



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioalan koulutusohjelma

OPINNÄYTETYÖ

MAGNEETTIHELMIIN JA VASTA-AINEISIIN PERUSTUVAN NÄYTTEENKÄSITTELYN KEHITTÄMINEN MINIATYRISOIDUILLE ANALYYSILAITTEILLE

Työn tekijä: Niina Vähäkainu
Työn ohjaajat: Arja Miettinen-Oinonen
Tarja Nevanen

Työ hyväksytty: _____.____.2009

Arja Miettinen-Oinonen
yliopettaja



ALKULAUSE

Tämä opinnäyte tehtiin Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen, VTT:n, molekyyli diagnostiikan osastolla. Haluan kiittää Tarja Nevasta tästä mahdollisuudesta suorittaa työharjoittelu hänen tiimissään sekä kärsivällisestä ohjauksesta opinnäytetyön kanssa. Kiitos että sain olla mukana tutkimuksen huipulla ja oppia paljon uutta. Kiitokset kuuluvat myös Lotta Amundsenille työstä kapillaarielektroforeesin kanssa sekä Mikko Pakaselle avusta piisirujen kanssa. Haluan kiittää myös yliopettaja Arja Miettinen-Oinosta ohjauksesta koulun puolelta. Kiitos myös laboratorion henkilöstölle, erityisesti Armi Bomanille, käytännön neuvoista.

Helsingissä 1.12.2009

Niina Vähäkainu

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Niina Vähäkainu	
Työn nimi: Magneettihelmiin ja vasta-aineisiin perustuvan näytteenkäsittelyn kehittäminen miniatyrisoiduille analyysilaitteille	
Päivämäärä: 1.12.2009	Sivumäärä: 55 s. + 3 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioala	Suuntautumisvaihtoehto:
Ohjaava opettaja: FT Arja Miettinen-Oinonen	
Työn ohjaaja: FT Tarja Nevanen	
<p>Tässä opinnäytetyössä kehitettiin magneettihelmiin ja vasta-aineisiin perustuvaa näytteenkäsittelymenetelmää miniatyrisoiduille analyysilaitteille. Työssä keskityttiin tutkimaan lämpöön reagoivia nanokokoisia magneettipartikkeleita (TMLA) erilaisissa näytematriiseissa.</p> <p>Anti-foolihappovasta-ainefragmentti (Fab) tuotettiin <i>E. coli</i> RV308 -bakteerissa pienimuotoisena kahden litran kasvatuksena. Tuotettu vasta-aine puhdistettiin metalliaffiniteetikromatografisesti ja konjugoitiin biotiinin kanssa. Mallimolekyylillä foolihappo konjugoitiin alkalinen fosfataasi -entsyymin kanssa.</p> <p>Systeemin pystytyksessä etsittiin alkaliselle fosfataasille inhibiittori, NaH_2PO_4, vertailtiin anti-foolihappo- sekä anti-mykofenolihappovasta-aineita keskenään sekä TMLA-magneettihelmien määrän vaikutusta menetelmän toistettavuuteen. Päädyttiin jatkamaan kokeita anti-foolihappovasta-aineella ja käyttämään näytteissä 25 μl magneettihelmiä.</p> <p>Foolihappo-alkalinen fosfataasi -konjugaatin tarttumista vasta-ainekonjugoituihin TMLA-magneettihelmiin tutkittiin puskurista, kliinisistä matriiseista; seerumista, syljestä ja virtsasta sekä nestemäisistä elintarvikematriiseista. Tutkittiin myös pH:n ja proteiinien vaikutusta tarttumiseen, määritettiin sitoutumisen saantoa ja vertailtiin lämpöön reagoivia magneettihelmiä perinteisiin magneettihelmiin. Havaittiin, että tätä systeemiä voidaan käyttää foolihappo-AP:n määrittämiseen seerumista, virtsasta, kahvista ja teestä. Myös neutraloidut omenamehu ja punaviini soveltuivat matriiseiksi. Syljen viskositeetti esti foolihappo-AP:n määrittämistä ja siinä toistettavuus oli heikkoa. Myös maitoproteiini, kaseiini, häiritsi termoresponsiivisia magneettisia nanopartikkeleita tässä systeemissä.</p> <p>TMLA-helmiä testattiin myös näytteenkäsittelymenetelmänä kapillaarielektroforeesia varten sekä piisirulla.</p>	
Avainsanat: näytteenkäsittely, termoresponsiiviset magneettiset nanopartikkelit	

