella ihmisellä, eikä siitä myöskään aiheudu terveydellisiä vaikutuksia. (16)

Homotsygoottinen alfa-talasseemia (α -thal-2) ja heterotsygoottinen alfa-talasseemia (α -thal-1) ovat kaksi samankaltaista tautia, joissa molemmilta vanhemmilta perityissä kromosomeissa on yksi normaali alfa-geeni, tai toiselta vanhemmalta on peritty molemmat alfa-geenit ja toiselta ei yhtään. Tämä tila aiheuttaa aikuisessa ihmisessä anemiaa ja hypokromiaa. (16)

Hb H (β_4) sairaus johtuu kolmesta puuttuvasta alfa-geenistä. Tässä tapauksessa vain yksi geeni on toiminnallinen ja tuottaa juuri tarpeeksi globiiniketjuja elämän ylläpitämiseksi. Tämä aiheuttaa aikuisessa ihmisessä hemolyyttistä anemiaa. (16)

Vakavin alfa-talassemioiden muoto (α -thal-1) on kuolemaan johtava tauti vastasyntyneille, sillä keho ei pysty tuottamaan yhtään hemoglobiinimolekyyliä. (16)

6 Kokeellinen osuus

Karakterisoinnin toteuttamista varten laadittiin yleistason suunnitelma (liite 1).

Testien suorittamiseen käytettiin laadunvalvontaohjeen W270-424 sivuja 5-7 (testigeelien valmistus ja testaus isoelektrisellä fokusoinnilla) ja 9-10 (testigeelien hyväksymisvaatimukset) sekä N- ja H-kontrollien mittaustulosten kirjaamiseen erikseen tehtyä taulukkoa. Jokaista testiä varten valettiin kolme geeliä, joista kaksi ajettiin. Testit voidaan jakaa karkeasti kolmeen pääryhmään: ”sorbitolipitoisuus ja keittoaika”, ”agaroosien sekoittaminen” sekä ”galaktomannaanin lisäys”. Sorbitolipitoisuuden testeissä ohjeessa normaalisti

käytettävän glyserolin tilalla tai rinnalla käytettiin sorbitolia eri pitoisuuksissa. Keittoajan testeissä kokeiltiin kiehautuksen vaikutusta geelimassan rakenteeseen. Agarosien sekoittamistesteissä sekoitettiin agarosinvalmistaja A:n ja B:n agarooseja eri suhteissa. Galaktomannaanin lisäystesteissä geelimassaan lisättiin eri määriä galaktomannaania suhteessa agarosiin. Vertailun vuoksi valmistettiin geelit myös laadunvalvontaohjeen (W270-424) mukaisesti.

Jos geelien valmistuksessa ei ilmennyt ongelmia, kuten liiallista paakkuuntumista tai liian suurta viskositeettia, niille suoritettiin isoelektrinen fokusointi, kiinnitys, pesu ja kuivaus ohjeen 1390 5417 (Hb-geelien ajo-ohje) mukaan. Kontrolleina käytettiin AFSC-kontrollin lisäksi myös NAFSC- ja HAFSC-kontrolleja, jotka pipetoitiin kontrollien rajallisen saatavuuden vuoksi pelkästään toiseen geeliin. Nämä ovat kylmäkuivattuja verikontrolleja, jotka sisältävät sekä ihmisen normaaleja että epänormaaleja hemoglobiineja. Esimerkiksi AFSC-kontrolli sisältää normaaleja hemoglobiineja Hb A ja Hb F ja epänormaaleja hemoglobiineja Hb S ja Hb C. NAFSC-kontrolli sisältää lisäksi vielä hemoglobiinia Hb N ja HAFSC-kontrolli hemoglobiinia Hb H. Pipetointikaaviot ovat liitteissä 2 ja 3. Geelien valmistuksessa käytettiin aina samaa amfolyyttiä sekä agarosien valmistajien samoja eriä paitsi aivan viimeisissä testeissä. Valmistajien eri eriä käytettiin toistettavuuden varmistamiseksi. Testit tehtiin pääosin käyttäen jokaisessa testissä sekä agarosinvalmistaja A:n, että agarosinvalmistaja B:n agarooseja. Työssä käytetyt reagenssit ja laitteet ovat liitteessä 4 ja kaikkien testien tulosten yhteenveto liitteessä 5.

6.1 Geelien valaminen

Geelimassaa valmistettiin aluksi aina 70 ml sopivan kokoisessa dekantterilasissa jokaista testigeelierää varten. Tästä valettiin kolme geeliä, joista kahta käytettiin isoelektrisessä fokusoinnissa. Kolmatta geeliä käytettiin,

jos jommankumman geelin valu epäonnistui tai geeleistä saatiin ajon jälkeen toisistaan poikkeavia tuloksia.

Geelimassan valmistus aloitettiin lisäämällä glyserolia ja/tai sorbitolia riippuen reseptistä sekä magneettisauva. Tämän jälkeen seokseen lisättiin ennalta valittua amfolyyttiä. Valmistuksessa käytettävien reagenssien määrä tuli laskea ohjeessa annetulla kaavalla. Amfolyyttiä sekoitettiin 15 minuutin ajan ennen seokseen lisäämistä tasalaatuisuuden varmistamiseksi. Seokseen lisättiin vielä kiertolinjavesi ennen sekoituksen aloittamista magneettisekoittajalla. Tämän jälkeen dekantterilasiin lisättiin punnittu määrä agaroosia ja/tai galaktomannaania samalla voimakkaasti sekoittaen. Sekoitusta jatkettiin agaroosin ja/tai galaktomannaanin lisäämisen jälkeen kaksi minuuttia, jonka jälkeen dekantterilasin paino magneettisauvoineen kirjattiin ohjeessa olevaan taulukkoon. Seuraavaksi liuos lämmitettiin magneettisekoittajalla kiehumispisteeseen jatkuvasti sekoittaen, ja sen annettiin kiehua kolme minuuttia, jonka jälkeen liuokseen lisättiin kiertolinjavettä aiemmin kirjattuun loppupainoon asti.

