



Henri Hakala

ENDOTOKSIINISTEN SINILEVÄKANTOJEN TUTKIMINEN RA- MANSIRONNAN AVULLA

ENDOTOKSIINISTEN SINILEVÄKANTOJEN TUTKIMINEN RA- MANSIRONNAN AVULLA

Henri Hakala
Opinnäytetyö
Kevät 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian sv.

Tekijä(t): Henri Hakala

Opinnäytetyön nimi: Endotoksiinisten sinileväkantojen tutkiminen Ramansironnan avulla.

Työn ohjaaja(t): Mari Tenhunen ja Matti Nieminen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: 06/2013 Sivumäärä: 43 + 2 liitettä

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin kahden eri Raman tekniikan mahdollisuuksia mikrobien tunnistuksessa. Työn tarkoituksena oli tutkia, onko kahden saman syanobakteerilajin eri kannan tunnistaminen toisistaan mahdollista. Välitavoitteena oli myös kyetä tunnistamaan toisen kannan tuottaman endotoksiini MC-LR:n tunnistaminen suoraan solusta.

Työ aloitettiin tutkimalla eri tutkimusryhmien saamia tuloksia mikrobiologian alalla eri Raman tekniikoilla, minkä jälkeen alettiin pohtia omaa lähestymistapaa käsillä olevaa työtä kohtaan. Lisäksi tilattiin yhden valmistajan SERS-substraatteja, joita työssä tullaan käyttämään.

Työssä on tutkittu sekä ehjistä että hajotetuista soluista saatuja spektrejä, joiden avulla on pohdittu menetelmän mahdollisuutta erottaa eri kannat toisistaan. Työssä tultiin lopputulokseen, että lajien tunnistaminen toisistaan on mahdollista tietyissä rajoissa, mutta menetelmän vieminen laboratorioon vaatii vielä paljon tutkimista ja menetelmänkehitystä.

Asiasanat: SERS, Ramanspektroskopia, Raman mikroskooppi, Syanobakteeri, MC-LR, Kestävä kehitys

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 SYANOBAKTEERIT	9
2.1 Syanobakteerien rakenne	9
2.2 Erikoisominaisuudet	10
2.3 Syanobakteerien toksiiinit	11
2.3.1 Hepatoksiinit	11
2.3.2 Neurotoksiinit	12
2.4 Esiintyminen luonnossa ja infektiot	13
2.5 Syanobakteerien tutkiminen	15
3 RAMAN SPEKTROSKOPIA	16
3.1 Raman spektrometrin rakenne	17
3.2 Raman spektrometrian ongelma, fluoresenssi	18
3.3 SERS	19
3.3.1 SERS-substraateille asetetut vaatimukset	20
3.3.2 SERS-substraattien puhdistaminen	20
3.4 Mikrobiologisten näytteiden mittaaminen Ramansironnan avulla	21
3.5 Mikrokystiinen ja nodulariinin tunnistaminen Ramansironnan avulla	22
4 TYÖN ESIVALMISTELUT	24
4.1 Bayspec Nomadic™ Research-Grade Raman Microscope	24
4.2 Renishaw Inc. Klarite® SERS substrates	25
4.3 Syanobakteerit	25
4.4 MC-LR	26
4.5 Mittaussuunnitelma	26
5 NÄYTTEIDEN TUTKIMINEN RAMAN-SIRONNAN AVULLA	27
5.1 Perinteinen Raman menetelmä	27
5.1.1 MC-LR-toksiiniin karakterisointi	28

5.1.2 Mikrokytiinikannan 269 tutkiminen	29
5.1.3 Mikrokytiinikannan 205 tutkiminen	30
5.1.4 Hajotettujen mikrokytiinikantojen tutkiminen	32
5.2 SERS-mittaukset	34
5.2.1 MC-LR:n tutkiminen SERS:llä	36
5.2.2 Mikrokytiinikantojen 205 ja 269 tutkiminen SERS:llä	36
6 YHTEENVETO	39
LÄHTEET	41
LIITTEET	
Liite 1. MC-LR:n datasivu	
Liite 2. Työssä käytetyt laitteet	

SANASTO

Autotrofia	omavaraisuus, eliö kykenee tuottamaan tarvitsemansa energian foto- tai kemosynteesin kautta
Heterotrofia	toisenvaraisuus, eliö tarvitsee energiaa ympäristöstä
Endosytoosi	aktiivinen aineen kuljetus (solukalvorakkuloissa) solun sisälle
Endotoksiini	toksiini, joka tuottuu solun sisälle ja vapautuu solun hajotessa
Eksotoksiini	toksiini, jonka solu erittää ulkopuolelleen
LD ₅₀ -arvo	myrkyllisyyden yksikkö eli annos, joka tappaa puolet koe-eläimistä kokeen aikana (Lethal Dose 50 %)
CCD-detektori	(Charge-Coupled Device)
PDA-detektori	diodirividetektori (PhotoDiode Arrays)
Supernatantti	kasvatusliuos, joka erottuu kiinteästä massasta sentrifugoinnin yhteydessä

1 JOHDANTO

Syanobakteerit ovat evoluution kannalta olleet ratkaisevassa asemassa tuottamassa maapallolle happi-ilmakehää, joka on mahdollistanut kehittyneempien elämänmuotojen synnyn. Syanobakteereilla on ollut valtava merkitys myös niin kasvi- kuin eläinkunnan kehityksessä.

Syanobakteerit ovat morfologisesti monimuotoinen ryhmä, joiden ulkomuodon perusteella ei pystytä erottelamaan myrkyllisiä ja myrkyttömiä kantoja toisistaan. Yleisimmät syanobakteerien tuottamat myrkyt ovat joko hepa- tai neurotoksiineja, joista hepatoksiineja tavataan useammin. Hepatoksiinit ovat syklisiä peptidejä, joiden toksisuus on riippuvainen niiden aminohappokoostumuksesta.

Yhteinen piirre kaikille syanobakteeritoksiineille on adda-aminohappo, joka on liittynyt peptidin viidenneksi aminohapoksi. Adda-aminohaposta Toksiini kiinnittyy inhiboimaan fosfataasireaktiota kohdesolussa. Toksiinista tunnetaan yli 80 erilaista varianttia, joiden erot johtuvat peptidiketjuun liittyneistä aminohapoista. Eri toksiinien myrkyllisyys vaihtelee variantista riippuen. Vaarallisin näistä toksiineista on MC-LR, johon tässä työssä perehdytään.

Normaalisti syanobakteeritoksiineja tunnistetaan mikrobiologisin keinoin, mikä vaatii koulutetun mikrobiologin osaamista. Menetelmät ovat hankalasti toteutettavissa kenttäolosuhteissa, mikä lisää analyysin kustannuksia, kun näytteitä tarvitsee kuljetella. Useasti menetelmän herkkyys ei riitä tunnistamaan eri variantteja toisistaan, vaan näillä saadaan määritettyä vain kokonaistoksisuus.

Uusia pikamenetelmiä biomolekyylien tunnistamiseen kehitetään jatkuvasti, ja Ramanspektrometria on SERS:n kehittymisen myötä tulossa yhä käytännöllisemmäksi sormenjälkitunnistuksessa. Perinteisen Ramanin ongelmana bionäytteitä tutkittaessa on ollut näytteiden korkea taipumus emittoida fluoresenssia. Fluoresenssi peittää alleen Ramansignaalin, joka on paljon heikompaa verrattuna fluoresenssiin.

SERS on mahdollistanut tehokkaamman bionäytteiden tutkimisen. Menetelmällä pystytään vahventamaan näytteestä saatavaa signaalia jopa 1×10^6 -kertaisesti, jolloin analysoitaessa fluoresoivia näytteitä, voidaan käyttää alhaisempaa laserin tehoa, joka vähentää fluoresenssin määrää. Ehdoton etu on myös näytteenkäsittely, sillä parhaimmassa tapauksessa näytteet eivät vaadi minkäänlaista esikäsittelyä, vaan ne voidaan mitata sellaisenaan.

Ongelmana SERS-mittauksissa on useimmiten toistettavan spektrin saaminen näytteestä, minkä epäillään johtuvan käytettävien substraattien epätasaisuudesta ja näytteen vaihtelevasta sitoutumisesta substraatin nanopartikkeleiden kanssa.

Opinnäytetyössä tehtiin kvalitatiivista menetelmänkehitystä, jonka tavoitteena on tunnistaa toksiinia tuottava syanobakteerikanta tuottamattomasta kannasta. Työ tehtiin VTT:n Oulun tutkimuskeskukselle kevään 2013 aikana.

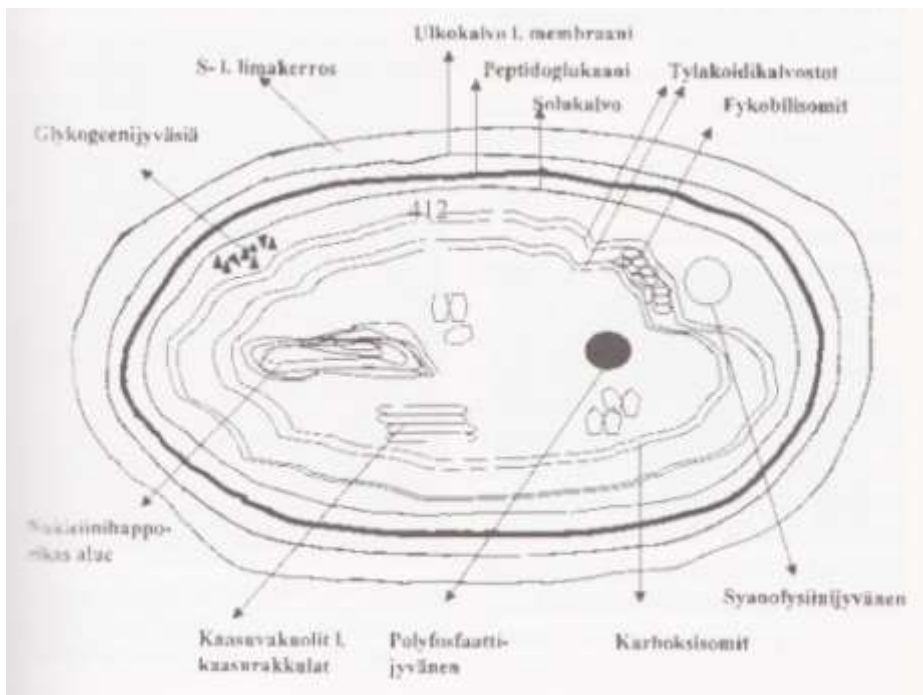
2 SYANOBAKTEERIT

Syanobakteerit ovat autotrofisia bakteereita, joiden tärkein erikoisominaisuus on kyky fotosynteesiin. Ne kuuluvat fotosynteettisten bakteerien ryhmään Phylum BX. (Sivonen 2002, 412.)

Syanobakteereilla on ollut suuri merkitys evoluutiossa, sillä ne ovat tuottaneet maapallolle happi-ilmakehän, joka on mahdollistanut hapesta riippuvien elämänmuotojen synnyn. Lisäksi kasvi- ja eläinkunnan evoluutioissa syanobakteereilla on ollut välttämätön rooli, sillä viherhiukkaset ja mitokondriot ovat syntyneet syanobakteereista endosytoosin seurauksena. (Sivonen 2002, 412.)

2.1 Syanobakteerien rakenne

Pitkän kehityksen vuoksi eri syanobakteerit eroavat nykyään morfologisesti hyvin paljon toisistaan. Niitä löytyy aina pienistä yksisoluisista bakteereista suuriin solurykelmiä muodostaviin pesäkkeisiin. Kuvassa 1 on esitetty syanobakteerin solurakenne yksinkertaistettuna kuvana. (Sivonen 2002, 413.)



KUVA 1. Syanobakteerin solurakenne yksinkertaistettuna (Sivonen 2002, 413)

Uloimpana kerroksena syanobakteereilla on tyypillisesti joko s- tai limakerros, joka suojaa varsinkin vedessä eläviä bakteereita niille haitallisilta aineilta. Solukalvon ja uloimman kerroksen välissä on lisäksi peptidoglykaanista koostuva soluseinä ja ulkokalvo, jonka ansiosta syanobakteerin soluseinä muistuttaakin gram-negatiivisen bakteerin soluseinää (Sivonen 2002, 413–414). Kuvassa 2 nähdään työssä tutkitun mikrokystiinikannan 269 kuva.



KUVA 2. Mikrokystiinikanta 269

Vesissä elävillä syanobakteereilla on kaasuvakuoleja, joiden avulla ne pystyvät siirtymään optimaaliseen vesikerrokseen valon ja ravinteiden kannalta. Lisäksi niillä on glukoosi-, polyfosfaati- ja syanofysiiniyväsiä, joiden avulla ne säilyvät hengissä niukkaravinteisissa oloissa. (Sivonen 2002, 416.)