ABSTRACT

Name: Niina Vähäkainu	
Title: Development of Sample Preparation Methods Based on Magnetic Beads and Antibodies for Miniature Analysis Equipment.	
Date: 1.12.2009	Number of pages: 55 pp. + 3 attachments
Department: Laboratory Sciences	Study Programme:
Instructor: Arja Miettinen-Oinonen, Ph.D.	
Supervisor: Tarja Nevanen, Ph.D.	
<p>The aim of this study was to develop sample preparation methods based on magnetic beads and antibodies for miniature analysis equipment. The study concentrated on researching thermo-responsive magnetic nanoparticles (TMLA) in different sample matrixes. Also a recombinant antibody was produced in <i>Escherichia coli</i> and low molecular weight analytes were conjugated with protein.</p> <p>Production of anti-folic acid antibody fragment (Fab) was performed in <i>E. coli</i> RV308 in small scale. The antibody was purified with metal affinity chromatography and conjugated with biotin. Analyte folic acid was conjugated with alkaline phosphatase enzyme.</p> <p>The model system set-up included finding an inhibitor for alkaline phosphatase, NaH_2PO_4, comparing anti-mycophenolic acid antibody to anti-folic acid antibody and determining the influence of different amounts of TMLA magnetic beads on repeatability. Based on the test results, a decision was made to continue testing with anti-folic acid antibody and 25 μl of magnetic beads.</p> <p>The recovery of folic acid alkaline phosphatase conjugate was studied with TMLA beads from buffer, clinical matrixes; serum, saliva and urine, and from liquid food related sample matrixes. Recovery studies were also carried out and TMLA beads compared to traditional magnetic beads. In addition, the effects of pH and high protein concentration were examined.</p> <p>The tests showed that this system can be used to study folic acid AP from serum, urine, coffee and tea. Neutralized apple juice and red wine are suitable matrixes, as well. The viscosity of saliva led to a great deal of variability between parallels. The milk protein casein also disturbed TMLA beads in this system.</p> <p>TMLA-bead were also tested in silicon micro chip and as an off-line sample preparation method for capillary electrophoresis.</p>	
Keywords: sample preparation, thermo-responsive magnetic nanoparticles	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLINEN OSA	2
2.1	Vasta-aineet	2
2.1.1	<i>Ihmisen immuunipuolustusjärjestelmä</i>	2
2.1.2	<i>Vasta-aineiden rakenne</i>	3
2.1.3	<i>Vasta-aineiden funktiot ja valmistus</i>	4
2.1.4	<i>Rekombinanttivasta-aineet</i>	5
2.1.5	<i>Bakteerisoluiissa tuotettujen rekombinanttivasta-aineiden puhdistus</i>	6
2.1.6	<i>Rekombinanttivasta-aineiden immobilisointi</i>	7
2.2	Magneettihelmet	9
2.2.1	<i>Magneettiset helmet biomolekyylien kantajina</i>	9
2.2.2	<i>Olosuhteisiin reagoivat magneettiset nanopartikkelit</i>	9
2.3	Näytteenkäsittely ja vasta-aineiden sovellukset mikromittakaavan diagnostiikassa	10
3	KOKEELLINEN OSA	12
3.1	Työn tarkoitus	12
3.2	Vasta-aineiden tuotto ja puhdistus	12
3.2.1	<i>Anti-foolihappovasta-aineen tuotto</i>	12
3.2.2	<i>Anti-foolihappovasta-aineen puhdistus</i>	13
3.2.3	<i>Puhdistetun vasta-aineen pitoisuus ja karakterisointi</i>	14
3.2.4	<i>Anti-foolihappovasta-aineen jatkokäsittelyt</i>	15
3.3	Vasta-aineen biotinylointi	15
3.4	Mallimolekyyliproteiinin konjugaatin valmistus	16
3.5	Analyysisysteemin pystytys ja optimointi	17
3.5.1	<i>Alkalisen fosfataasin inhibiittori natriumdiveetyfosfaatille</i>	19
3.5.2	<i>Vasta-aineen affiniteetin vaikutus sitoutumisen saantoon</i>	19
3.5.3	<i>TMLA-magneettihelmien määrän vaikutus menetelmän toistettavuuteen</i>	21