Ennen geelien valamista koottiin kolme geelialustaa asettamalla GelBond-kalvo hydrofiilinen puoli ylöspäin metallilevyn päälle magneettisen kehyksen avulla. Geelialustojen kokoamisen jälkeen ne siirrettiin lämpölevyn päälle, jonka lämpötilaksi oli asetettu 70 °C. Tämä mahdollisti geelimassan tasoittumisen ennen geelien jäähmettymistä. Lämpölevyn käyttäjätiedot kirjattiin jokaisen käytön jälkeen työpisteestä löytyvään log book -kirjaan. Tämän jälkeen magneettisauva poistettiin dekantterilasista ja jokaiseen geelialustaan valettiin tasaisesti noin 19,5 ml kuumaa geelimassaa mittalasin avulla. Geelimassaa tasoiteltiin erityisellä metallisella sauvalla ja mahdolliset ilmakuplat poistettiin pipetillä. Geelit alustoineen siirrettiin lämpölevyn päältä työtason päälle ja annettiin jäähtyä noin 10 minuuttia, ennen kuin ne peitettiin suojakalvolla. Suojakalvoihin merkittiin erän tunnistetiedot, jonka jälkeen geelit siirrettiin pakkausrasioihin ja pakkausrasiat jääkaappiin +2 - +8 °C:een. Geelien annettiin jäähtyä vähintään tunnin ajan ennen käyttöä.

6.2 IEF-ajo

Ajopöytien jäähdytyslaitteet käynnistettiin noin 40 minuuttia ennen käyttöä, jolloin laitteistossa kiertävä vesi ehti jäähtymään 10 °C:een (geelien ajolämpötila). Seuraavaksi jokaisen ajopöydän päälle pipetoitiin 1 ml kiertolinjavettä ja aseteltiin geelit paikoilleen geelipuoli ylöspäin. Geelit aseteltiin ajopöydille niin, että vesi levisi tasaisesti GelBond-kalvojen alle. Geelejä kuivattiin varovasti imupapereilla ja geelien alle jäävät ilmakuplat poistettiin varovasti taputtelemalla. Ylimääräinen neste pyyhittiin pois geelien ympäriltä oikosulkujen ja kipinöinnin estämiseksi.

Jokaista geeliä varten aseteltiin puhtaiden paperipyyhkeiden päälle valmiiksi kaksi johdinliuskaa karkea puoli alaspäin. Puolet johdinliushkoista kasteltiin anodiliuoksella ja toinen puolisko katodiliuoksella. Ylimääräinen neste kuivattiin varovasti pois paperipyyhkeillä, jonka jälkeen anodiliuskat asetettiin geelien päälle vasemmalle puolelle ja katodiliuskat oikealle puolelle niin, että liuskojen väli oli 7 cm. Apuna käytettiin ajopöytään painettua mittataulukkoa. Katodiliuskojen viereen aseteltiin templaattit, joita tasoiteltiin varovasti ilmakuplien poistamiseksi. Tällä varmistettiin, että näytteet eivät leviä viereisiin kuoppiin. Jokaiseen valittuun näytekuppaan pipetoitiin 5 µl valittua kontrollia. Uudet kylmäkuivatut kontrollit rekonstituoitiin pipetoimalla kontrollista riippuen 1 - 2 ml Hb Elution Solution-liuosta kontrolleja sisältäviin ampulleihin. Tämän jälkeen ampulleja sekoitettiin koeputkisekoittajalla hetki ja annettiin seistä 30 minuuttia ennen käyttöä. AFSC-kontrollia pipetoitiin aina yksittäisessä testissä jokaiselle geelille kolmeen kohtaan templaatin näytekaivoon kun taas HAFSC- ja NAFSC-kontrolleja pipetoitiin vain toiselle geelille kolmeen kohtaan kumpaakin. Seuraavaksi elektrodien asentoa säädettiin niin, että ne koskettivat tasaisesti johdinliuskojen keskiosaa, kun laitteen kansi oli alhaalla. Lopuksi virtalähteestä valittiin oikea ohjelma ja ajo käynnistettiin. Tässä työssä geelien ajamiseen käytetyn ohjelman ajoparametrit ovat taulukossa 1.

Taulukko 1. Geelien ajamiseen käytetyt ohjelmaparametrit.