2.2 Erikoisominaisuudet

Syanobakteerit ovat ainoita esitumallisia eliöitä, jotka kykenevät fotosynteesiin. Fotosynteesi on niiden tärkein erikoisominaisuus, sillä sen kautta solut saavat tarvitsemansa energian ja pystyvät tyydyttämään hiilen tarpeensa. Suurin osa syanobakteereista on ehdottoman autotrofisia, mutta on tavattu myös kantoja, jotka pystyvät elämään heterotrofisesti syvällä maaperässä tai luolastoissa. (Sivonen 2002, 414.)

Toisin kuin kasveilla, syanobakteereilla fotosynteesi tapahtuu tylakoidikalvostolla solulimassa, jossa sijaitsevat fotosynteesikeskukset PS I ja PS II. Koska bakteereilla ei ole Krebsin sykliä, tapahtuu hiilidioksidin pelkistys karboksisomeilla pentoosifosfaattisyklin kautta. (Sivonen 2002, 414.)

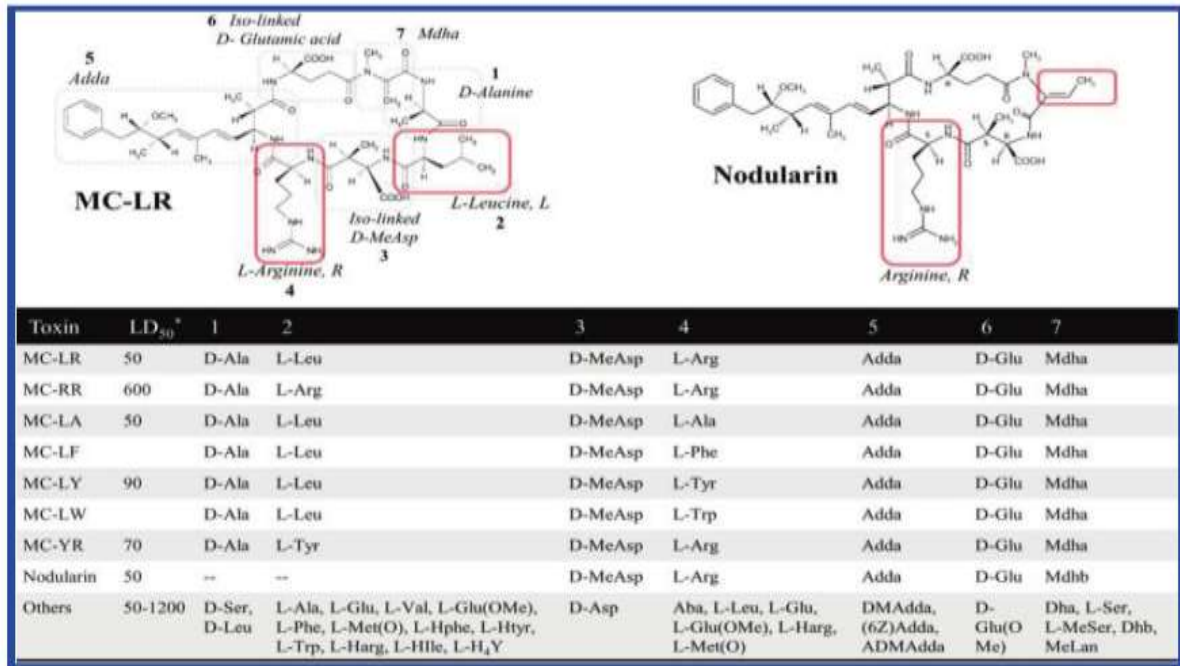
2.3 Syanobakteerien toksiiinit

Useimmat syanobakteerit tuottavat joko endo- tai eksotoksiineja. Bakteerien ulkomuodosta kuitenkin ei pysty päättelemään, mikä kanta tuottaa toksiiineja ja mikä ei. Jopa saman lajin eri kantojen välillä on vaihtelua toksiiinin tuotossa. Yleisimmät toksiiinit, joita syanobakteerit tuottavat, ovat maksamyrkylliset hepatoksiinit ja hermomyrkylliset neurotoksiinit. (Sivonen 2002, 417–418.)

Karkean määrittelyn toksiiinien esiintymiselle eri vesistöissä voi tehdä määrittämällä vesistön kokonaistypen ja -fosforin ($N_{tot}:P_{tot}$) suhteen. Hepatoksiinisten kantojen esiintyminen keskittyy vesistöihin, joissa $N_{tot}:P_{tot}$ on alle 17 (tyypirajoitteisia), kun taas neurotoksiiniset kannat esiintyvät useammin vesistöissä, joissa tyyppiä on ylimäärin ($N_{tot}:P_{tot}$ yli 17). (Rapala 2006, 18.)

2.3.1 Hepatoksiinit

Yleisimpiä syanobakteerien toksiiineja ovat maksaa vaurioittavat hepatoksiinit, jotka ovat joko mikrokystiinejä (MC-toksiinit) tai nodulaareja. Nämä toksiiinit ovat rakentuneet rengasmaisesta seitsemän aminohapon ketjusta. Mikrokystiineistä tunnetaan jo yli 80 erilaista variaatiota, joiden ero johtuu eri aminohapoista niiden rakenteessa. Kuvassa 3 on esitetty eri mikrokystiinien rakenteet. (Halvorson - Leng – Vikesland 2011, 9273.)



KUVA 3. Mikrokystiinien ja nodulaarin rakenteet (Halvorson ym. 2011, 9274)

Yhteinen piirre kaikille mikrokystiineille on adda-aminohappo, joka on liittynyt aminohappoketjuun aina viidenneksi aminohapoksi (Halvorson ym. 2011, 9273). Mikrokystiinit pystyvät tunkeutumaan maksasolujen sisään käyttäen sappihappojen kuljetukseen tarkoitettua järjestelmää (Sivonen 2002, 419). Adda-aminohappo on välttämätön mikrokystiinin toksisuudelle, sillä juuri tästä kohdasta mikrokystiini kiinnittyy inhiboimaan fosfataasia. Yleisin mikrokystiini luonnossa on MC-LR, jolle World Health Organization (WHO) on asettanut juomaveden pitoisuusrajaksi 1 µg/l (Halvorson ym. 2011, 9273). Nodulariinit eroavat rakenteeltaan mikrokystiineistä siten, että niiden rengasmaisessa rakenteessa on vain viisi aminohappoa (Sivonen 2002, 419).

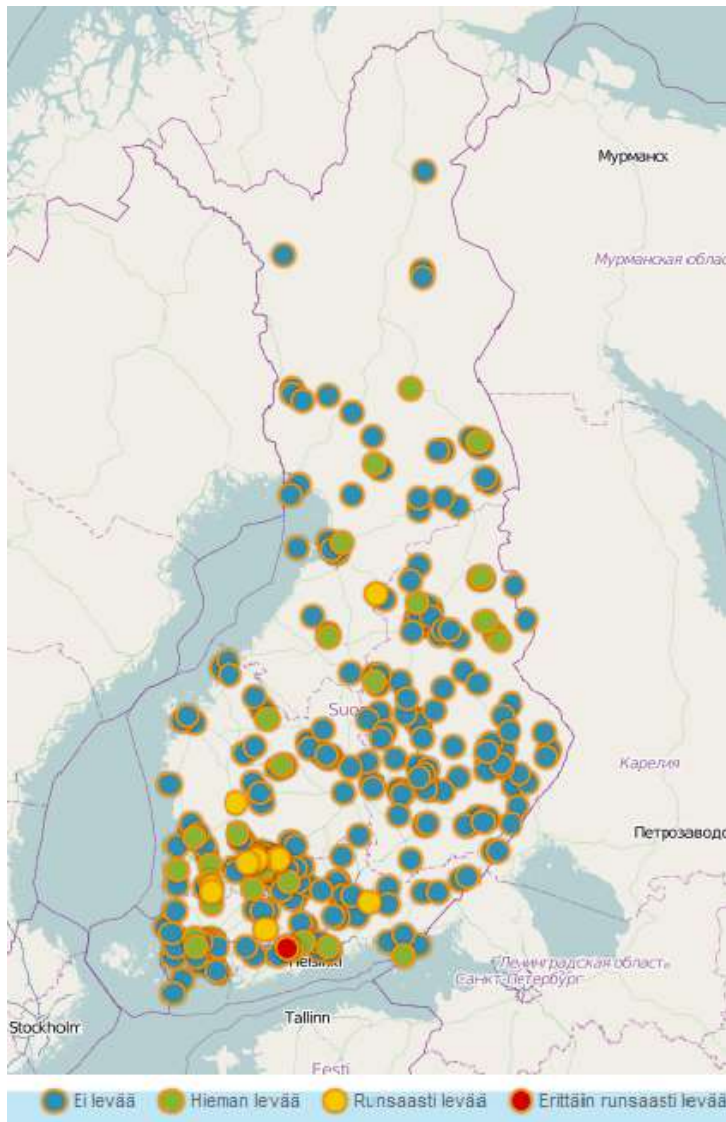
2.3.2 Neurotoksiinit

Vaarallisempia, mutta harvinaisempia syanobakteerien tuottamista toksineista ovat neurotoksiinit eli hermomyrkyt. Ne aiheuttavat jo pieninä annostuksina hengenvaarallisen tilan lamaannuttamalla hengityksen. Tyypillinen LD₅₀-arvo hermomyrkyille on 0,2–0,3 mg painokiloa kohti, eli 70 kiloa painavalle henkilölle tappava annos toksiniä on 14–21 mg. (Sivonen 2002, 419.)

Eri neurotoksiineilla on erilaiset rakenteet ja vaikutukset kehossa. Syanobakteerien tuottamia neurotoksiineja tunnetaan kolmea eri tyyppiä, joista anatoksiini-a on yleisin. Anatoksiini-a estää hermoimpulssin kulun sitoutumalla asetyylikoliinireseptoreihin palautumattomasti, jolloin itse välittäjäaine (asetyylikoliini) ei pääse siirtämään impulssia eteenpäin. Muita neurotoksiineja ovat anatoksiini-a(S) ja saksitoksiinit, jotka myös estävät vaikutusmekanismeillaan hermoimpulssin kulun. (Sivonen 2002, 419.)

2.4 Esiintyminen luonnossa ja infektiot

Tyypillinen järvi, jossa sinileväkukinnot ovat jokakesäinen haitta, on matala, rehevä ja yleensä pieni. Sinileväjärvien rehevyyttä lisää usein vielä se, että maatalous on keskittynyt reheville alueille, missä on helposti vettä saatavissa. Tällöin osa maataloudessa käytettävistä lannoitteista valuu läheisiin järviin, mikä lisää järvien rehevyyttä. Kaikesta huolimatta sinileväkukinnot ovat hankalasti ennustettavissa etenkin Suomessa, sillä kukintojen alkaminen ja runsaus on riippuvainen monesta tekijästä kuten säästä, ravinteista ja muista eliöistä. Kuvassa 4 nähdään kesän 2012 viikon 33 levähavainnot Suomessa. (Pietiläinen 2006, 4.)



KUVA 4. Levätilanne Suomessa viikolla 33 vuonna 2012 (JärviWiki. 2013)

Tyypillisin tapa Suomessa altistua syanobakteerien toksineille on luonnonvesien kautta. Tällä ymmärretään vedessä uiminen, sillä peseytyminen ja sen juominen tai pääsy tahattomasti ruoansulatuskanavaan. Toksiineja pääsee luontoon erityisesti silloin, kun levämassat hajoavat nopeasti esimerkiksi UV-valon vaikutuksesta. (Hoppu - Lahti - Salmela 2001, 2891–2895.)

Suomen ympäristökeskus on tehnyt kattavan tutkimuksen kesien 2004 ja 2005 altistumisista syanobakteerien toksineille ja niistä aiheutuneista oireista. Tutkimuksen mukaan altistumisia tulee eniten kesän lämpimien jaksujen aikana.

Tämä johtuu siitä, että bakteerit ovat luonnollisesti aktiivisempia tällöin ja tuottavat enemmän toksiineja. Lisäksi lämpiminä jaksoina käydään enemmän uimassa järvissä, mikä osaltaan nostaa myös altistumisien määrää. Pääosa altistuneista kuului molempina kesinä ikäluokkaan 6–12 vuotta ja pääsääntöinen altistumistie oli uiminen. (Eronen - Hoppu - Jauhiainen 2006, 11.)

Kaikki syanobakteeritoksiinit ovat hyvin myrkyllisiä laboratorio-olosuhteissa ja jo vähäisinä pitoisuuksina aiheuttavat vakavia oireita. Tästä huolimatta Suomessa oireet altistustapauksissa ovat jääneet vähäisiksi ja kuolemantapauksia ei ole raportoitu. Toksisuuteen vaikuttaa hyvin paljon altistumistapa, joista vakavin on hengitysteiden kautta tapahtuva altistus. Tämä altistumistapa on yleinen, kun sinilevää sisältävää vettä käytetään löylyvetenä. Tyypillisimpiä oireita altistumistapauksessa ovat ruoansulatuskanavan oireet, kuume, iho-oireet sekä silmä-, korva- ja nieluoireet. (Eronen ym. 2006, 13–15.)