3.6 Foolihappo-AP:n määrittäminen näytteestä TMLA-magneettihelmillä	21
3.6.1 Foolihappo-AP:n sitoutumisen saannon määrittäminen	21
3.6.2 Foolihappo-AP:n määrittäminen puskurista	22
3.6.3 Foolihappo-AP:n määrittäminen kliinisistä matriiseista	22
3.6.4 Foolihappo-AP:n määrittäminen elintarvikematriiseista	23
3.6.5 pH:n vaikutus haptteenin sitoutumisen saantoon elintarvikematriiseissa	23
3.6.6 Korkean proteiinipitoisuuden vaikutus TMLA-kokeeseen	23
3.6.7 Lämpöönreagoivien magneettihelmien vertailu Dynabeads- ja Mag@Trac -magneettihelmiin	24
3.6.8 Tilastollinen analyysi	25
3.7 Foolihapon määrittäminen kapillaarielektroforeesilla	25
3.8 TMLA-magneettihelmien käyttäytyminen piisirulla	26
4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	28
4.1 Vasta-aineen tuotto ja puhdistus	28
4.1.1 Anti-foolihappovasta-aineen tuotto	28
4.1.2 Tuotetun anti-foolihappovasta-aineen pitoisuus ja karakterisointi	29
4.1.3 Anti-foolihappovasta-aineen jatkokäsittelyt	31
4.2 Vasta-aineen biotinylointi	34
4.3 Mallimolekyyliproteiinin konjugaatin valmistus	35
4.4 Analyysisysteemin pystytys ja optimointi	37
4.4.1 Alkalisien fosfataasien inhibiittien natriumdivetyfosfaatille	37
4.4.2 Vasta-aineen affiniteetin vaikutus sitoutumisen saantoon	39
4.4.3 TMLA-magneettihelmien määrän vaikutus menetelmän toistettavuuteen	40
4.5 Foolihappo-AP:n määrittäminen näytteestä TMLA-magneettihelmillä	40
4.5.1 Foolihappo-AP:n sitoutumisen saannon määrittäminen	40
4.5.2 Foolihappo-AP:n määrittäminen puskurista	42
4.5.3 Foolihappo-AP:n määrittäminen kliinisistä matriiseista	43
4.5.4 Foolihappo-AP:n määrittäminen elintarvikematriiseista	44
4.5.5 pH:n vaikutus haptteenin sitoutumisen saantoon elintarvikematriiseissa	45
4.5.6 Korkean proteiinipitoisuuden vaikutus TMLA-kokeeseen	46
4.5.7 Lämpöönreagoivien magneettihelmien vertailu Dynabeads- ja Mag@Trac-magneettihelmiin	47
4.6 Foolihapon määrittäminen kapillaarielektroforeesilla	48
4.7 TMLA-magneettihelmien käyttäytyminen piisirulla	50
5 YHTEENVETO	52
VIITTELUETTELO	54
LIITTEET	
LIITE 1 Kokeissa käytetyt liuokset	
LIITE 2 Kokeiden mittaustulokset taulukoituina	
LIITE 3 Foolihapon spektri kapillaarielektroforeesissa	

1 JOHDANTO

Diagnostiikan yksi kehityskohteista on analyysilaitteiden *miniatyrisointi* eli koon pienentäminen, jolloin analyysilaitteista on mahdollista tehdä kannettavia paikalla (*in situ*) tehtävään diagnostiikkaan. Miniatyrisoitujen analyysilaitteiden hyötyjä ovat niiden tehokkuus ja nopeat analyysiajat sekä ekologisuus ja taloudellisuus ajoliuosten ja muiden reagenssien määrien pienentyessä. Miniatyrisoitujen analyysilaitteiden suurimmat haasteet liittyvät tällä hetkellä näytteenkäsittelyyn. Laitteisiin syötettävän näytteen määrä on hyvin pieni, ja se sisältää vain vähän analysoitavaa ainetta mutta runsaasti muita häiritseviä molekyylejä. Tästä syystä näytteen rikastus- ja puhdistusmenetelmille on tarvetta.