TEHO	MAX JÄNNITE	VIRTA	AIKA (noin)
20 W	1500 V	100 mA	55 min

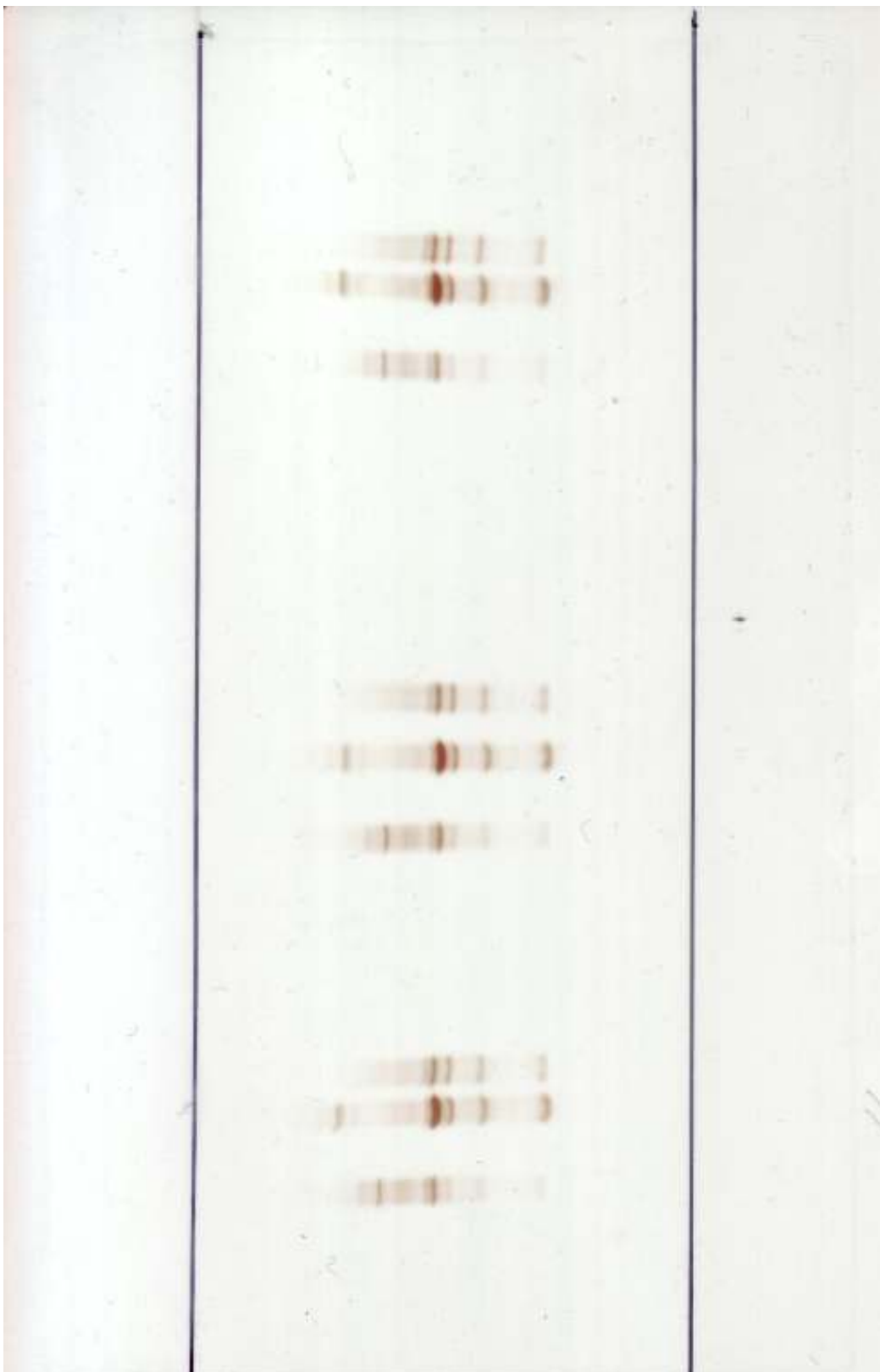
Taulukossa 1 esitetyt parametrit kirjattiin ylös sekä ajon alussa että lopussa. Noin 20 minuutin kohdalla ajo keskeytettiin hetkeksi templaattien poistoa, geelien kuivaamista ja elektrodien puhdistamista varten. Templaatit pestiin kiertolinjavedellä ja aseteltiin kuivumaan seuraavaa käyttöä varten. Tämän jälkeen ajoa jatkettiin kunnes kontrollit olivat muodostaneet ohuita nauhoja eli bandeja, niiden eteneminen oli lakannut ja ne olivat selkeästi erottuneet toisistaan. Ajoa jatkettiin kuitenkin enintään 15 minuuttia yli normaalin ohjelma-ajan, vaikka nauhat eivät olisikaan tässä kohtaa täysin fokusoituneet ja erottuneet toisistaan. Jos jompikumpi geeleistä ei toiminut odotetulla tavalla, ajettiin kolmas geeli. Jos molempien geelien ajo epäonnistui, valettiin kokonaan uudet geelit. IEF-laitteiston käyttäjätiedot kirjattiin työpisteestä löytyvään log book -kirjaan. Lopuksi ajopöydät puhdistettiin kiertolinjavedellä ja pyyhittiin kuivaksi.

6.3 Loppukäsittely ja tulosten lukeminen

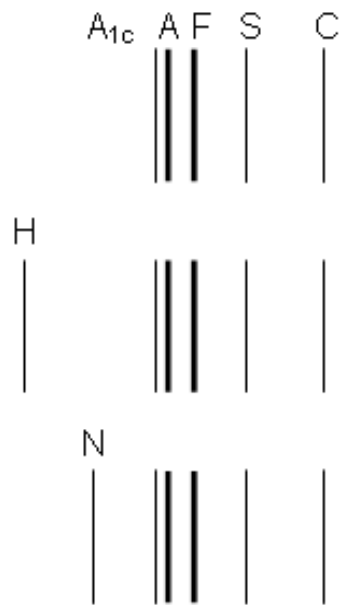
IEF-ajon jälkeen geelit poistettiin ajopöydiltä ja tehtiin saksilla pienet viillot anodi- ja katodiliuskojen sisäreunoihin, jonka jälkeen liuskat poistettiin geeleiltä. Geelien järjestysnumerot merkittiin saksilla geelien oikeaan alalaitaan. Jokainen geeli siirrettiin omaan puhtaaseen astiaan, joihin jokaiseen kaadettiin vetokaapissa 100 ml 10 %:sta trikloorietikkahappoa. TCA-liuos valmistettiin lisäämällä 500 g trikloorietikkahappoa kiertolinjaveden lopputilavuuteen 5000 ml ja sekoittamalla magneettisekoittajalla kunnes kaikki trikloorietikkahappo oli liuennut. Geelit siirrettiin astioineen tasosekoittajiin kymmeneksi minuutiksi, jonka jälkeen TCA-liuos hävitettiin asianmukaisesti. Trikloorietikkahapon tarkoituksena on kiinnittää bandit geeleihin. Geelit upotettiin seuraavaksi

runsaaseen kiertolinjaveteen ja annettiin olla tasosekoittajissa 60 minuuttia. Tämän jälkeen vesi vaihdettiin uuteen ja annettiin olla tasosekoittajissa vielä vähintään 60 minuuttia tai yön yli. Tasosekoittajien käyttäjätiedot kirjattiin työpisteestä löytyviin log book -kirjoihin. Huuhtelun jälkeen geelejä kuivattiin kuivauskaapissa +60 - +68 °C:ssa kunnes ne olivat täysin kuivuneet.

Kuivumisen jälkeen geeleiltä voitiin mitata tulokset. Ennen tulosten lukemista merkittiin tussilla anodi- ja katodiliuskojen reunoille tehtyjen viiltojen kohdalta yhdensuuntaiset tarkistusviivat. Näitä viivoja käytettiin apuna mitattaessa kalibroidulla työntömitalla bandien etäisyyksiä toisistaan ja katodilta. AFSC-kontrollista mitattiin Hb F:n etäisyys katodilta sekä Hb A_{1c}:n ja Hb C:n välinen etäisyys. Näistä laskettiin saman geelin mittaustulosten keskiarvot ja tämän jälkeen vielä kahden rinnakkaisen geelin mittaustulosten keskiarvot. HAFSC-kontrollista mitattiin Hb H:n etäisyys Hb F:ään ja NAFSC-kontrollista mitattiin Hb N:n etäisyys Hb F:ään. Näistä tuloksista laskettiin keskiarvot ja keskiarvoista laskettiin Hb H:n ja Hb N:n erotus. AFSC-kontrollin mittaustuloksille oli annettu tietyt rajat, joihin niiden piti osua. Kuvassa 9 on esimerkkinä geeli (testi 3, geeli 2), jolle on suoritettu isoelektrinen fokusointi, kiinnitys, pesu ja kuivaus ohjeiden mukaan. Kuviossa 1 on tarkemmin kontrollien erottuminen.