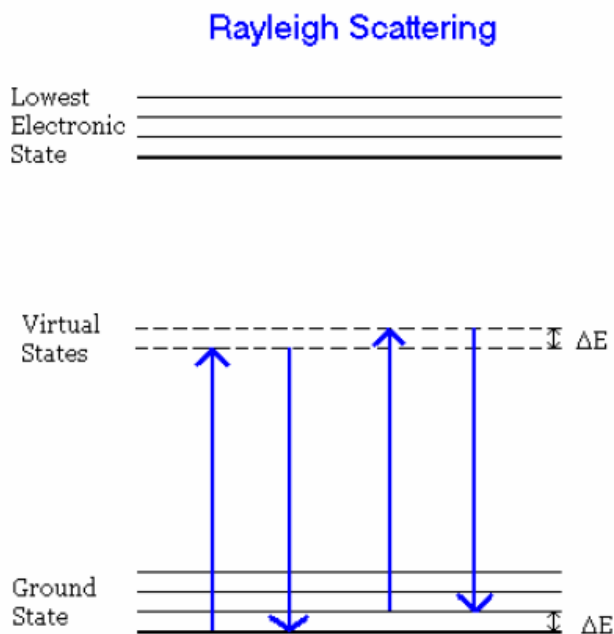
2.5 Syanobakteerien tutkiminen

Mikrobien tunnistamiseen on kehitetty useita menetelmiä, jotka kuitenkin ovat aikaa vieviä mikrobiologisia tai immunologisia tunnistusmenetelmiä. Lisäksi nämä mittaukset ovat erittäin hankalasti suoritettavissa kenttäolosuhteissa ja mitausten suorittajaksi tarvitaan usein koulutettu mikrobiologi. (Efrima - Zeiri 2009, 277.)

Mikrokystiinien eri variaatioiden määrittämisessä perinteisillä menetelmillä ongelmana on herkkyuden puute. Esimerkiksi HPLC:llä ja ELISA-testillä saadaan selville vain mikrokystiinien kokonaispitoisuus näytteessä, eikä näin ollen voida sanoa, mitä toksiineja vedessä on. Eri yhdistelmälaitteille on kehitetty menetelmiä, joilla saadaan mikrokystiinien eri variaatiot selville näytteistä (esimerkiksi LC-MS/MS, MALDI-MS ja SELDI-TOF-MS). Ongelmana näissä laitteissa on kuitenkin niiden korkea hinta ja huono liikuteltavuus. (Halvorson ym. 2011a, 9273.)

3 RAMAN SPEKTROSKOPIA

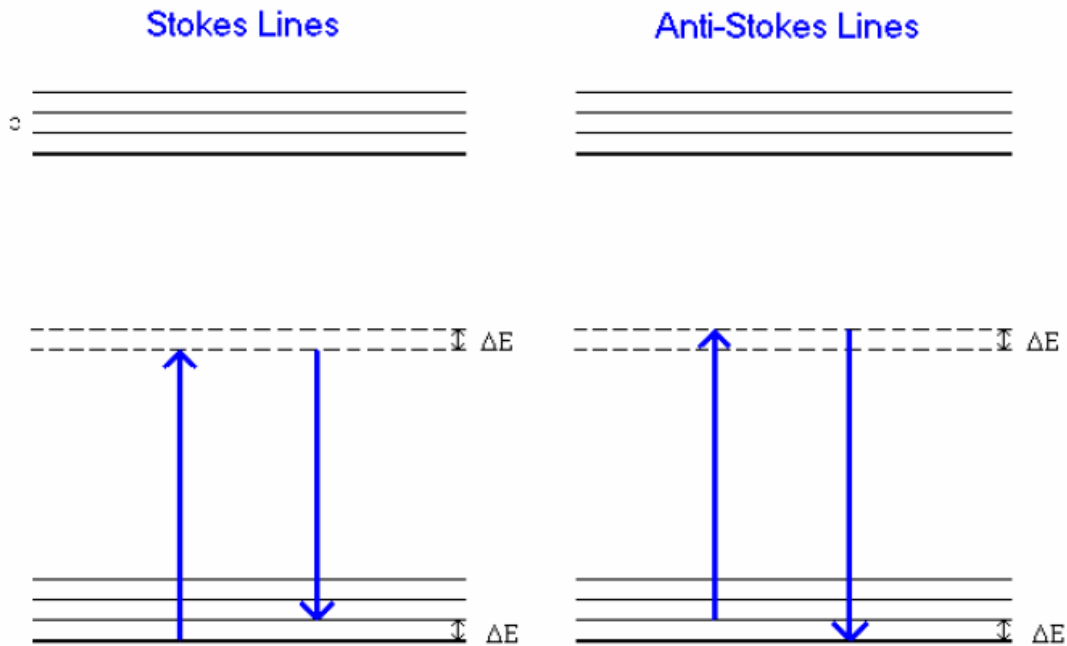
Kun monokromaattinen säde osuu näytteeseen, osa säteen fotoneista absorboituu, osa transmittoituu ja osa siroaa. Raman spektroskopiassa tutkitaan sironneita fotoneita ja niiden mahdollisesti muuttuneita viritystiloja. Sirontaa on kolmea eri tyyppiä: Rayleigh-sirontaa, Stokes-sirontaa ja anti-Stokes-sirontaa. Rayleigh-sironnassa fotoni saa energiaa törmätessään tutkittavaan molekyyliin, jolloin se siroaa. Tällöin fotonin energia muuttuu hetkellisesti ja fotoni siirtyy virtuaaliselle viritystilalle, minkä jälkeen se palaa kuitenkin takaisin samalle viritystilalle, jolta se alun perin lähti (kuva 5). Tällöin fotonin energia ei muutu eli säteily on elastista. (Jiang, 2–3.)



KUVA 5. Rayleigh-sironta (Jiang, 3)

Raman-spektroskopiassa ollaan kuitenkin kiinnostuneita fotoneista, joiden viritystila muuttuu törmäyksen seurauksena. Sirontaa, jossa fotonin energia muuttuu (kuva 6), kutsutaankin Ramansironnaksi kyseisen sironnin löytäjän C.V Ramanin mukaan. Ramansironta on hyvin paljon heikompaa kuin Rayleigh-

sironna, sillä vain noin yksi yksi kymmenestämiljoonasta näytteeseen osuvasta fotonista siroaa epäelastisesti. Stokes-sironnassa fotonin luovuttaa energiaa osuessaan näytteeseen, jolloin sen oma energia pienenee. Anti-stokes-sironnassa vastaavasti fotonin vastaanottaa energiaa osuessaan näytteeseen. (Jiang, 3.)

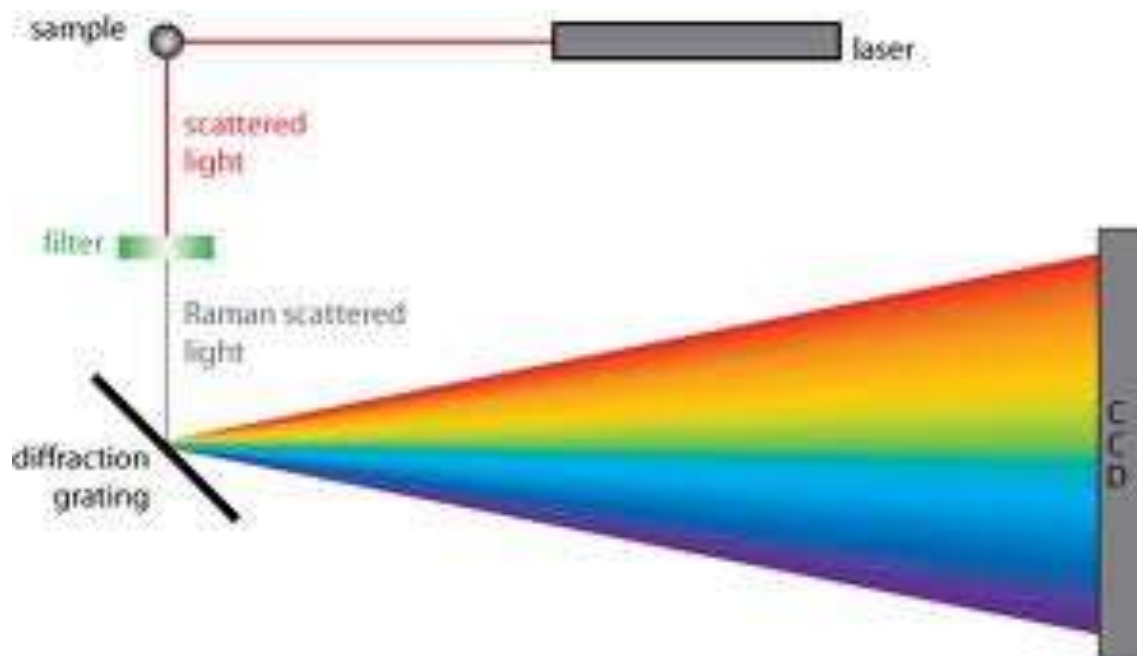


KUVA 6. Stokes- ja anti-Stokes-sironna (Jiang, 3)

3.1 Raman spektrometrin rakenne

Laitteisto, jolla Ramansirontaa mitataan, koostuu laserista, optisista komponenteista, spektrometrinä sekä detektorista ja prosessointilaitteesta (kuva 7). Laseria käytetään Ramanspektrometreissa, sillä sen avulla saadaan helposti kohdennettava monokromaattinen säde. Eri laserit tuottavat eri taajuisen säteen, joten haluttu laser on valittava tutkittavan näytteen mukaan. Laitteistossa on linsskejä ja peilejä, joiden avulla lasersäde ohjataan ja kohdennetaan näytteeseen. Laitteen ulkopuolella säde kulkee valokuidussa aina mittauspäälle asti. Sironneet fotonit kerätään tyypillisesti samalla valokuidulla, jota pitkin ne ovat

tulleet, minkä jälkeen ne kulkeutuvat spektrometriin. Varsinkin Ramanmikroskoopeissa on lisäksi suodattimia, joiden avulla poistetaan Rayleigh-sironnan kulkeutuminen detektorille. (Hamasha, 2011, 22–23.)



KUVA 7. Raman laitteen rakenne (University of Cambridge. 2012)

Käytettäessä monikanavaista detektoria kerätään sironnut valo optiikan avulla dispersiiviselle spektrometrille, joka erottelee sironneen valon hilan avulla eri aallonpituuksiksi. Nykyisissä laitteissa käytetään pääsääntöisesti monikanavaisia detektoreita kuten CCD- tai PDA-detektoria. Nämä detektorit mittaavat koko spektrin kerralla ja näin ollen lyhentävät huomattavasti mittauksessa tarvittavaa aikaa. (Princeton Instruments Inc. 2012.)

3.2 Raman spektrometrian ongelma, fluoresenssi

Varsinkin kun biologisia näytteitä tutkitaan Ramanspektroskopian avulla, on suurin ongelma tutkittaessa niiden aiheuttama fluoresenssi. (Hamasha 2011, 21). Fluoresenssi aiheutuu, kun virittynyt molekyyli palaa takaisin perustilaan

emittoiden samalla säteilyä (Jaarinen – Niiranen 2008, 66). Kaikki molekyylit eivät aiheuta fluoresenssiä, mutta varsinkin bakteereja tutkittaessa se on ongelma (Hamasha 2011, 22).

Fluoresenssiongelmaan on kehitetty monia ratkaisuja. Yksi ratkaisu on käyttää viritysaallonpituuksia, joilla fluoresenssi ei ole vahvaa. Toisaalta, jos käytetään IR-alueen viritysaallonpituutta, laskee detektointiherkkyys huomattavasti. Jos taas käytetään UV-alueen viritysaallonpituutta, saatetaan vahingoittaa herkkiä biologisia näytteitä. Nykyisin yksi parhaista keinoista vahventaa heikkojen näytteiden Raman signaalia on SERS, josta kerrotaan seuraavaksi. (Hamasha 2011, 22–23.)

3.3 SERS

SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) on Raman spektroskopian sovellus, jonka avulla saadaan vahvennettua näytteestä siroavaa Raman signaalia. Sovelluksen avulla saadaan tyypillisesti lisättyä näytteestä saadun signaalin vahvuutta 10^4 - 10^6 -kertaiseksi. SERS-signaali saadaan siten, että tutkittava näyte adsorboidaan SERS-aktiiviselle pinnalle, joka on tyypillisesti valmistettu joko kullasta tai hopeasta. Eri metallit antavat erilaisen vahvennuskertoimen, mutta on tutkittu, että kaikkien metallien avulla voidaan vahventaa Raman-signaalia. SERS:n tärkein ominaisuus on, että se lisää Raman-analytiikan herkkyyttä ja pintaselektiivisyyttä. (Hicks 2001, 1.)

SERS-tekniikassa signaalin vahvennus tapahtuu kahdella tavalla. Elektromagneettinen (EME) vahvennus, joka on näistä kahdesta tärkeämpi, on riippuvainen adsorbtiopinnan muodoista. Muodoilla tarkoitetaan sitä, että varsinainen SERS-substraatti on valmistettu yleensä pienistä metallipartikkeleista, jotka aiheuttavat epätasaisen muodon adsorbtiopinnalle. Elektromagneettisen vahvennuksen teho riippuu sekä metallista, jota substraatissa on käytetty että metallipartikkelien koosta, muodosta ja järjestäytymisestä. Vahvennus on suurinta kohdassa, jossa partikkeli kaartuu eniten. Toinen vahvennukseen vaikuttava tekijä on ke-

miallinen vahvennus (CE), jossa näytteen elektronien tila muuttuu kemiallisen adsorbtiion seurauksena. (Hicks 2001, 2–3.)