Opinnäytetyön tavoitteena on tutkia vasta markkinoille tulleiden lämpötilan muutoksiin reagoivien magneettisten nanopartikkeleiden ominaisuuksia ja soveltuvuutta näytteen esikäsittelyyn ennen analyysiä mikromittakaavassa. Työ on osa Teknologian kehittämiskeskuksen ja Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen, VTT:n, rahoittamaa suurempaa projektikonaisuutta ”*Development of low cost diagnostics*”, jossa kehitetään miniatyrisoituja diagnostisia mikrosiruja polymeerimateriaaleista edullisilla valmistustekniikoilla.

2 KIRJALLINEN OSA

2.1 Vasta-aineet

2.1.1 Ihmisen immuunipuolustusjärjestelmä

Ihmisen immuunipuolustusjärjestelmä jaetaan kahteen osaan, *luontaiseen* eli synnynnäiseen ja *adaptiiviseen* eli opittuun systeemiin. Synnynnäinen immuunipuolustusjärjestelmä torjuu kehoa lähinnä mikrobien hyökkäyksiltä ja toimii toistuvasti samoin keinoin. Se koostuu fyysisistä ja kemiallisista esteistä, fagosytoivista soluista ja NK-soluista, veren tulehdusta estävistä proteiineista kuten komplementista, sekä sytokiineista. [1, s. 3 - 5.]

Adaptiivinen immuunipuolustusjärjestelmä tunnistaa vieraita molekyyliä tai niiden osia, ja kykenee näin puolustamaan kehoa. Se myös muistaa aiemmin tunnistamansa vieraat mikrobit ja kykenee reagoimaan uuteen infektiin ensimmäistä nopeammin. Adaptiivinen immunitetti jaetaan *solvälitteiseen* ja *humoraaliseen* järjestelmään. Soluvälitteinen järjestelmä toimii T-solujen välityksellä, jotka auttavat tuhoamaan solunsisäisiä taudinaiheuttajia ja säätelevät kehon puolustusjärjestelmiä. Humoraalinen järjestelmä koostuu laajasta kirjosta erilaisia vasta-aineita, joita B-lymfosyytit tuottavat. [1, s. 6 - 7.]

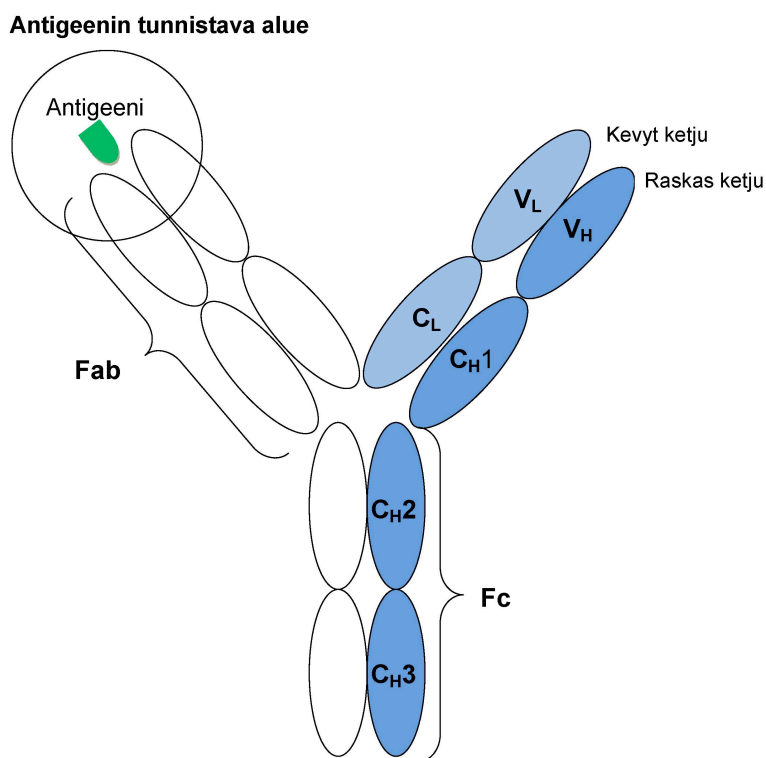
Antigeenit ovat molekyyliä, jotka saavat elimistössä aikaan immuunivasteen ja vasta-aineiden muodostumisen. Ne ovat useimmiten proteiineja, peptidejä tai polysakkarideja kehon ulkopuolisten mikro-organismien pinnoilla, soluseinissä tai flagelloissa. *Hapteeneiksi* kutsutaan molekyyliä, jotka eivät sellaisenaan aiheuta immuunivastetta, mutta kovalenttisesti kiinnitettyinä proteiiniin saavat aikaan vasta-aineiden muodostuksen. Hapteeneita ovat esimerkiksi pienet orgaaniset molekyylit, kuten tässä opinnäytetyössä käytetyt foolihappo ja mykofenolihappo.