Kuva 9. Geeli, jolle on suoritettu isoelektrinen fokusointi, kiinnitys, pesu ja kuivaus ohjeiden mukaan.



Kuvio 1. Kontrollien erottuminen geelillä.

6.4 Sorbitolipitoisuus ja keittoaika

Karakterisointi aloitettiin sorbitolipitoisuuden sekä keittoajan testauksilla (testit 1 - 8). Sorbitolipitoisuuden testeissä geelit valmistettiin muuten ohjeen W270-424 mukaan, mutta glyserolin tilalle vaihdettiin ensin sorbitoli (10 % w/v) agarosinvalmistaja B:n ohjeistuksen mukaan. Seuraavaksi kokeiltiin karakterisointisuunnitelmasta poiketen sorbitolin (5 % w/v) ja glyserolin (3,5 % v/v) seosta. Tämän jälkeen valmistettiin geelit muuten normaalin ohjeen mukaan, mutta 3 minuutin kiehumisaika oli vaihdettu kiehautukseksi, sillä aikaisemmissa testeissä oli kokeiltu keittoajan pidentämistä, joka lisäsi paakkujen määrää. Vertailun vuoksi valmistettiin geelit myös ohjeen W270-424 mukaisesti. Testigeelien koostumukset sekä keittoajat on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Testigeelien koostumus ja keittoajat

Testi	Agaroosinvalmistaja		Glyseroli	Sorbitoli	Keittoaika
	A	B			
1.	100 %	0 %	10 %	0 %	norm.
2.	0 %	100 %	10 %	0 %	norm.
3.	100 %	0 %	0 %	10 %	norm.
4.	0 %	100 %	0 %	10 %	norm.
5.	100 %	0 %	3,5 %	5 %	norm.
6.	0 %	100 %	3,5 %	5 %	norm.
7.	100 %	0 %	10 %	0 %	kiehautus
8.	0 %	100 %	10 %	0 %	kiehautus

6.5 Agaroosien sekoittaminen

Agaroosien sekoittamisen testit 9 - 12 tehtiin käyttäen glyserolin tilalla sorbitolia (10 % w/v), sillä agaroosien sekoittamista oli jo aikaisemmin kokeiltu normaalin laadunvalvontaohjeen mukaisesti. Näistä parhaiten onnistunut testi toistettiin käyttäen tällä kertaa sorbitolin (10 % w/v) tilalla sorbitolin (5 % w/v) ja glyserolin (3,5 % v/v) seosta kuten ”sorbitolipitoisuus ja keittoaika” -testeissä. Tehtyjen testien geelien koostumukset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Testigeelien koostumus

Testi	Agaroosinvalmistaja		Glyseroli	Sorbitoli
	A	B		
9.	75 %	25 %	0 %	10 %
10.	50 %	50 %	0 %	10 %
11.	25 %	75 %	0 %	10 %
12.	75 %	25 %	3,5 %	5 %

6.6 Galaktomannaanin lisäys

Galaktomannaanin lisäys tehtiin käyttäen normaalisti glyserolia ohjeen W270-424 mukaan ja parhaimmille yhdistelmille myös vaihtamalla glyserolin tilalla sorbitoli (10 % w/v). Sorbitolin (5 % w/v) ja glyserolin (3,5 % v/v) seosta ei kuitenkaan enää kokeiltu, koska sillä ei havaittu olevan suurta vaikutusta geeleihin. Galaktomannaania lisättiin aina suhteessa agarosiin. Taulukossa 4 on esitetty suunniteltujen testigeelien koostumukset.

Taulukko 4. Suunnitellut testigeelien koostumukset

Testi	Agaroosinvalmistaja		Glyseroli	Sorbitoli	Galaktomannaani
	A	B			
13.	90 %	0 %	10 %	0 %	10 %
14.	0 %	90 %	10 %	0 %	10 %
15.	50 %	0 %	10 %	0 %	50 %
16.	0 %	50 %	10 %	0 %	50 %
17.	10 %	0 %	10 %	0 %	90 %
18.	0 %	10 %	10 %	0 %	90 %

6.7 Geelien arviointikriteerit testeissä

Geeleistä saatiin tuloksia sekä visuaalisesti tarkastelemalla että mittaamalla geeleille fokusoitujen bandien välisiä etäisyyksiä. Geelimassan valmistuksessa käytettiin seuraavia arvostelukriteerejä:

- Geelimassan paakkuuntuminen
- Geelimassan viskoosisuus

IEF-ajon aikana sekä lopullisia tuloksia visuaalisesti tarkasteltaessa käytettiin seuraavia arvostelukriteerejä:

- Veden kertyminen geelille IEF-ajon aikana
- Kipinöiminen
- Bandien erottuminen ja fokusoituminen
- Bandien kulkeutuminen

Kaikista ajetuista geeleistä mitattiin tulokset ohjeen W270-424 mukaan. Tämän lisäksi N- ja H- kontrollien mittaustulokset kirjattiin näitä varten erikseen tehtyyn taulukkoon. Testit tehtiin aikavälillä 25.01.10 - 15.03.10 ja kaikki tulokset tallennettiin tietokoneelle excel-tiedostoon.

6.8 Poikkeamat karakterisointisuunnitelmasta

Galaktomannaanin lisäystestejä (taulukko 3) tehdessä huomattiin että kokeiltaessa agaroosi/galaktomannaani -suhdetta 50/50 geelistä tuli kiehutettaessa erittäin viskoosista agaroosista (A/B) riippumatta ja sitä oli mahdoton valaa. Tämän vuoksi lisäystä kokeiltiin pienemmillä galaktomannaanin pitoisuuksilla (taulukon 5 testit 17-23) eikä 90 % galaktomannaanin lisäystestejä tehty ollenkaan. Toteutuneet testigeelien koostumukset ovat taulukossa 5.

Taulukko 5. Toteutuneet testigeelien koostumukset.