3.3.1 SERS-substraateille asetetut vaatimukset

SERS-substraattien hyödyllisyys riippuu niiden SERS-aktiivisuudesta, jolla tarkoitetaan niiden kykyä vahventaa Raman-signaalia sekä uudestaan käytettävyydestä. Koska substraatit on usein tehty joko kulta- tai hopeapartikkeleista, täytyy ne olla puhdistettavissa jo pelkästään taloudellisuuden vuoksi. (Cui - Lin - Ren - Tian - Xu 2009, 1730.)

Neljä tärkeintä ominaisuutta, joiden avulla substraattien toimivuutta pystytään luotettavasti tarkastelemaan, ovat

1. SERS-aktiivisuus
2. homogeenisuus
3. muuttumattomuus ja toistettavuus
4. puhdistettavuus.

Substraatin aktiivisuus on tärkeää tarvittavan herkkyuden kannalta, sillä useiden näytteiden tuottama Raman-signaali on niin heikko, että ilman tehokasta lisäystä, sitä ei voida detektoida. Substraatin homogeenisyydellä saavutetaan tasainen signaalin vahvennus näytteestä, mikä on tärkeää detektoinnin kannalta. Vahvennuskerroin ei saisi vaihdella samassa näytteessä yli kahdellakymmenellä prosentilla, jotta näytteestä saadaan tasainen spektri. Muuttumattomuudella ja toistettavuudella tarkoitetaan sitä, että substraatin vahvennusteho ei saa heikentyä yli kahtakymmentä prosenttia varastoinnin aikana. Substraatin puhdistettavuutta pohditaan hieman edempänä tässä luvussa. (Cui ym. 2009, 1730.)

3.3.2 SERS-substraattien puhdistaminen

SERS-substraatit kontaminoituvat helposti. Mahdollisia kontaminaatioita substraatteihin voi tulla jo substraattien syntensoinnin aikana, kun epäpuhtaudet pääsevät kosketuksiin substraatin kanssa ja muodostavat sidoksia tämän nanopartikkeleiden kanssa. Kun substraatti pääsee kosketuksiin ilman kanssa, on

mahdollista, että ilmasta adsorboituu epäpuhtauksia, jotka reagoivat substraatin kanssa. (Cui ym. 2009, 1739.)

SERS-substraatilta vaadittava puhtaus riippuu tutkittavan näytteen Raman-aktiivisuuden vahvuudesta. Jos näytteellä on vahva Raman-signaali, sen signaali todennäköisesti peittää epäpuhtauksien antamat signaalit alleen ja näin ollen saadaan luotettava tulos. Tutkittaessa tuntemattomia- tai näytteitä, joilla on heikko Raman-aktiivisuus, voivat epäpuhtauden antamat signaalit olla vakava haitta. Varsinkin silloin, kun substraattia käytetään havaitsemaan eri eliöitä (bakteereita) laimeista biologisista näytteistä, tulee substraattien puhtauteen kiinnittää erityisesti huomiota. (Cui ym. 2009, 1739.)

Menetelmä, jolla substraatti puhdistetaan, on riippuvainen substraatin rakenteesta, joka vaihtelee suuresti eri valmistajien välillä. Tyypillisimmät puhdistamistavat ovat substraatin nanopartikkeleiden sentrifugointi sekä erilaiset elektrokemialliset puhdistusmenetelmät, joissa käytetään hyödyksi eri alkuaineionien varauseroja. Substraattien puhdistus on edellytys tutkittaessa tuntemattomia ja näytteitä, jotka adsorboituvat heikosti substraatin pintaan. (Cui ym. 2009, 1740.)

3.4 Mikrobiologisten näytteiden mittaaminen Ramansironnan avulla

Raman spektroskopia on viime vuosina kehittynyt nopeasti bakteerien tunnistuksessa, sillä se antaa yksilöllisen sormenjälkispektrin kullekin tutkittavalle mikroobille. Spektri syntyy suurimmaksi osaksi bakteerien soluseinästä, jonka rakenne vaihtelee lajeittain. Kilpailukykyisen Raman spektroskopiasta tekee se, että bakteereita voidaan määrittää myös vesifaasista, mikä ei IR-spektroskopiolla ole mahdollista. Tavallisen Raman spektroskopian haittana on kuitenkin suhteellisen heikko signaali ja pitkä analyysiaika sekä suuri laserin teho, mikä voi vahingoittaa tutkittavaa näytettä. (Davis - Mujacic - Sengupta 2006, 1380.)

Näistä ongelmista johtuen eri tutkimusryhmät ovat kehittäneet tapoja tunnistaa bakteereita SERS-tekniikalla. Yhteistä ryhmien tutkimuksissa on se, että tutkittavan bakteerin pinnalle adsorboidaan SERS-substraattia, jonka ryhmät ovat

yleensä itse valmistaneet joko kulta- tai hopeapartikkeleista. Menetelmän vahvuus on näytteiden käsittely, sillä tekniikka ei vaadi vaarallisia kemikaaleja eikä kalliita vasta-aineita. Näytteet voidaan parhaassa tapauksessa mitata ilman minkäänlaista näytteen käsittelyä. Myös mittauksen nopeus on huomattava etu verrattuna muihin mikrobien tunnistustapoihin, sillä yksittäinen mittaus kestää parhaimmillaan alle 10 sekuntia. (Davis ym. 2006, 1380–1385.)

Useat tutkimusryhmät ovat kehittäneet tapoja tunnistaa mikrobeja puhtaista bakteeriviljelmistä, mikä on epäkäytännöllistä sillä usein bakteereita tutkittaessa, ne muodostavat usean eri mikrobin kasvuston. Guicheteau ym. tutkimusryhmä on julkaissut artikkelin, jossa he määritetään kolmea eri bakteeria samalla kertaa. Työn esivalmistelut suoritettiin kuten muiden tutkimusryhmien työssä, adsorboimalla metallipartikkeleita solujen pintaan. Mittaus suoritettiin Raman mikroskoopilla kemiallisen kuvantamisen avulla. Tällöin valittiin näytteestä mahdollisimman edustava kohta, minkä jälkeen näkökentän jokainen pikseli mitattiin erikseen. Näin saadaan oma spektri jokaiselle pikselille. Kun jokainen pikseli oli mitattu, verrattiin spektrejä, joista pystyttiin päättelemään eri bakteerien ilmentyminen ja sijainti näkökentässä. Tutkimuksen lopputuloksissa on esitetty, että bakteeriseoksen analysointi onnistui erittäin hyvin. (Christesen - Emgea - Guicheteau - Tripathi 2010, 1633–1636.)

Ongelmana ryhmällä on ollut toistettavan spektrin saaminen, minkä epäillään johtuneen substraatin epätasaisuudesta. Toinen menetelmän heikkous on ollut spektrin muuttuminen, joka johtuu metallipartikkelien hitaasta sitoutumisesta bakteerien kanssa. Tutkimuksissa on osoitettu, että spektri stabilisoituu vasta useiden tuntien jälkeen. Mittauksia rajoittavana tekijänä vesifaasista mitattaessa on bakteerien pitoisuus nesteessä. Alhaisin pitoisuus, joka on onnistuttu määrittämään, on 1×10^4 pmy/ml:ssa. (Davis ym. 2006, 1380.)

3.5 Mikrokystiinen ja nodulariinin tunnistaminen Ramansironnan avulla

Eri syanobakteeritoksiinien tunnistaminen Ramansironnan avulla perustuu eroihin toksiinien rakenteissa. Tutkimusryhmä Halvarson ym. on tehnyt laajan tut-

kimuksen koskien eri mikrokystiinivariantteja sekä nodulaaria. Aluksi tutkimuksessa on selvitetty aminohappojen spektrit, jotka ovat mukana jossakin variantista. Tämän jälkeen aminohappojen spektrejä on verrattu kunkin toksiinivariantin spektriin, josta on identifioitu spesifit piikit, jotka vastaavat kunkin variantin spektriä. (Halvarson ym. 2011a, 9274.)

Kuvan 8 taulukossa on esitetty MC-LR-toksiinin spektrissä näkyvien piikkien aaltoluvut, piikkien intensiteetti ja syy mistä signaali spektrissä johtuu (Halvorson ym. 2011b, 5646). Taulukosta nähdään, että jotkin signaalit nähdään toisia vahvempina, mikä voi auttaa toksiinin tunnistamisessa seoksesta työn käytännönvaiheessa.

peak (cm ⁻¹)	peak intensity	molecular vibration
751		CH ₃ out of plane bending
828	*	C-H out of plane bending in phenyl ring
887	*	C-COOH stretch, methylene rocking
970	*	ν(C-C) wagging, ρ(CH ₃), δ(CCH)
1004	**	phenyl C-C vibrations, symmetric ring breathing, methyl aspartic acid
1031	*	phenyl C-H in plane bending, C-N stretching in peptide bonds, C-C skeletal
1086		ν(C-C) gauche
1204–1214		phenyl ring vibrations
1200–1300		amide III
1307	**	CH ₃ /CH ₂ modes (twist, wag, bend)
1384		CH vibrations
1453	*	C-H bending modes of proteins
1645	**	COO vibrations, water in L-lysine aqueous sample

* Asterisks (*) indicate the most intense peaks.

KUVA 8. MC-LR:n Ramanspektrin piikit (Halvorson ym. 2011b, 5646)

4 TYÖN ESIVALMISTELUT

Työn käytännön vaihe suoritettiin 2013 keväällä VTT:n Oulun tutkimuskeskudessa. Seuraavassa on esitelty työssä käytettyä laitteistosta, SERS-substraatteja ja näytteitä.

Työn käytännön vaiheen tarkoituksena on verrata perinteisen Ramanin ja SERS:n eroa tutkittaessa bionäytteitä. Käytännön vaihetta varten tehtiin mitaussuunnitelma helpottamaan työn tekoa ja seuraamista.

4.1 Bayspec Nomadic™ Research-Grade Raman Microscope

Raman spektrometri, jolla työn mittaukset suoritettiin, on VTT:lle vuoden 2012 heinäkuussa hankittu Nomadic™ Research-Grade Raman Microscope. Bayspec Inc. valmistama tuote (kuva 9) on tällä hetkellä markkinoiden ainoa Raman mikroskooppi, jossa on kolme eri heräteaallopituutta sisältävää laseria (532, 785 ja 1064 nm). Laserin valinnalla voidaan maksimoida näytteestä saatu Raman signaali ja minimoida syntyvä fluoresenssi. (Bayspec Inc. 2013.)



KUVA 9. Nomadic™ Research-Grade Raman Microscope (Bayspec Inc. 2013)

Laitteessa jokaiselle laserille on oma spektrometri ja detektori. 532 ja 785 nm:n lasereille detektorit ovat CCD-detektorieita, kun taas 1064 nm:n laserille detektori on InGaAs. Omat spektrometrit ja detektorit mahdollistavat optimaalisen herkkyyden ja resoluution koko spektraaliselle alueelle ja minimoivat liikkuvien osien tarpeen laitteen sisällä, mikä poistaa mittausvirheitä ja epätarkkuuksia. (Bayspec Inc. 2013.)

Varsinainen mikroskooppiosa laitteessa on Olympus® research-grade optical microscope, the Nomadic™, jossa on kolme eri suurennoskertoimen sisältävää objektiivia. Mikroskoopin avulla voidaan valita tarkkaan tutkittava kohta näytteestä ja kohdentaa laser kyseiseen kohtaan. Kohdentamista helpottaa myös laitteen ohjausyksikkö, jolla pystytään siirtämään mikroskoopin näytteenpidikettä erittäin tarkasti xyz-akselilla. (Bayspec Inc. 2013.)

4.2 Renishaw Inc. Klarite® SERS substrates

Renishaw'n valmistama SERS-substraatti on 4 x 4 mm:n kokoinen neliö, jonka aktiivinen pinta rakentuu kullasta tehdyistä nanopartikkeleista, jotka ovat silikonin pinnalla. Kyseisen substraatin antama vahvennuskerroin on noin 1×10^6 , riippuen tutkittavasta näytteestä. Substraatille suositeltu laserin heräteaalnonpituus on 785 nm. (Renishaw Inc. 2013.)

Klarite® SERS-substraattien käyttösovellukset ovat pitkälle samat valmistajien, mutta Renishaw'n valmistamaa tuotetta on käytetty näiden lisäksi myös kotimaan turvallisuuden puolesta Yhdysvalloissa, tunnistettaessa esimerkiksi biouhkia. Klarite®:n tärkeimmät ominaisuudet ovat toistettavuus, herkkyys, mitaustulosten spesifisyys ja mahdollisuus erilaisiin näytteenkäsittelytapoihin. (Renishaw Inc. 2013.)