Foolihappo on ihmiselle välttämätön B-vitamiineihin kuuluva aine, jonka suoloja, folaatteja, on muun muassa vihreissä vihanneksissa ja täysjyväviljassa. Foolihapon puutostila voi aiheuttaa erilaisia sairauksia, kuten neurologisia vaurioita sikiössä [2], ja siksi foolihapolla täydennetään useissa maissa elintarvikkeita kuten jauhoja [3]. Mykofenolihappoa käytetään immunosupres-

santtina vähentämään hyljintäreaktiota elinsiirtopotilaiden lääkityksessä. Sen on osoitettu minimoivan hyljintäreaktiota inhiboimalla tehokkaasti lymfossyyttien määrän kasvua, mutta osassa tutkimuksia sen on havaittu aiheuttavan akuutteja hylkimisreaktioita ja myrkytysoireita [4, s. 753]. Tässä työssä foolihappoa ja mykofenolihappoa käytetään mallimolekyyleinä vasta-aineisiin ja magneettihelmiin perustuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehityksessä.

2.1.2 Vasta-aineiden rakenne

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit rakentuvat symmetrisesti kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta polypeptidiketjusta. Y-muotoisessa rakenteessa rikkisillat yhdistävät kevytketjut raskasketjuihin sekä raskasketjut toisiinsa. Raskasketju koostuu yhdestä vaihtelevasta domeenista (V_H) sekä kolmesta vakiodomeenista (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), ja kevytketju koostuu yhdestä vaihtelevasta (V_L) ja yhdestä vakiodomeenista (C_L) (kuva 1). Domeeni on noin 100 aminohappoa käsittävä osa, jossa yksi rikkisilta stabiloi rakennetta. Kussakin vasta-aineen perusrakenteessa on kaksi antigeenin sitovaa aluetta. Vaikka kaikki vasta-aineet ovat rakentuneet samalla tavalla, niiden antigeeniä sitovat alueet vaihtelevat suuresti. [5, s. 17.]



Kuva 1. Immunoglobuliini G -vasta-aineen rakenne

Vasta-aineet luokitellaan niiden raskasketjun mukaan viiteen luokkaan: immunoglobuliini M (IgM), immunoglobuliini D (IgD), immunoglobuliini G (IgG), immunoglobuliini A (IgA) ja immunoglobuliini E (IgE). Eri luokkiin kuuluvilla vasta-aineilla on erilaisia tehtäviä elimistössä. Kehon vasta-aineista suurin osa on IgG-vasta-ainetta ja sillä on useita alaluokkia. IgM-vasta-aineet ovat ensimmäisiä immuunivasteen tuottamia vasta-aineita. Niiden affiniteetit ovat yleensä muihin vasta-aineisiin verrattuna heikkoja, mutta osittain tätä puutetta korvaa niiden esiintyminen pentameerinä, jossa on kymmenen antigeenin tunnistavaa aluetta. IgA esiintyy dimeerinä epiteelipinnoilla ja toimii pääasiassa neutralisoivana vasta-aineena. IgD, IgE ja IgG ovat monomeerejä eli pienimpiä vasta-aineista, ja siitä syystä ne kulkeutuvat helposti verestä kudoksiin. [5, s. 388.]