Testi	Agaroosinvalmistaja		Glyseroli	Sorbitoli	Galaktomannaani
	A	B			
13.	90 %	0 %	10 %	0 %	10 %
14.	0 %	90 %	10 %	0 %	10 %
15.	50 %	0 %	10 %	0 %	50 %
16.	0 %	50 %	10 %	0 %	50 %
17.	0 %	75 %	10 %	0 %	25 %
18.	0 %	85 %	10 %	0 %	15 %
19.	95 %	0 %	10 %	0 %	5 %
20.	0 %	90 %	0 %	10 %	10 %
21.	95 %	0 %	0 %	10 %	5 %
22.	100 %	0 %	0 %	10 %	0 %
23.	0 %	90 %	0 %	10 %	10 %

Lisäksi testeissä, joissa kokeiltiin glyserolin ja sorbitolin seosta (testit 5, 6, 12), glyserolia mitattiin 3,5 % v/v ja sorbitolia 5 % w/v karakterisointisuunnitelmasta poiketen.

7 Tulokset

Yleisesti testejä tarkasteltaessa huomattiin A:n agaroosista ja B:n agaroosista tehdyissä geeleissä toistuvia eroja.

B:n agaroosilla tehdyt geelit olivat helposti valettavissa, lukuun ottamatta galaktomannaanin lisäystestejä, eikä niissä esiintynyt juurikaan hyytymiä. Geelejä kuivattaessa ennen IEF-ajoa huomattiin kuitenkin aina, galaktomannaanin lisäystestejä lukuun ottamatta, että hyytymiä oli runsaasti. Geeleihin oli myös kaikissa testeissä, poislukien galaktomannaanitestit, kertynyt aina huomattava määrä vettä geelien pinnalle ennen IEF-ajoa sekä sen aikana. IEF-ajon edetessä geelit poimuuntuivat aina anodiliuskan reunaa pitkin. Bandit

olivat huonosti erottuneet ja fokusoituneet kaikissa muissa testeissä, paitsi parhaiten onnistuneissa galaktomannaanin lisäystesteissä 18, 20 ja 23.

A:n agarosilla tehdyt geelit olivat viskoosisempia kuin B:n agarosilla tehdyt geelit, mutta yleensä hyvin valettavissa, poislukien galaktomannaanitestit. Hyytymiä esiintyi valettaessa aina jonkin verran. Geelien päälle oli aina kertynyt jonkin verran vettä IEF-ajon aikana, mutta se ei vaikuttanut bandien kulkeutumiseen. Bandit olivat yleensä hyvin erottuneet ja fokusoituneet verrattaessa B:n agarosilla tehtyihin geeleihin. A:n agarosista tehdyillä geeleillä ei myöskään esiintynyt samanlaista poimuuntumista kuin B:n agarosista tehdyillä geeleillä.

7.1 Sorbitolipitoisuus ja keittoaika

Sorbitolin (10 % w/v) vaihtamisella glyserolin (10 % w/v) tilalle huomattiin olevan vaikutusta kontrollien käyttäytymiseen. Bandit olivat visuaalisesti tarkasteltuina paremmin fokusoituneet ja erottuneet, kuin ohjeen W270-424 mukaan valmistetuilla geeleillä. Sorbitolin (5 % w/v) ja glyserolin (3,5 % v/v) seoksella ei kuitenkaan havaittu olevan tällaista vaikutusta bandien ajautumiseen geeleillä.

Kiehauttamisen huomattiin vaikuttavan eri tavoin riippuen kumpaa agarosia käytettiin. Geeli, johon käytettiin A:n agarosia, oli valmistusvaiheessa normaalia viskoosimpaa ja sitä oli vaikea valaa. Hyytymiä oli myös paljon. Bandit olivat huonosti erottuneet ja fokusoituneet ja niitä oli vaikea tai mahdoton mitata. B:n agarosia käytettäessä kiehautettu geeli käyttäytyi samankaltaisesti verrattaessa ohjeen mukaan tehtyyn (keittoaika 3-5 min). IEF-ajojen mittaustulokset testeille 1-8 on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Yhteenveto sorbitolipitoisuus ja keittoaika -testien mittaustuloksista.

N/A = ei mittaustuloksia.

Testi		1	2	3	4	5	6	7	8
Agaroosin- valmistaja	A %	100	0	100	0	100	0	100	0
	B %	0	100	0	100	0	100	0	100
Glyseroli %		10	10	0	0	3,5	3,5	10	10
Sorbitoli %		0	0	10	10	5	5	0	0
Keittoaika		norm.	norm.	norm.	norm.	norm.	norm.	kieh.	kieh.
Hb F:n sijainti (35 ± 4 mm) 2 geelin keskiarvo		34	37	34	38	36	38	35	35
Hb A1C - Hb C (≥ 16mm) 2 geelin keskiarvo		17	17	16	17	17	18	17	17
Hb H - Hb N erotus (mm) 1 geeli		5	7	6	8	6	N/A	N/A	7

Taulukossa 6 esitetyt testigeelien mittaustulokset täyttävät kaikki normaalilaadunvalvonnan spesifikaatiot. Kahdessa testissä (testit 6 ja 7) Hb N:n ja Hb H:n välistä etäisyyttä ei pystytty mittaamaan, koska bandit olivat huonosti erottuneet. Mittaustulosten lisäksi geelejä tarkasteltiin visuaalisesti. Huomioon otettiin myös geelien valmistettavuus, mm. geelimassan viskoosisuus ja paakkujen muodostuminen. Visuaalisiin havaintoihin ja mittaustuloksiin perustuen testin 3 geelin raaka-ainekoostumuksella saatiin parhaat geelit. Kyseisissä geeleissä bandit olivat parhaiten erottuneet ja fokuoituneet ja geelimassaa oli helppo valaa. Toiseksi parhaat tulokset saatiin normaalin laadunvalvonnan ohjeen mukaisen koostumuksen omaavilla, testin 1 geeleillä, jonka tulokset olivat samankaltaisia testin 3 geelien kanssa, mutta bandit eivät olleet aivan yhtä hyvin erottuneet ja fokuoituneet. Nämä geelien koostumukset otettiin huomioon seuraavia testigeelien koostumuksia suunniteltaessa.

7.2 Agaroosien sekoittaminen

Agaroosien sekoittamistesteissä huomattiin, että bandit olivat paremmin fokusoituneita ja erottuneita, kun seoksessa oli enemmän A:n agaroosia. Tämä vaikutti kuitenkin hyytymien määrän kasvuun valamisvaiheessa. Mitä enemmän B:n agaroosia seoksessa käytettiin, sitä vähemmän hyytymiä esiintyi valun aikana, mutta geelejä kuivattaessa ennen IEF -ajoa niitä kuitenkin huomattiin olevan. Agaroosien sekoitussuhteista parhaiten onnistunut testi 9 tehtiin uudelleen (testi 12) käyttäen sorbitolin tilalla sorbitolin (5 % w/v) ja glyserolin (3,5 % v/v) seosta. Tällä ei kuitenkaan huomattu olevan vaikutusta geeliin. IEF-ajojen mittaustulokset testeille 9 - 12 on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Yhteenveto agaroosien sekoittaminen -testien mittaustuloksista.