4.3 Syanobakteerit

Työssä tutkittavat syanobakteerikannat (205 ja 269) tilattiin VTT:n Helsingin toimipisteestä. Kanta 205 on MC-LR toksinia tuottava kanta ja 269 ei tuota toksinia, mutta on muuten identtinen kannan 205 kanssa.

Bakteerien saavuttua ne jaettiin eppendorf-putkiin, minkä jälkeen niitä kasvatettiin huoneenlämmössä ravistelukasvatuksessa (130 rpm). Bakteerit säilytettiin kasvatusliemessä, johon ne oli säilötty.

4.4 MC-LR

Toksiini tilattiin Enzo Life Sciences:ltä ja mittauksia varten se liuotettiin metanoliin. Moolimassa on 995,2 g/mol ja puhtaus yli 95 %. Liitteessä 1 on tarkempaa tietoa toksiinista ja sen ominaisuuksista.

4.5 Mittaussuunnitelma

Työn toteutusta varten tehtiin mittaussuunnitelma yhdessä työn ohjaajien kanssa. Mittaussuunnitelmasta nähdään (taulukko 1) näytteet ja tekniikka, jolla ne määritettiin. Jokainen näyte määritettiin sekä SERS:n kanssa että ilman sitä. Taulukossa on esitetty, millä pinnalla (näytealustalla) kukin näyte on mitattu.

Koska tutittava kohdemolekyylillä on toksiini, joka erittyy solun sisälle, tutkitaan soluja myös hajottamalla ne. Mittauksista ja solujen hajotuksista kerrotaan lisää työn suoritusvaiheessa luvussa 5.

TAULUKKO 1. Mittaussuunnitelma

NÄYTE	Perinteinen Raman	SERS
MC-LR (metanolissa)	<i>Al-levy</i>	<i>Klarite</i>
Hajotetut solut (sentrifugoidut)	<i>Al-levy</i>	<i>Klarite</i>
Hajotetut solut	<i>Al-levy</i>	<i>Klarite</i>
Ehjät solut	<i>Al-levy</i>	<i>Klarite</i>
Näytealusta	<i>Al-levy</i>	<i>Klarite</i>

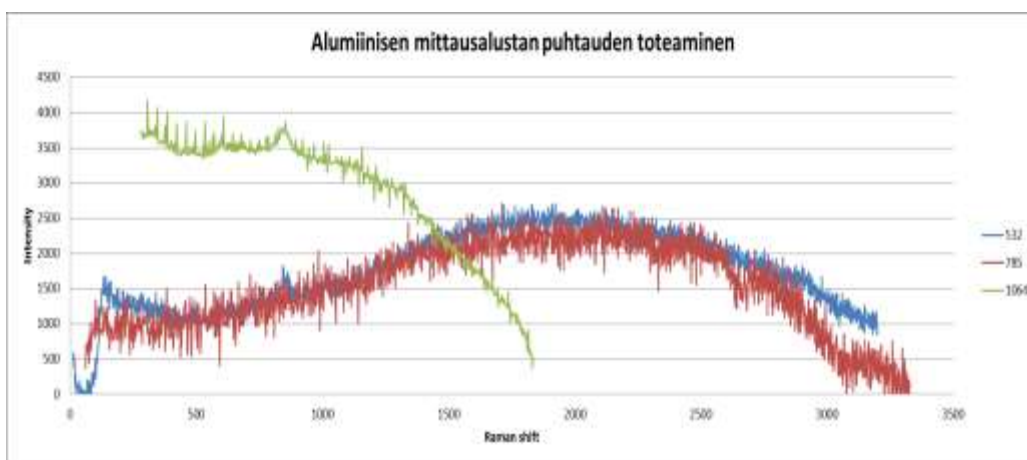
5 NÄYTTEIDEN TUTKIMINEN RAMAN-SIRONNAN AVULLA

5.1 Perinteinen Raman menetelmä

Perinteistä Raman menetelmää varten pestiin alumiininen näytelevy huolella. Kaikki metallit vahventavat jonkin verran näytteestä saatua Raman signaalia, mutta se ei tässä työssä haitannut, koska tarkoitus oli kehittää kvalitatiivista tunnistamismenetelmää.

Aluksi tarkistettiin pinnan puhtaus mittaamalla se heräteaallonpituuksilla. Mittausten spektrit nähdään kuvassa 10, josta huomataan, että pinta on puhdas sillä spektreissä ei näy epäpuhtauksista kertovia piikkejä. Mitattaessa laser kohdennettiin levyn pintaan mikroskoipimalla käyttäen 10 x objektiivia.

532 nm:n laserille käytettiin 10 sekunnin, 785 nm:n laserille 30 sekunnin ja 1064 nm:n laserille 60 sekunnin mittausaika. Kaikkien kolmen laserin tehot säädettiin mahdollisimman korkeaksi. Kullakin aallonpituudella tehtiin vain yksi mittaus.



KUVA 10. Alumiinilevyn puhtauden toteaminen

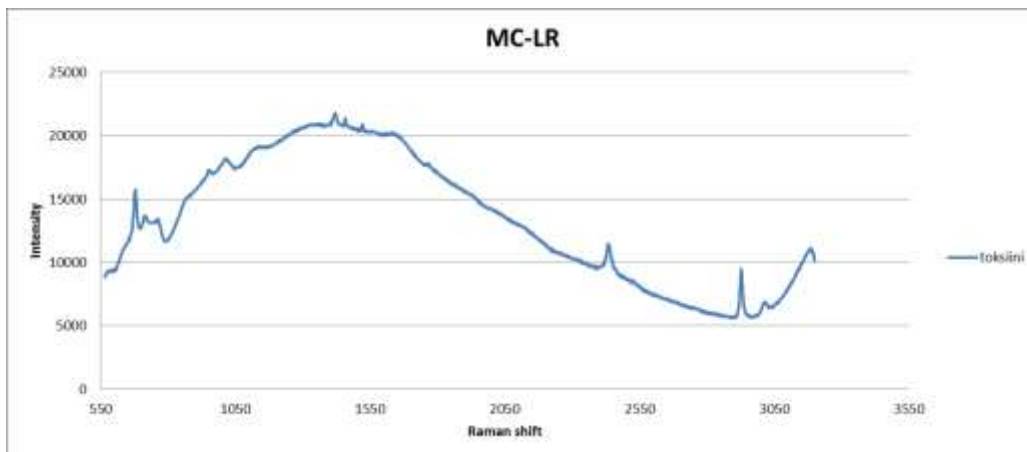
Kuten spektreistä voidaan tulkita, alumiinilevynpinta on kohtalaisen puhdas, joten vähäiset epäpuhtaudet, joita levyllä voi olla, voidaan jättää huomioimatta. Levy pestiin ionivaihdetulla vedellä, etanolilla ja uudestaan ionivaihdetulla vedellä joka mittauksen välissä.

5.1.1 MC-LR-toksiiniin karakterisointi

MC-LR-toksiinin datasivu on liitteenä 1. Ohjeen mukaan toksiini liuotettiin 1 ml:aan metanolia. Liukenemisen jälkeen näytetoksiini säilytettiin jääkaapissa (+4 °C), kun sitä ei käytetty.

Mittaus suoritettiin pipetoimalla toksiinia 10 µl alumiinilevyille, minkä jälkeen näytteen päälle asetettiin peitinlasi. Peitinlasin päälle tiputettiin pisara immersioöljyä ja 100 x objektiivi kohdennettiin näytteeseen.

Mittausta tehtäessä huomattiin, että ainoa laser, jota voitiin käyttää karakterisoinnissa, oli 532 nm:n laser, sillä muut laserit olivat ilmeisesti liian heikkotehoisia kyseiselle näytteelle. Näyte mitattiin 10 kertaa 5 sekuntin integrointiajalla ja mittauksista saadut spektrit keskiarvoistettiin. Kuvassa 11 nähdään MC-LR-toksiinin Raman spektri. Spektriä on paranneltu matemaattisesti Excel™ avulla, jotta saadut piikit erotettiin paremmin.



KUVA 11. MC-LR-toksiinin spektri

Kuvasta huomataan, että mittausta häiritsee fluoresenssi, joka on vahvinta aaltolukualueella (Raman shift) 1000–2550 cm⁻¹. Spektristä nähdään, että toksiinilla on tiettyjä vahvoja piikkejä, joiden avulla tunnistaminen voisi olla mahdollista varsinaisesta näytteestä.

5.1.2 Mikrokystiinikannan 269 tutkiminen

Mikrokystiinikanta 269 on tutkittavista kannoista myrkytön, mutta sen käsittelyssä oltiin silti huolellisia. Kuten edellä on jo todettu, kanta oli ollut eppendorff-putkessa ravistelukasvatuksessa huoneenlämmössä. Tutkimista varten näyte käsiteltiin siten, että solut sentrifugoitiin pohjaan (14 000 rpm, 1 min), minkä jälkeen poistettiin supernatantti. Putken pohjalle jäänyt solunappi liuotettiin 100 µl:aan ionivaihdettua vettä.

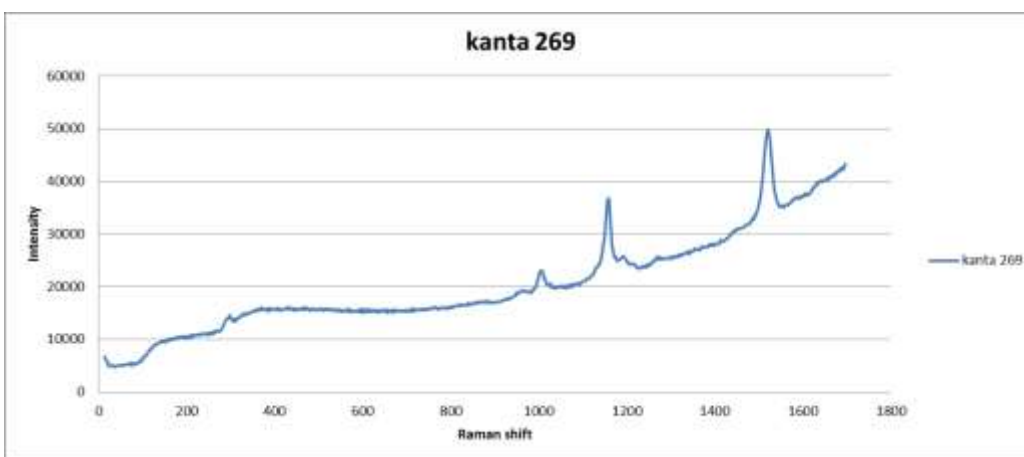
Mittausta varten näytettä pipetoitiin 10 µl alumiinilevyille ja laser kohdennettiin mikroskoopin 100 x objektiivin avulla siten, että nähtiin solu mahdollisimman tarkkana. Kohdistettaessa huomattiin, että solut liikkuivat, mikä tuotti suuren ongelman, koska kohdentaminen oli käytännössä mahdotonta. Ongelma ratkaistiin siten, että annettiin solujen laskeutua pohjaan, jolloin laser oli mahdollista kohdentaa niihin. Kuvassa 12 nähdään, miten laser kohdennettiin soluun (alla oleva kuva on epätarkempi, mitä todellisuudessa nähtiin mikroskoopista). Kuvasta nähdään, että tutkittavat solut muodostivat diploideja.



KUVA 12. Laserin kohdennus soluun

Kun laser oli saatu kohdennettua, solua mitattiin eri aallonpituuksilla aloittaen 1064 nm:n laserista. Huomattiin sama ongelma kuin tutkittaessa toksiinia, eli lasereiden 1064 nm ja 785 nm tehot eivät riittäneet, että olisi saatu minkäänlaisia spektriä irti tutkittavasta näytteestä.

Mitattaessa 532 nm:n laserilla tutkittavasta näytteestä saatiin signaali. Kuvassa 13 nähdään mittauksen spektri. Spektriä on käsitelty Excel™:llä, jotta sitä on helpompi tulkita. Näytettä mitattiin 10 kertaa 5 sekuntin integrointiajalla ja spektrit keskiarvoistettiin.