Vasta-aineilla on antigeenin sitomisen lisäksi muitakin rooleja immuunipuolustusjärjestelmässä, kuten komplementissa ja fagosytoivissa systeemeissä, jolloin ne ovat vuorovaikutuksessa muiden proteiinien kanssa. Vuorovaikutuksia voidaan vähentää pilkkomalla immunoglobuliini proteolyttisillä entsyymeillä pienemmiksi, vain antigeenin sitoviksi kappaleiksi. Papaiini halkaisee IgG-vasta-aineen disulfididisidoksen N-terminaalisen puolen muodostaen kaksi identtistä Fab-fragmenttia ja yhden Fc-fragmentin. Syntyneellä Fab-fragmentilla on samat antigeenin sitomisominaisuudet kuin kokonaisella vasta-aineella. [5, s. 106 - 107.]

Fab-fragmentti on kolmanneksen pienempi kuin kokonainen vasta-ainemolekyylä, ja siitä syystä se kykenee tunkeutumaan kudoksiin kokonaista vasta-ainemolekyylä helpommin. Tämä on lisännyt kiinnostusta vasta-ainefragmenttien käyttöön lääkinällisessä vasta-aineterapiassa. [6, s. 394.]

2.1.3 Vasta-aineiden funktiot ja valmistus

Vasta-aineilla on kolme tapaa suojella kehoa taudinaiheuttajilta. Ne voivat sitoutua patogeeneihin tai niiden muodostamiin toksiineihin ja neutraloida niiden haitallisen vaikutuksen. Vasta-aineiden sitoutuminen ei kuitenkaan estä solujen ulkopuolella jakautuvia bakteereita lisääntymästä. Toinen tapa tehdä taudinaiheuttaja vaarattomaksi on sitoutua niiden pinta-antigeeneihin ja näin houkutella *fagosyytit*, syöjäsolut paikalle. Fagosyytit tunnistavat vasta-aineen

vakiidomeenin bakteerin pinnalla, ja tämä käynnistää solun tuhoamisen. Vasta-aineiden kolmantena vaikutusmekanismina on aktivoida plasmaselujen muodostama komplementti, jonka päätehtävänä on vasta-aineiden tapaan pinnoittaa patogeeni fagosyyttien tunnistettavaksi. Vasta-aineet ovat spesifisiä tietyille antigeenille, mutta usein samankaltainen molekyyli aiheuttaa *ristiinreagointia* eli vasta-aine tunnistaa myös toisen molekyylin kuin mitä vastaan se on muodostunut. Sovelluksesta riippuen ristiinreagointi on haitta tai toivottava ilmiö.

Tutkimuskäyttöön voidaan valmistaa vasta-aineita immunisoimalla nisäkkäitä, kuten kaneja, antigeenillä ja tämän jälkeen keräämällä seerumiin tuottuneet polyklonaaliset vasta-aineet talteen. Nämä vasta-aineet tunnistavat eri kohtia, *epitoppeja*, vasta-aineen tunnistamia rakenteita, kyseisestä antigeenistä ja niillä on erilaisia affiniteetteja kohdeantigeeniä vastaan.

Monoklonaliset vasta-aineet ovat peräisin yhdestä hybridoomaselulinjasta, jolloin ne ovat keskenään samanlaisia affiniteetin ja spesifisyyden suhteen. Valmistettaessa monoklonalisia vasta-aineita nisäkäsi, kuten hiiri, immunisoidaan antigeenillä ja vasta-aineita tuottavat solut kerätään talteen pernasta. Solut fuusioidaan myeloomaselujen kanssa. Valmistetun hybridoomaselun tuottamat vasta-aineet ovat keskenään identtisiä, ja soluja voidaan kasvattaa soluviljelmässä tai sopivassa kohde-eläimessä.