Testi		9	10	11	12
Agaroosin-valmistaja	A %	75	50	25	75
	B %	25	50	75	25
Glyseroli %		0	0	0	3,5
Sorbitoli %		10	10	10	5
Hb F:n sijainti (35 ± 4 mm) 2 geelin keskiarvo		37	32	33	36
Hb A1C - Hb C (≥ 16mm) 2 geelin keskiarvo		17	17	17	17
Hb H - Hb N erotus (mm) 1 geeli		6	6	7	5

Taulukossa 7 esitetyt testigeelien mittaustulokset täyttävät kaikki normaalilaadunvalvonnan spesifikaatiot sekä Hb N:n ja Hb H:n bandit erottuivat hyvin. Mittaustulosten lisäksi geelejä tarkasteltiin visuaalisesti. Huomioon otettiin myös geelien valmistettavuus, mm. geelimassan viskoosisuus ja paakkujen muodostuminen. Visuaalisiin havaintoihin ja mittaustuloksiin perustuen testin 9 geelin raaka-ainekoostumuksella saatiin parhaat geelit.

Näissä geeleissä bandit erottuivat ja fokusoituivat hyvin, mutta eivät kuitenkaan niin hyvin kuin testin 3 geeleissä. Testin 9 geelimassan valaminen oli helppoa.

7.3 Galaktomannaanin lisäys

Galaktomannaanin (sidosaineena A:n agarosissa) lisäys osoittautui huonoksi vaihtoehdoksi A:n agarosille. Jo 10 % lisäys teki geelistä vaikeasti valettavaa ja normaalia kuivempaa. Myöskään bandit eivät erottuneet tai fokusoituneet hyvin. 5 % lisäys ei vaikuttanut valuun, mutta geelit olivat silti normaalia kuivempia ja tulokset huonoja. Kuivauspaperi tarttui kuivattaessa geelin pintaan ja mittaus oli vaikea suorittaa, sillä bandit olivat huonosti erottuneet ja fokusoituneet. B:n agarosilla tehdyissä testeissä huomattiin 10 % galaktomannaanin lisäyksen vaikuttavan positiivisesti geelien funktionaalisiin ominaisuuksiin. Geelimassa oli valun aikana hieman jähmeämpää kuin normaalisti, mutta silti hyvin valettavissa. Geelin koostumus ennen IEF-ajoa kuivauksen jälkeen oli myös paljon homogeenisempi kuin aiemmissa testeissä. Bandit olivat myös paremmin erottuneet ja fokusoituneet verrattaessa ohjeen mukaan ilman galaktomannaania tehtyihin geeleihin. Galaktomannaanitestistä parhaiten onnistuneet testit (Testit 14 ja 19) toistettiin vielä vaihtamalla sorbitoli glyserolin tilalle (testit 20 ja 21). Tällä ei huomattu olevan vaikutusta A:n agarosin kannalta mutta B:n agarosilla valettujen geelien bandit olivat hieman paremmin fokusoituneita.

Tulosten toistettavuuden varmentamiseksi koko työn parhaiten onnistunut A:n agarosilla ja parhaiten onnistunut B:n agarosilla tehty testi (testit 3 ja 20) toistettiin käyttäen agaroseja toisista eristä. Huomattiin että tulokset testeistä 22 ja 23 olivat toistettavia aikaisempiin testeihin 3 ja 20 nähden. Mittaustulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 8.

Taulukko 8. Yhteenveto galaktomannaanin lisäys -testien mittaustuloksista

N/A = ei mittaustuloksia

Testi		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Agaroosin- valmistaja	A %	90	0	50	0	0	0	95	0	95	100	0
	B %	0	90	0	50	75	85	0	90	0	0	90
Glyseroli %		10	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0
Sorbitoli %		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10
Galaktomannaani %		10	10	50	50	25	15	5	10	5	0	10
Hb F:n sijainti (35 ± 4 mm) 2 geelin keskiarvo		37	37	N/A	N/A	37	32	34	33	37	34	35
Hb A1C - Hb C (≥ 16mm) 2 geelin keskiarvo		17	17	N/A	N/A	17	17	16	18	17	17	17
Hb H - Hb N erotus (mm) 1 geeli		6	6	N/A	N/A	5	5	6	6	5	6	6

Taulukossa 8 esitetyt testigeelien mittaustulokset täyttävät kaikki normaalilaadunvalvonnan spesifikaatiot. Sekä Hb N:n ja Hb H:n bandit erottuivat hyvin. Kahdessa testissä (testit 15 ja 16) geelit eivät päässeet IEF-ajoon asti, sillä valu epäonnistui geelimassan liian suuren viskoosisuuden (50 % galaktomannaani) vuoksi. Mittaustulosten lisäksi geelejä tarkasteltiin visuaalisesti. Huomioon otettiin myös geelien valmistettavuus, mm. geelimassan viskoosisuus ja paakkujen muodostuminen. Visuaalisiin havaintoihin ja mittaustuloksiin perustuen testin 21 geelin raaka-ainekoostumuksella saatiin galaktomannaanitestien parhaat geelit. Näissä geeleissä bandit olivat melko hyvin erottuneet ja fokuoituneet. Valettavuus oli hieman huonompi kuin aikaisempien testien parhailla geeleillä. Toiseksi parhaat tulokset saatiin toistettavasti testien 20 ja 23 geeleillä. Näissä testeissä bandit olivat hyvin erottuneet ja fokuoituneet, kun niitä verrattiin aikaisempiin testeihin, joissa käytettiin B:n agaroosia ilman galaktomannaanin lisäystä. Nämä tulokset eivät silti olleet yhtä hyviä, kuin ne parhaiten onnistuneet testit, joissa käytettiin A:n agaroosia.

7.4 Riskianalyysi

Testeissä pyrittiin käyttämään koko ajan samoja reagenssieriä erien välisen vaihtelun minimoimiseksi. IEF-laitteiston (7. motti) toimimattomuus on saattanut vaikuttaa tuloksiin yhdessä testissä (testi 8). Suurin riski testien luotettavuudessa on kuitenkin työn tekijän kokemattomuus, sekä geelien valu manuaalisesti. Tämä pyrittiin minimoimaan kunnollisella perehdytyksellä sekä harjoittelulla ennen varsinaisten testien aloittamista. Tulosten luotettavuuteen vaikuttaa myös se, että testejä ei toistettu, lukuun ottamatta kahta parhaiten onnistunutta.