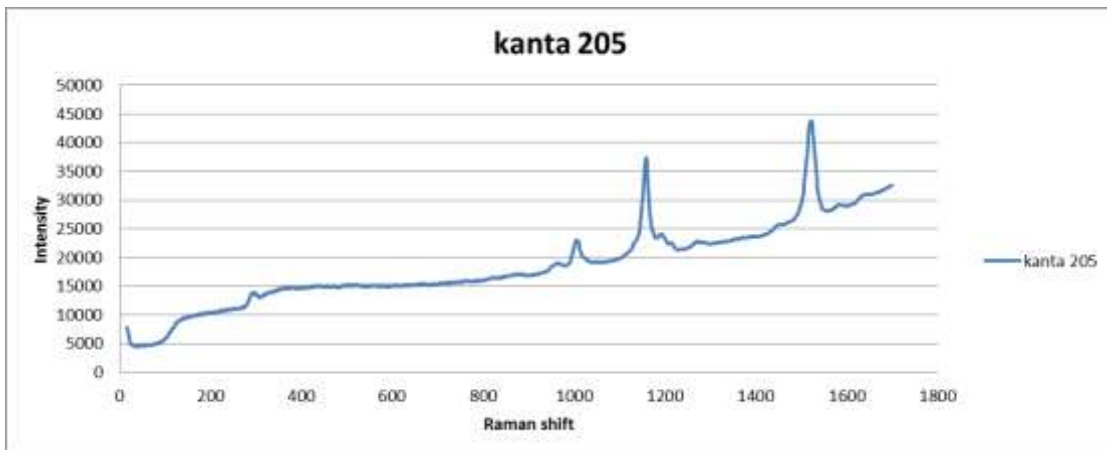
KUVA 13. Kannan 269 spektri

Yli 1800 cm^{-1} aaltoluilla spektrissä näkyi vain fluoresenssia. Huomattiin, että spektrissä näkyy kaksi vahvempaa piikkiä ja yksi vähän heikompi piikki. Spektrin varsinainen tulkinta tehtiin, kun saatiin mitattua kaikki näytteet perinteisellä menetelmällä.

5.1.3 Mikrokystiinikannan 205 tutkiminen

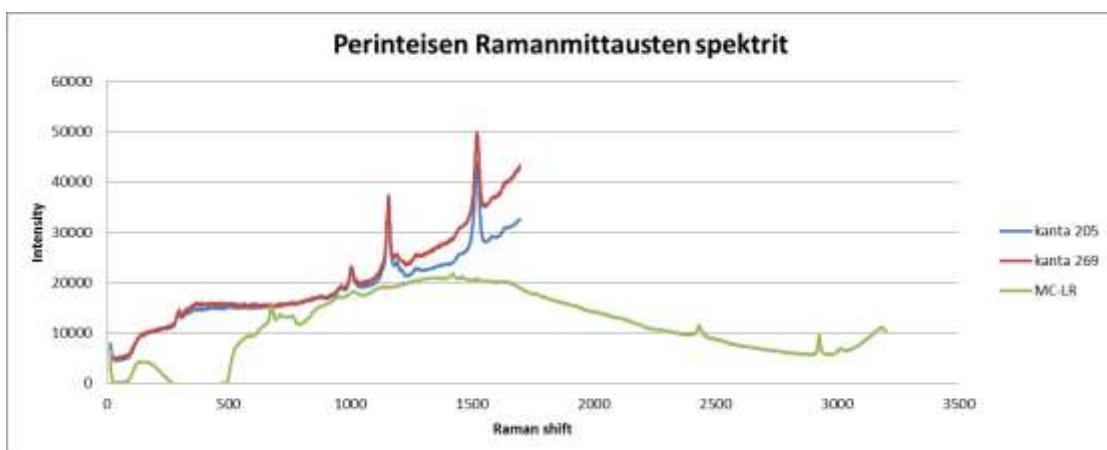
Mikrokystiinikanta 205 on endotoksiini MC-LR:ää tuottava, joten sen käsittelyssä oltiin erittäin huolellisia. 205 kanta oli ollut ravistelukasvatuksessa huoneenlämmössä siitä asti, kun se saapui laboratorioon, ja se valmisteltiin mittauksia varten kuten kanta 269 (sentrifugointi ym.).

Mittausta varten sitä pipetoitiin 10 µl näytelevylle ja annettiin solujen asettua noin 10 minuuttia, jonka jälkeen etsittiin tutkittava solu 100 x objektiivin avulla kuten kuvassa 11. Koska kannan 269 tutkiminen perinteisellä Raman menetelmällä ei onnistunut kuin laserilla 532 nm, alettiin tätä kantaa tutkia vain tällä laserilla. Kun solu löydettiin, kohdennettiin laser solun keskelle, minkä jälkeen näytekohtaa mitattiin 5 sekuntia 532 nm:n laserilla. Kuvassa 14 nähdään kannan 205 Raman spektri.



KUVA 14. Kannan 205 spektri

Myös kannan 205 kanssa todettiin, että spektrissä nähdään pelkkää fluoresenssia yli 1700 cm^{-1} lukemilla.



KUVA 15. Perinteisten Ramanmittausten spektrit

Kuvassa 15 on perinteisellä Raman menetelmällä mitatut spektrit, joista nähdään, että kantojen 269 ja 205 tunnistaminen toisistaan on mahdotonta. Lisäksi

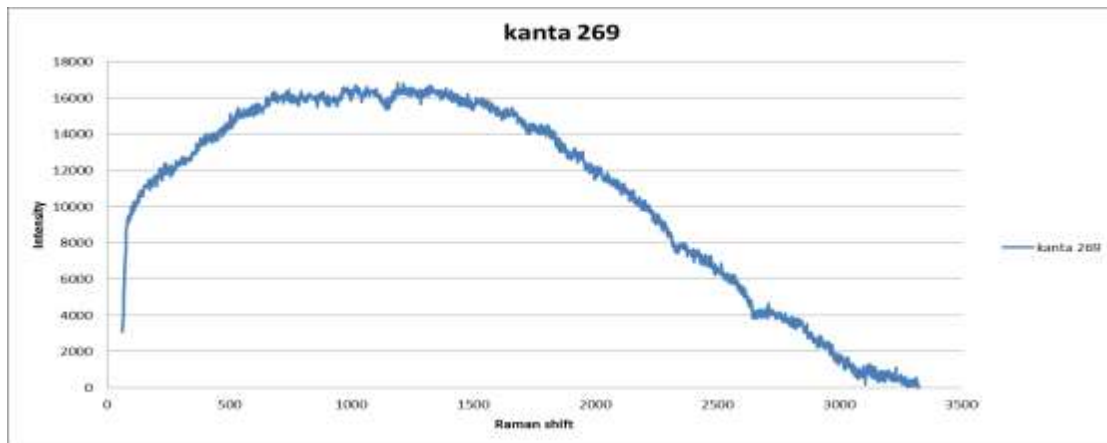
toksiinin spektristä nähdään, että voimakkaimmat piikit, jotka nähdään aaltolu-
vuilla 2400 cm^{-1} ja 2920 cm^{-1} , ovat bakteereista saatujen spektrien ulkopuolella.

5.1.4 Hajotettujen mikrokystiinikantojen tutkiminen

Koska tutkittava Toksiini erittyy solun sisälle, haluttiin soluja tutkia myös hajotta-
malla ne. Kustakin kannasta tehtiin kaksi eri hajotusnäytettä niin, että voitiin tut-
kia kokonaisnäyte (ei sentrifugoida) ja supernatantti (poistetaan sentrifugoinnilla
kaikki kiinteä näytteestä).

Kukin näyte käsiteltiin seuraavalla tavalla. Ensin eppendorf-putkessa kasvatus-
liemessä kasvaneet solut sentrifugoitiin (14 000 rpm, 1 min.) ja kasvatusliemi
poistettiin huolellisesti pipetoimalla. Tämän jälkeen kuhunkin putkeen lisättiin 30
 μl ionivaihdettua vettä ja 70 μl metanolia (70-prosenttinen metanoli-liuos). Solu-
ja inkuboitiin nestelisäysten jälkeen 60 minuuttia (+ 70 °C) lämpölokissa ravis-
telussa. Hajotuksen jälkeen putket sentrifugoitiin (14 000 rpm, 1 min.). Toisista
putkista supernatantti siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen ja kiinteä jäte hävitet-
tiin. Toiset putket sekoitettiin homogeeniseksi. Ennen mittauksia putkien annet-
tiin jäähtyä huoneenlämpöisiksi.

Myös näitä näytteitä yritettiin mitata 785 nm:n laserilla, mutta mittauksissa tuli
vastaan sama ongelma kuin edellisissä mittauksissa, eli laserin teho ei riittänyt
virittämään tutkittavia molekyylejä tarpeeksi, jotta niistä olisi saatu Raman siron-
taa, joka olisi ylittänyt näytteen fluoresenssin. Kuvassa 16 nähdään esimerkki-
spektri 785 nm:n laserilla tehdyistä mittauksista. Näytettä (metanolilla hajotettu
kanta 269) mitattiin 785 nm:n laserilla 20 sekuntia, ja laserin teho oli 49,8 mW.



KUVA 16. 785 nm:n laserilla mitattu näyte

Muista 1064 nm:n ja 785 nm:n mittauksista ei otettu kuvia, sillä kaikki spektrit olivat lähes identtisiä kuvan 14 spektrin kanssa.

Seuraavaksi näytteet mitattiin taulukon 2 mukaan. Näytteiden mittauksessa käytettiin 532 nm:n laseria, joka kohdennettiin objektiivin 50 x avulla. Kullekin näytteelle etsittiin kokeilemalla oikea mittausaika.

TAULUKKO 2. Hajotettujen solunäytteiden mittaaminen

Näyte	Laser (nm)	Aika (sek)	Toistot (kpl)
Kanta 269 (sen- trifugoitu)	532	4	10
Kanta 269	532	2,5	10
Kanta 205 (sen- trifugoitu)	532	5	10
Kanta 205	532	3	10

Mittausten jälkeen käsiteltiin tuloksia siten, että kaikkien näytteiden spektrit ovat järkevästi tulkittavissa spektrikuvasta (kuva 17). Spektreistä nähdään, että sakan poisto sentrifugoinnin jälkeen näytteen valmistuksessa ei vaikuta näytteestä saatuun signaaliin. Tulkittaessa spektrejä huomataan, että kannan 205 (toksiinia erittävä) spektreissä saadaan tälle kannalla spesifiset piikit aaltoluvuilla 1130 cm^{-1} ja 1500 cm^{-1} . Tämän perusteella kannat voitaisiin siis tunnistaa toisistaan.

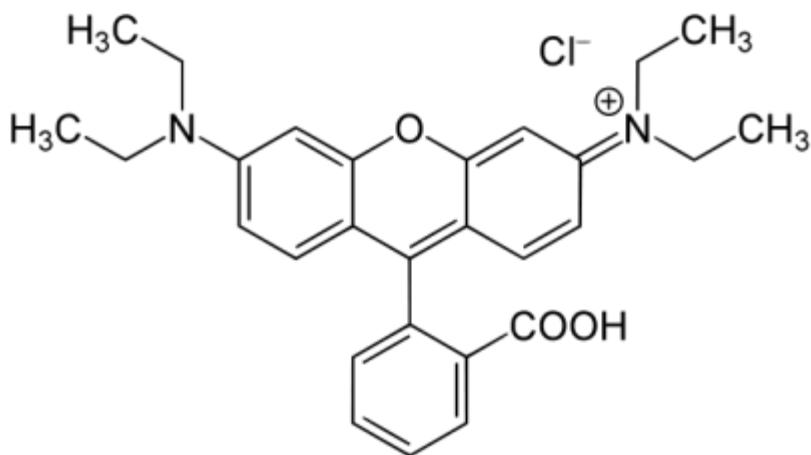


KUVA 17. Hajotettujen solujen spektrit

Näytteistä tehtiin toistomittauksia peräkkäisinä päivinä ja mitatut spektrit vastasivat kuvan 17 spektrejä.

5.2 SERS-mittaukset

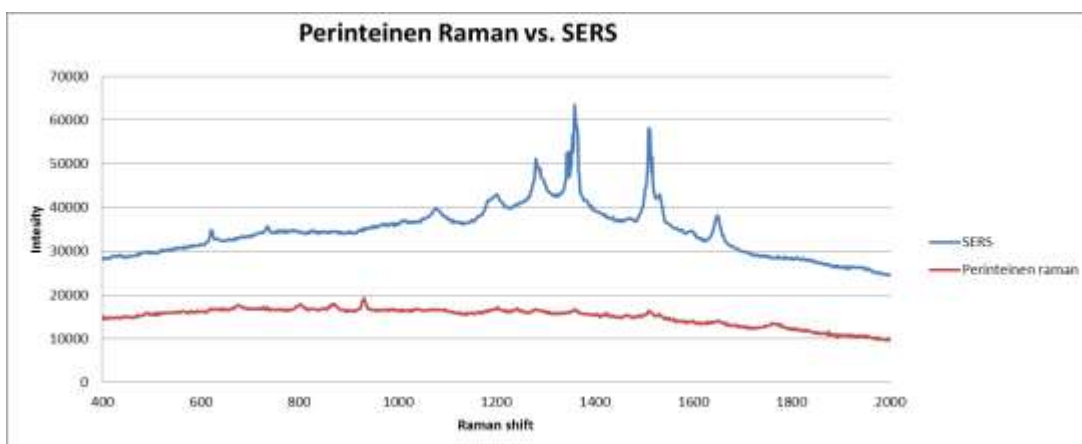
SERS mittaukset aloitettiin tutkimalla tunnettua yhdistettä, jonka mittaaminen on hankalaa perinteisellä Ramanilla, mutta mahdollista SERS:n avulla. Kirjallisuudesta (Etchegoin – Le Ru 2009, 8) tutkittiin, että muun muassa rhondaimiini B on tarkoitukseen sopiva molekyyli. Rhondaimiini B:n rakenne (kuva 18) aiheuttaa perinteisellä Ramanilla mitatessa voimakasta fluoresenssia, joka peittää alleen näytteestä saatavan signaalin.