8 Päätelmät

Näiden testien tarkoituksena oli karakterisoida vaihtoehtoisen raaka-ainekoostumuksen toimivuutta IEF-ajoon tarkoitetuissa geeleissä. Testejä tehtiin yhteensä 23 ja tuloksia tarkasteltiin sekä visuaalisesti, että mittaamalla bandien etäisyyksiä kalibroidulla työntömitalla. Vertailukohtana käytettiin aina laadunvalvontaohjeen W270-424 mukaan valmistettuja geelejä.

Tuloksia tarkasteltaessa löydettiin yksi potentiaalinen raaka-ainekoostumus (testi 3), joka saattaisi toimia tuotannossa nykyistä paremmin. Kyseisissä geeleissä IEF-ajossa muodostuneet hemoglobiinibandit olivat kulkeutuneet oikeille kohdilleen, ja ne olivat visuaalisesti tarkasteltuina fokuoituneet ja erottuneet toisistaan hieman paremmin kuin nykyisen reseptin mukaan valmistettavissa geeleissä. Ainoana erona tuotannossa käytettävään reseptiin oli sorbitolin vaihto glyserolin tilalle, joten sorbitolin voidaan olettaa olevan vastuussa geelin muuttuneista ominaisuuksista.

B:n agaroosista valmistettuja geelejä ei pidetty potentiaalisina vaihtoehtoina, sillä parhaitenkin onnistunut testi (testi 20) oli kuitenkin huonompi kuin tuotannossa käytettävä nykyinen raaka-ainekoostumus (testi 1). Huomionarvoista kuitenkin on, että valmistettaessa geelejä B:n agaroosista ja

galaktomannaanista, tulokset olivat parempia kuin pelkästään B:n agaroosista valmistetut geelit.

A:n agaroosin käyttö yhdessä galaktomannaanin kanssa geelien valmistukseen ei tuottanut haluttuja tuloksia, sillä agaroosiin oli valmistajan mukaan jo valmiiksi lisätty galaktomannaania. Myöskään geelimassan keittoajan muuttaminen tai agaroosien sekoittaminen eivät parantaneet geelien funktionaalisia ominaisuuksia. Vaikka suurin osa testeistä ei tuottanut haluttuja tuloksia, ne rajasivat ulkopuolelle monta agaroosigeelin reseptiä, jotka eivät sovellu IEF-laatuisten geelien valmistamiseen.

Kaikki testit tehtiin laboratoriomittakaavassa. Kaksi parhaiten onnistunutta testiä, sekä A:n että B:n agaroosin osalta, tehtiin uudestaan ja niistä saatiin toistettavia tuloksia. Ennen uuden reseptin tuotantoon siirtämistä vaadittaisiin tuotantomittakaavan testejä, joilla varmistettaisiin kyseisen raaka-ainekoostumuksen toimivuus tuotantomittakaavassa ja IEF-applikaatiossa.

9 LÄHTEET

- 1 Santos, G. A. 1990. A Manual for the Processing of Agar from Gracilaria. Viitattu 01.03.2010
<http://www.fao.org/docrep/field/009/ag156e/AG156E00.htm>.
- 2 McHugh, D. J.; Armisen, R. & Galatas, F. 1987. Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds. Viitattu 01.03.2010
<http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e00.htm#Contents>.
- 3 Suzuki, H.; Sawai, Y. & Takada, M. 2000. The Effect of Apparent Molecular Weight and Components of Agar on Gel Formation. Japan: Food Processing technology Center, Gifu Prefectural Research Institute of Industrial Product Technology.
- 4 Medin, A. S. 1995. Studies on Structure and Properties of Agarose. s. 8, 20-21. Ruotsi: Uppsala, Acta Universitatis Upsaliensis.
- 5 Glycerol. Wikipedia. Viitattu 14.04.2010 <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol>.
- 6 Sorbitol. Wikipedia. Viitattu 14.04.2010 <http://en.wikipedia.org/wiki/Sorbitol>.
- 7 Srivastava, M.; Kapoor, V. P. 2005. Seed Galactomannans: An Overview. India: Lucknow-226001, National Botanical Research Institute, Pharmacognosy, Ethnopharmacology and Phytochemistry Divisions.
- 8 Westermeier, R. et al. 2001. Electrophoresis in Practice. s 1-5, 45-58, 163-170. Saksa: WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim (Federal Republic of Germany).
- 9 Speight, J. G. 2001. Chemical Process and Design Handbook. s. 315. Viitattu 15.04.2010
<http://site.ebrary.com.ezproxy.turkuamk.fi/lib/turkuamk/docDetail.action?docID=10180083&p00=glycerol>.
- 10 Glycerol. World of Chemistry Summary. Viitattu 15.04.2010
<http://www.bookrags.com/research/glycerol-woc/>.
- 11 Lowe, B. 1937. Experimental Cookery From The Chemical And Physical Standpoint. Viitattu 15.04.2010
<http://chestofbooks.com/food/science/Experimental-Cookery/images/glycerol.jpg>.
- 12 T. P. Coultate. 2002. FOOD The Chemistry of Its Components. s. 17-18. UK: London, South Bank University.
- 13 D-Sorbitol. Great Vista Chemicals. Viitattu 19.04.2010
<http://www.greatvistachemicals.com/proteins-sugars-nucleotides/d-sorbitol.html>.

- 14 Faculteit Farmacie. Universiteit Utrecht. Viitattu 19.04.2010
<http://www.pharm.uu.nl/vak/pdocanal/ondmat/titratie/sorbitol.gif>.
- 15 Fennema, O. R. et al. 1996. Food Chemistry. s. 207-208. USA: New York, 270 Madison Avenue, Marcel Dekker, Inc.
- 16 Hocking, D. R. 1997. The Separation and Identification of Hemoglobin Variants by Isoelectric Focusing Electrophoresis: An Interpretive Guide. s. 10, 15-18. PerkinElmer Life Sciences Inc. Akron OH, USA.
- 17 Huntsman, R.G. 1993. Sickie-Cell Anemia and Thalassemia, A Primer for Health Care Professionals. s. 3-4. The Canadian Sickie Cell Society, Isolab Inc. USA.