KUVA 18. Rhodamiini B:n rakenne (Wikipedia 2013)

Mitattavasta näytteestä oli laboratoriossa valmiina näyte, jonka pitoisuus oli 9 mg/ml (valmistettu 12.7.2012). Näytettä pipetoitiin SERS-substraatille (Klarite) 5 µl ja sen annettiin kuivua levyn päälle. Tämän jälkeen 785 nm:n laser kohdistettiin 10 x objektiivin avulla substraattilevyn pintaan ja näytettä mitattiin 10 sekuntia 50 mW:n teholla. Näytteestä tehtiin 10 mittausta, joiden tulokset keskiarvoistettiin samaan spektriin (kuva 18).

Vertailun vuoksi sama näyte mitattiin myös perinteisellä Raman menetelmällä, pipetoimalla näytettä tippa alumiiniselle näytelevylle. 785 nm:n laser kohdennettiin näytteen pintaan ja sitä mitattiin samoilla asetuksilla kuin SERS näytettä. Kuvassa 19 nähdään ero näiden kahden eri menetelmän tuottaman spektrin välillä.



KUVA 19. Rhodamiini B:n perinteinen Raman ja SERS-spektri

Kuvasta 17 nähdään, että perinteisellä Ramanilla mitattaessa näytteestä saatiin vain hyvin heikkoa signaalia. SERS-substraatin kanssa mitattaessa spektrissä nähtiin vahvoja piikkejä, joten voidaan todeta, että saatu signaali on vahventunut huomattavasti. SERS-spektrin perusteella voidaan myös todeta, että käytettävät substraatit toimivat.

Verrattaessa kirjallisuudesta löydettyä rhondaimiini 6G:n (Etchegoin ym. 2009, 8) ja mitatun rhondaimiini B:n spektrejä huomataan, että saadut piikit vastaavat hyvin pitkälle toisiaan. Rhondaimiini 6G:n ja rhondaimiini B:n rakenteissa on pieniä eroja, josta johtuvat pienet erot spektreissä.

5.2.1 MC-LR:n tutkiminen SERS:llä

Metanoliin liuotettua toksiiniä pipetoitiin SERS-levylle 10 µl, minkä jälkeen sen annettiin kuivua levyn pinnalle. Pipetointi toistettiin 3 kertaa, jotta levylle saatiin enemmän näytettä mittausta varten. Tämän jälkeen levytä etsittiin mikroskoopin avulla kohta, johon oli kuivunut ja kiteytynyt tutkittavaa toksiinia. Laser (785 nm), kohdennettiin mittauskohtaan, minkä jälkeen alettiin etsiä mittaasetuksia kokeilemalla.

Näytteestä yritettiin saada signaalia useilla eri asetuksilla siinä kuitenkin epäonnistuen. Koska mittaus epäonnistui, tutkittiin SERS-substraattien ominaisuuksia tarkemmin kirjallisuudesta.

Kirjallisuudesta käy ilmi, että SERS-substraattien metalleilla on usein negatiivinen varaus, jonka takia ne hylkivät negatiivisen varauksen omaavia molekyylejä. Tutkittava toksiini taas on peptidi, joka liuoksessa saa negatiivisen varauksen ja näin ollen ei sitoudu substraatin pintaan halutulla tavalla. (Etchegoin ym. 2009.)

5.2.2 Mikrokystiinkantojen 205 ja 269 tutkiminen SERS:llä

Tutkimista varten kumpaakin kasvatusliemessä olevaa kantaa pipetoitiin 1 ml omaan eppendorf-putkeen. Tämän jälkeen kasvatusliemessä olevat solut sentri-

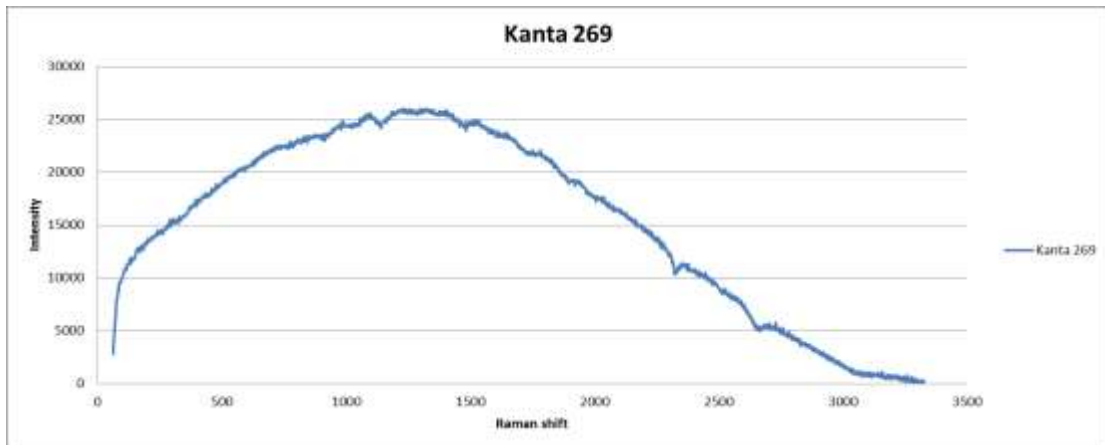
fugoitiin (14 000 rpm, 10 min) putkien pohjalla ja putkiin lisättiin 100 µl ionivaihdettua vettä.

Kumpaakin kantaa pipetoitiin omalle substraattilevyille 10 µl, minkä jälkeen näytteiden annettiin kuivua levyille. Kuivumisen jälkeen nähtiin mikroskoopilla levyjen päällä solurykelmiä.

Ensin otettiin mittauksen kohteeksi kanta 205, josta etsittiin solurykelmä 10 x objektiivin avulla. Laser kohdennettiin siten, että nähtiin SERS-levyn pinta mahdollisimman tarkkana. Tällöin laser kohdistuu kohtaan, jossa pitäisi olla vuorovaikutusta bakteerien ja substraatin molekyyliden välillä. Mittauksissa käytettiin 785 nm:n laseria, sillä se on suositeltu laser Renishawn Klarite SERS-substraateille (Renishaw Inc. 2013).

Bakteerien tutkiminen substraattien kanssa ei onnistunut, eikä mittauksissa saatu minkäänlaista luotettavaa spektriä mitattua. Kuvassa 20 nähdään kannan 269 mitattu SERS-spektri, joka oli samanlainen kaikissa solumittauksissa (hajotettujen ja ehjien solujen mittauksissa).

Kuvan 20 spektristä nähdään, että näytteestä ei ole saatu bakteerin identifiointiin tarvittavia signaalia. Tämän epäillään johtuneen siitä, että tutkittavat bakteerit tai niiden osat eivät muodosta vuorovaikutuksia käytetyn substraatin pintapartikkeleiden kanssa.



KUVA 20. Kannan 269 SERS-spektri

Koska muista bakteerimittauksista saatiin aivan vastaavanlainen spektri, ei nähty aiheelliseksi sisällyttää näitä spektrejä työhön. Epäonnistuminen SERS-mittauksissa voi johtua myös käytetystä substraatista, sillä yleensä mikrobien SERS-mittauksissa on käytetty liuosmaisia SERS-substraateja.

6 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia kahden saman syanobakteerilajin eri kantojen tunnistamista Ramanspektroskopiolla. Osa tavoitteena oli myös kyetä tunnistamaan toisen kannan tuottaman endotoksiini MC-LR:n tunnistamista suoraan soluista.

Työssä tutkitut syanobakteerit olivat mikrokystiinit 205 ja 269, jotka ovat saman lajin eri kantoja. Ainoa ero kantojen välillä on toksiiini, jota kanta 205 tuottaa. Kantojen tunnistamista varten kehitettiin mittausmenetelmää, jolla ne voidaan erottaa toisistaan. Bakteereja tutkittiin sekä kokonaisina että hajotettuina, ja niiden spektrejä vertailtiin.

SERS-substraattien toimivuus todettiin rhondaimiini B:n avulla ja ne saatiin toimimaan tämän näytteen kanssa halutulla tavalla. Toksiinia ja mikrobeja tutkittaessa ei saatu haluttuja tuloksia mittauksista ja näin ollen pääteltiin, että kyseiset substraatit eivät sovellu kyseiseen analytiikkaan. Syyksi mittauksen epäonnistumisiin pääteltiin riittämätön sitoutuminen näytteen ja substraatin molekyylien välillä.

Työn teoriaosuudessa on kerrottu mikrobien tunnistamisesta SERS:n avulla ja näissä määrityksissä on saatu erittäin lupaavia tuloksia. Ramanspektroskopia on kuitenkin vielä vasta tutkimisvaiheessa mikrobien tunnistuksessa, mutta lupaavien tulosten ansiosta ala kehittyy jatkuvasti valtavin harppauksin.

Tutkittaessa sekä toksiiinia että bakteereja perinteisellä menetelmällä, saatiin positiivisia tuloksia. Toksiinista saatiin mitattua spektri, jossa nähtiin pieniä piikkejä, joiden avulla toksiiinin tunnistaminen soluista voisi olla mahdollista. Soluja mitattaessa kuitenkin törmättiin fluoresenssiongelmaan, joka teki toksiiinin ja solujen spektrien vertaamisen mahdottomaksi. Tulokset kuitenkin osoittavat, että menetelmää kehittämällä toksiiinin tunnistaminen soluista voisi olla mahdollista.

Metanolilla hajotettuja soluja mitattaessa saatiin työn parhaat tulokset. Kannan 205 mittauksessa saatiin spektriin kahden tälle kannalle ominaisen piikin signaalit, joiden avulla kantojen erottaminen on mahdollista. Ajan puutteen vuoksi työssä ei ollut mahdollista alkaa tutkia useampia bakteerilajin kantoja vaan tyydyttiin saatuihin tuloksiin. Työssä ei ole myöskään pohdittu mistä saadut signaalit spektreissä johtuvat, sillä se olisi vaatinut huomattavasti enemmän aikaa yksittäisten solunosien mittausta varten.

Työssä saadut tulokset ovat lupaavia menetelmän jatkokehitystä silmällä pitäen, sillä Ramanspektroskopia ja varsinkin SERS ovat jatkuvasti kehittymässä. Lisäksi näytteiden valmistelut mittausta varten ovat yksinkertaisia ja määritysajat lyhyitä, mikä tekee menetelmästä vahvan kilpailijan nykyajan kiireisiin laboratorioihin.

LÄHTEET

Bayspec Inc. 2013. Raman microscopes. Nomadic™ Research-Grade Raman Microscope. Saatavissa:

<http://www.bayspec.com/spectroscopy/nomadic-research-grade-raman-microscope/>. Hakupäivä: 24.2.2013.

Christesen, Steven – Emge, Darren – Guicheteau, Jason – Tripathi, Ashish 2010. Bacteriamixture identification using Raman and surface-enhanced Raman chemical imaging. Research article in Journal of chemical education, Vol. 41. S. 1632–1637.

Cui, Yan – Lin, Xiu-Mei – Ren, Bin – Tian, Zhong-Qun – Xu, Yan-Hui 2009. Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues. Review article in Anal Bioanal Chem, Vol. 394. S. 1729–1745.

Davis, James – Mujacic, Mirna – Sengupta, Atanu 2006. Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal bioanal chem, Vol. 386. S. 1379–1386.

Efrima, S – Zeiri, L. 2009. Understanding SERS of bacteria. Research article in Journal of chemical education, Vol. 40. S. 277–288.

Eronen, Anna-Kaisa – Hoppu, Kalle – Jauhiainen, Kirsti 2006. Syanobakteerisiintymiin liittyneet oireet 2004–2005. Teoksessa väliraportti SYKE (toim.). Sinilevämyrkyt Suomen järvissä ja niiden yhteys ihmisille aiheutuneisiin oireisiin. S. 11–16.

Etechegoin, Pablo G. – Le Ru, Eric C. 2009. Principles of Surface-Enhanced Raman spectroscopy and related issues. 1. painos. Netherlands: Elsevier B. V.

Halvorson, Rebecca – Leng, Weinan – Vikesland, Peter 2011a. Differentiation of Microcystin, Nodularin, and Their Component Amino Acids by Drop-

Coating Deposition Raman Spectroscopy. Analytical Chemistry, Vol. 83. S. 9273–9280.

Halvorson, Rebecca – Vikesland, Peter 2011b. Drop Coating Deposition Raman (DCDR) for Microcystin-LR. Environmental Science & Technology, Vol. 45. S. 5644–5651.

Hamasha, Khozima Mahmoud. 2011. Raman spectroscopy for the microbiological characterization and identification of medically relevant bacteria. Partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy. Wayne State University. Detroit, Michigan.

Hicks, Christine J. 2001. SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy. MSU CEM 924.

Hoppu, Kalle – Lahti, K. – Salmela, J. 2001. Suomen lääkärilehti: 56 (27-29) S. 2891-2895.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5. – 6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Jiang, Shan. Surface Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. Term paper for Physics 598 OS. Department of Materials Science and Engineering. University of Illinois.

JärviWiki. 2013. Leväarkisto, Levätilanne 2012, Viikko 35. Saatavissa: <http://www.jarviwiki.fi/wiki/Toiminnot:RunQuery/Lev%C3%A4tilannekartta>. Hakupäivä: 25.3.2013

Myllymäki, Riitta 2009. Raaka-aineiden tunnistus Raman-spektroskopiolla. Turku: Turun ammattikorkeakoulu, laboratorioalan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

Nanova Inc. 2012. Q-SERS. Saatavissa: <http://www.q-sers.com/q.html>. Hakupäivä: 24.2.2013.

Pietiläinen Olli-Pekka. 2006. Suomen järvet, tila ja tulevaisuus. Teoksessa väliraportti SYKE (toim.). Sinilevämyrkyt Suomen järvissä ja niiden yhteys ihmisille aiheutuneisiin oireisiin. S. 4–7.

Princeton Instruments Inc. 2012. Raman spectroscopy basics. Saatavissa: http://content.piacton.com/Uploads/Princeton/Documents/Library/UpdatedLibrary/Raman_Spectroscopy_Basics.pdf. Hakupäivä 26.3.2013.

Rapala, Jarkko. 2006. Syanobakteerimyrkyt Suomen järvissä ja niiden yhteys oireisiin. Teoksessa väliraportti SYKE (toim.). Sinilevämyrkyt Suomen järvissä ja niiden yhteys ihmisille aiheutuneisiin oireisiin. S. 17–22.

Renishaw Inc. 2013. Klarite® SERS substrates. Saatavissa: <http://www.renishawdiagnostics.com/en/klarite-sers-substrates--17076>. Hakupäivä: 24.2.2013.

Sivonen, Kaarina. 2002. Vesimikrobiologia. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.). Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummeruksen Kirjapaino Oy. S. 412–419.

University of Cambridge. 2012. Method (dispersive Raman spectroscopy). Saatavissa: <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/method.php>. Hakupäivä: 24.2.2013.

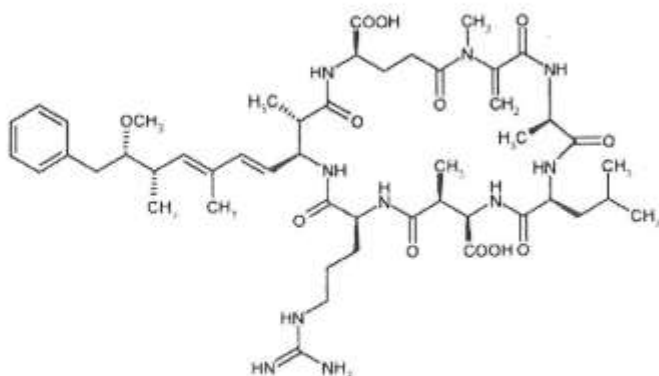
Wikipedia 2013. Rhodamine B Vapaa tietosanakirja. Saatavissa: http://en.wikipedia.org/wiki/Rhodamine_B. Hakupäivä: 11.4.2013.

PRODUCT DATA SHEET



ALX-350-012

Microcystin-LR



Product Number/Sizes

ALX-350-012-C050
ALX-350-012-C100
ALX-350-012-C500
ALX-350-012-M001

50 µg
100 µg
500 µg
1 mg

Lot: L28179

Replaces Prod. #: BML-EI193

524 mg

MC-LR
0.07 µg/ml
2 µg/ml

anti-MC
72 µg/L
50 mg/L

Heptapeptide ester hepatotoxin. Tumor promoter. Equally potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1) and 2A (PP2A). PP2B is less sensitive and PP2C is not inhibited up to 4µM. Useful for affinity-purification of PP2A. The product is not cell permeable except in liver cells, which appear to have a functional uptake system. Is absorbed by hepatocytes via the multispecific organic anion transporter. Does not induce any effects on mouse skin or human fibroblasts due to cell membranes impermeability. Has no effect on protein kinases. Less toxic than the more hydrophobic analogs microcystin-LY, -LW and -LF. Frequently contaminates fresh-water lakes and ponds. Causes livestock poisonings. Ozonation did lead to complete loss of toxicity and toxins from contaminated samples.

Product Specifications

IDENTITY:	Identity determined by MS.
FORMULA:	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
MW:	995.2
PURITY:	≥95% (HPLC)
APPEARANCE:	Whitish film adhered to inside of the vial.
CAS:	101043-37-2
RTECS:	GT2810000
SOURCE/HOST:	Isolated from <i>Microcystis aeruginosa</i> .
SOLUBILITY:	Soluble in 100% ethanol, methanol or DMSO.
SHIPPING:	AMBIENT
LONG TERM STORAGE:	-20°C
USE/STABILITY:	Stock solutions are stable for up to 6 months when stored at -20°C. <u>Unstable at pH>2.7.</u>
HAZARD:	HIGHLY IRRITANT. MAY BE CARCINOGENIC. VERY TOXIC.
HANDLING:	For maximum product recovery after thawing, centrifuge the vial before opening the cap.

Product Literature References

Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR Y. Chen, et al. *Reprod. Toxicol.* **in press** (2011)
Global Gene Expression Profiling in Larval Zebrafish Exposed to Microcystin-LR and Microcystis Reveals Endocrine Disrupting Effects of Cyanobacteria E.D. Rogers, et al *Environ. Sci. Technol.* **45** 1962 (2011)

NORTH/SOUTH AMERICA

ENZO LIFE SCIENCES, INC.
10 Executive Blvd
Farmingdale, NY 11735
USA
T 1-800-942-0430
T 1-610-941-0430
F 1-610-941-9252
E info-usa@enzolifesciences.com

SWITZERLAND & REST OF EUROPE

ENZO LIFE SCIENCES AG
Industriestrasse 17, Postfach
CH-4415 Lausen
Switzerland
T +41(0) 61 926 89 89
F +41(0) 61 926 89 79
E info-ch@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

GERMANY

ENZO LIFE SCIENCES GMBH
Marie-Curie-Strasse 8
DE-79539 Lärzath
Germany
T +49(0) 7621 5500 526
Toll Free 0800 664 9518
F +49(0) 7621 5500 527
E info-de@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

BELGIUM

ENZO LIFE SCIENCES BVBA
Melkerijweg 3
BE-2240 Zandhoven
Belgium
T +32(0) 3 466 04 20
F +32(0) 3 466 04 29
E info-be@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

UK & IRELAND

ENZO LIFE SCIENCES (UK) LTD.
Palatine House
Matford Court
Exeter EX2 8NL
UK
T 0845 601 1488 (UK customers)
T +44(0) 1392 825900 (from overseas)
F +44(0) 1392 825910
E info-uk@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

FRANCE

ENZO LIFE SCIENCES
c/o Cevalab s.a.s.
13, Avenue Albert Einstein
FR-69100 Villeurbanne
France
T +33 472 440 655
F +33 437 484 239
E info-fr@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

ALEXIS assay designs
BIOMOL Stressgen
www.enzolifesciences.com

- Investigation of microcystin congener-dependent uptake into primary murine neurons* D. Feurstein, et al. *Environ. Health Perspect.* **118** 1370 (2010)
- Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication* R. La-Salette, et al. *J. Appl. Toxicol.* **28** 55 (2008)
- Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation* S. Brooke, et al. *Toxicol.* **48** 1054 (2008)
- Negative regulation of ERK and Elk by protein kinase B modulates c-Fos transcription* I. Galetic, et al. *J. Biol. Chem.* **278** 4416 (2003)
- The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment* K. Bischoff *Vet. Hum. Toxicol.* **43** 294 (2001)
- Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, Tetrahymena pyriformis* C.J. Ward & G.A. Codd *J. Appl. Microbiol.* **86** 874 (1999)
- Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters* H. Fujiki & M. Suganuma *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **125** 150 (1999)
- Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters* M. Runnegar, et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **134** 264 (1995)
- Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity* R. Nishiwaki, et al. *Cancer Lett.* **83** 283 (1994)
- Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation* H.W. Davidson, et al. *J. Cell. Biol.* **116** 1343 (1992)
- Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR* R. Nishiwaki-Matsushima, et al. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **118** 420 (1992)
- Protein phosphatase 2A is a specific protamine-kinase-inactivating phosphatase* G.D. Amick, et al. *Biochem. J.* **287** 1019 (1992)
- Increased synthase phosphatase activity is responsible for the super-activation of glycogen synthase in hepatocytes from fasted obese Zucker rats* L. Lavoie, et al. *Endocrinology* **129** 2674 (1991)
- Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases* R.E. Honkanen, et al. *J. Biol. Chem.* **265** 19401 (1990)
- Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants* C. MacKintosh, et al. *FEBS Lett.* **264** 187 (1990)
- Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda* K.L. Rinehart, et al. *JACS* **110** 8557 (1988)
- Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from Microcystis aeruginosa* D.P. Botes, et al. *JCS Perkin Trans. I* **2747** (1985)

Background/Technical Information

Microcystins are a group of cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by a number of cyanobacterial genera. The most notable of which, and namesake, is the widespread genus *Microcystis*. Structurally, all microcystins consist of the generalized structure cyclo(-D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷-). X and Y are variable L-amino acids. D-MeAsp is D-erythro-β-methylaspartic acid and Mdha is N-methyldehydroalanine. Adda is the cyanobacteria unique C₂₀ β-amino acid 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-deca-4,6-dienoic acid. Substitutions of the variable L-amino acids at positions 2 and 4 give rise to at least 21 known primary microcystin analogs and alterations in the other constituent amino acids result in more than 90 reported microcystins to date.

WARNING: THIS PRODUCT IS NOT INTENDED OR APPROVED FOR HUMAN, DIAGNOSTICS OR VETERINARY USE. USE OF THIS PRODUCT FOR HUMAN OR ANIMAL TESTING IS EXTREMELY HAZARDOUS AND MAY RESULT IN DISEASE, SEVERE INJURY, OR DEATH.

MATERIAL SAFETY DATA: This material should be considered hazardous until information to the contrary becomes available. Do not ingest, swallow, or inhale. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. This information contains some, but not all, of the information required for the safe and proper use of this material. Before use, the user must review the complete Material Safety Data Sheet.

WARRANTY AND LIMITATION OF REMEDY: Enzo Life Sciences AG, Enzo Life Sciences International, Inc., Enzo Life Sciences GmbH, Enzo Life Sciences (UK) Ltd, and Enzo Life Sciences BVBA (The Companies) make no warranty of any kind, expressed or implied, including, but not limited to, the warranties of fitness for a particular purpose and merchantability, which extends beyond the description of the chemicals on the face hereof, except that the material will meet our specifications at the time of delivery. Buyer's exclusive remedy and the Companies' sole liability hereunder shall be limited to refund of the purchase price of, or at the Companies' option the replacement of, all material that does not meet our specifications. The Companies shall not be liable otherwise or for incidental or consequential damages, including, but not limited to, the costs of handling. Sell, resale or replacement is conditioned on Buyer giving written notice to the Companies within thirty (30) days after arrival of the material at its destination. Failure of Buyer to give said notice within said forty (30) days shall constitute a waiver by Buyer of all claims hereunder with respect to said material.

Date: September 1, 2011



NORTH/SOUTH AMERICA

ENZO LIFE SCIENCES, INC.
10 Executive Blvd
Farmingdale, NY 11735
USA
T +1-800-942-0430
T +1-610-941-0430
F +1-610-941-9252
E info-usa@enzolifesciences.com

SWITZERLAND & REST OF EUROPE

ENZO LIFE SCIENCES AG
Industriestrasse 17, Postfach
CH-4415 Lausen
Switzerland
T +41(0) 61 926 89 89
F +41(0) 61 926 89 79
E info-ch@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

GERMANY

ENZO LIFE SCIENCES GMBH
Marie-Curie-Strasse 8
DE-79539 Lösslich
Germany
T +49(0) 7621 5580 526
Toll Free 0800 664 9578
F +49(0) 7621 5580 527
E info-de@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

BELUX

ENZO LIFE SCIENCES BVBA
Merkelweg 3
BE-2240 Zandhoven
Belgium
T +32(0) 3 466 04 20
F +32(0) 3 466 04 29
E info-be@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

UK & IRELAND

ENZO LIFE SCIENCES (UK) LTD,
Pylstone House
Mottord Court
Exeter EX2 8NL
UK
T 0845 601 1488 (UK customers)
T +44(0) 1392 835900 (from overseas)
F +44(0) 1392 835910
E info-uk@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

FRANCE

ENZO LIFE SCIENCES
c/o Corolab s.a.s
13, Avenue Albert Einstein
FR-69100 Villeurbanne
France
T +33 472 440 855
F +33 472 484 230
E info-fr@enzolifesciences.com
www.enzolifesciences.com

ALEXIS assay designs
BIOVOL Strassgen
www.enzolifesciences.com

Työssä käytetyt laitteet ja välineet:

- Ravistelukasvattaja: Heidolph, Unimax 1010
- Sentrifuugi: Hettich, Mikro 120
- Lämpöblokki: Eppendorf, Thermomixer comfort
- Mäntäpipetit: Biohit, Proline 0,5–10 µl, 100–1000 µl ja 1–5 ml