HUMAN HEALTH | ENVIRONMENTAL HEALTH

PerkinElmer Human Health
Wallac Oy
P.O. Box 10
FI-20101 Turku, Finland

Phone +358 - (0)2 - 267 8111
Fax +358 - (0)2 - 267 8357
www.perkinelmer.com

Tämä suunnitelma selventää geelien testaamisen karakterisoinnin kulkua yleisellä tasolla. Tarkoituksena on löytää geeli, joka toimisi tuotannossa nykyistä paremmin. Geelien testaamisen käytetään agarosin vastaanottotarkastuksen ohjetta W270-424.

-Aloitetaan vaihtamalla sorbitoli 10 % w/v glyserolin tilalle sekä kokeillaan seosta pitoisuuksilla 5 % v/v glyserolia ja 3,5 % w/v sorbitolia

Keittoajan vaikutus geeleihin (kiehaus, 1 min)

-A:n ja B:n agarosien keskenään sekoittamista eri suhteissa (B 25% A 75%, B 50% A 50% ja B 75% A 25%) kun käytetään sorbitolin tilalla glyserolia tai glyserolin ja sorbitolin seosta kuten aiemmin

-Galaktomannaanin lisäystä geeleihin eri pitoisuuksilla (mahd. 90%, 50%, 10%), tuloksista riippuen myös sorbitolin kanssa

- Kaikki testit tehdään käyttäen sekä A:n, että B:n agarosia

-Riippuen geelien onnistumisesta, voidaan niille tehdä isoelektrinen fokusointi

-Geelien onnistumista arvioidaan ainakin seuraavilla kriteereillä:

-Geelin valmistuksessa:

- Geelien paakkuuntuminen
- Geelin jähmeys/juoksevuus

-IEF-ajon aikana

- Veden kertyminen
- Kipinöiminen
- Bandien erottuminen (erityisesti N- ja H-kontrollien suhde F-bandiin)
- Bandien fokusoituminen
- Bandien kulkeutuminen oikeille paikoilleen riittävän nopeasti

-IEF-ajossa toiseen geeliin pipetoidaan ohjeesta poiketen myös N- ja H-kontrollit

-Saaduista tuloksista laaditaan karakterisointiraportti

vko	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
sorbitolipitoisuus, keittoaika											
agarosien sekoittaminen											
galaktomannaanin lisäys											

Kontrolli	Templaattikaivo nro
AFSC	1
HAFSC	2
	3
NAFSC	4
	5
	6
	7
	8
	9
	10
	11
	12
AFSC	13
HAFSC	14
NAFSC	15
	16
	17
	18
	19
	20
	21
	22
	23
AFSC	24
HAFSC	25
	26
NAFSC	27

Kontrolli	Templaattikaivo nro
AFSC	1
	2
	3
	4
	5
	6
	7
	8
	9
	10
	11
	12
	13
AFSC	14
	15
	16
	17
	18
	19
	20
	21
	22
	23
	24
	25
	26
AFSC	27

Karakterisoinnissa käytettiin seuraavia reagensseja:

Amfolyytit	(lot. 483706, 486887)
Glyseroli	(lot. T59422)
D-sorbitoli	(lot. T58123)
Locust bean gum	(batch: 098K0123/RD14280)
A:n agaroosit	(lot. T66222, T66685)
B:n agaroosit	(lot. 10034509, 10025691)
GelBond -kalvo	(lot. T59586)
Suojakalvo	(lot. T55838)
Hb AFSC -kontrolli	(lot. T45062, T61811)
Hbg HAFSC -kontrolli	(lot. 1-68-24)
Hbg NAFSC -kontrolli	(lot. 1-68-22)
Anode Solution	(lot. 528520, 578166, 571820)
Cathode Solution	(lot. 547683, 582324)
Hb Elution Solution	(lot. 554025)
10 % TCA	
Kiertolinjavesi	

Karakterisoinnissa käytettiin seuraavia laitteita:

Vaaka	(VKA90)
Magneettisekoittajat	(MSE137, MSE145)
Lämpölevy	(LLE11)
Pipetit	(FINNPIPETTE® F2, 10) (Finnpipette®, 6) (Eppendorf, Multipipette® pro, 8, HKI)
IEF-virtalähteet	(9A050006-2-A, VLÄ35, VLÄ36, VLÄ42, VLÄ43, VLÄ44 VLÄ46, VLÄ47)
IEF-ajopöydät	(4. leenu, 5. liinu, 6. tiinu, 1. tupu, 2. hupu, 3. lupu, 7. mortti, 8. vertti)
IEF-jäähdyttimet	(VHA20, VHA23, VHA28, Polyscience 910, CARON 2050)
Tasoravistelijat	(RAV334, RAV335)
Lämpökaapit	(GKU1, GKU3)
Työntömitta	(MS 61003721)

Testi	Agaroosi (%)		Glyseroli (%)	Sorbitoli (%)	Keitto aika (min)	Galaktomanneani (%)	Hb F:n sijainti (35 ± 4 mm) 2 geelin keskiarvo	Hb A _{1c} – Hb C (≥ 16 mm) 2 geelin keskiarvo	Hb H – Hb N erotus (mm) 1 geeli
	A	B							
1	100	0	10	0	3-5	-	34	17	5
2	0	100	10	0	3-5	-	37	17	7
3	100	0	0	10	3-5	-	34	16	6
4	0	100	0	10	3-5	-	38	17	8
5	100	0	3,5	5	3-5	-	36	17	6
6	0	100	3,5	5	3-5	-	38	18	N/A
7	100	0	10	0	kiehautus	-	35	17	N/A
8	0	100	10	0	kiehautus	-	35	17	7
9	75	25	0	10	-	-	37	17	6
10	50	50	0	10	-	-	32	17	6
11	25	75	0	10	-	-	33	17	7
12	75	25	3,5	5	-	-	36	17	5
13	90	0	10	0	-	10	37	17	6
14	0	90	10	0	-	10	37	17	6
15	50	0	10	0	-	50	N/A	N/A	N/A
16	0	50	10	0	-	50	N/A	N/A	N/A
17	0	75	10	0	-	25	37	17	5
18	0	85	10	0	-	15	32	17	5
19	95	0	10	0	-	5	34	16	6
20	0	90	0	10	-	10	33	18	6
21	95	0	0	10	-	5	37	17	5
22	100	0	0	10	-	0	34	17	6
23	0	90	0	10	-	10	35	17	6