2.1.4 Rekombinanttivasta-aineet

Rekombinanttiproteiinit ovat proteiineja, jotka on tuotettu kloonatusta geenistä. Halutun proteiinin DNA-sekvenssi monistetaan ja liitetään tuottovektoriin, plasmidiin, jonka avulla geeni viedään isäntäsoluun, jossa geeniä vastaavaa proteiinia voidaan tuottaa. Kloonausvaiheessa geeniin voidaan lisätä toiminnallisia koodaavia alueita, kuten esimerkiksi puhdistusta helpottavan affiniteettihännän koodaava DNA-pala.

Kloonattua rekombinanttiproteiinia voidaan tuottaa eri isäntäsoluissa. Rekombinanttivasta-aineita tuotetaan bakteereissa, hiivoissa, homeissa, kasvi-, hyönteis- tai eläinsoluissa. Yleisimmin tuotossa käytetään *Escherichia coli* -bakteeria sekä *Saccharomyces cerevisiae* - ja *Pichia Pastoris* -hiivoja. No-

peasti ja edullisissa elatusaineissa kasvavaa *Escherichia coli* -bakteeria käytetään paljon muun muassa siitä syystä, että sille on saatavilla suuri määrä erilaisia kloonausvektoreita.

Bakteerisoluiissa rekombinanttiproteiinien tuotto on nopeaa, helppoa ja halpaa. Proteiinit tuotetaan usein Gram-negatiivisessa bakteerissa olevaan, sisemmän ja ulomman soluseinän väliseen *periplasmiseen tilaan* sen suotuisten olosuhteiden vuoksi. Periplasmisen tilan etuina ovat proteaasien alhainen määrä ja hapettavat olosuhteet, joissa muodostuvat proteiinien oikean laskotumisen kannalta tärkeät disulfidisillat. Rekombinanttiproteiinit voidaan puhdistaa periplasmisesta tilasta muun muassa osmoottisella sokilla. Bakteerisolulla ei kuitenkaan ole endoplasmista kalvostoa eikä Golgin laitetta, jolloin eukaryoottiproteiinien post-translacionaaliset modifikaatiot, kuten glykosylaatio, jäävät muodostumatta. Rekombinanttivasta-ainefragmenteilla ei ole glykosylaatiokohtia, joten ne tuottuvat bakteerissa yleensä luonnollisena kaltaisina. [7, s. 445.]

Rekombinanttiproteiinin tuotto bakteerissa indusoidaan IPTG-reagenssilla, joka vaikuttaa *lac*-promootorisysteemiin. Tällä estetään proteiinin vuotaminen soluun enneaikaisesti, koska se usein vaikuttaa haitallisesti solujen kasvuun ja tällöin ei saavuteta suuria proteiintuottomääriä. Systeemiin kuuluva LacI-repressori kiinnittyy geenin *lac*-operoniin ja estää sen toiminnan, jolloin proteiinia ei muodostu. Kun IPTG lisätään, se sitoutuu aktiiviseen LacI-repressoriin ja irrottaa sen operonista. Irtoaminen käynnistää rekombinanttiproteiinin runsaan tuottumisen solussa. [7, s. 447.]

2.1.5 Bakteerisoluiissa tuotettujen rekombinanttivasta-aineiden puhdistus

Rekombinanttiproteiinien puhdistuksessa käytetään usein proteiiniin geenitasolla koodattua affiniteettihäntää, yleisimmin histidiinihäntää. Se on viidestä viiteentoista histidiini-aminohapon pituinen häntä, joka on kiinnitetty usein proteiinin aminohappoketjun amino (N)- tai karboksyyli- (C) -päähän. Affiniteettihännän avulla proteiini voidaan tehokkaasti puhdistaa tuoton jälkeen affiniteetikromatografian avulla. Affiniteettihännän lisäksi on raportoitu olevan sekä positiivisia vaikutuksia kohdeproteiiniin, kuten proteiinisäannon kasvaminen ja liukenevuuden lisääntyminen, että myös negatiivisia, kuten

konformaation muuttuminen ja toiminnallisuuden väheneminen, riippuen histidiinihännän kiinnityskohdan vaikutuksesta. [8, s. 1 - 2.]

Histidiinihännälliset rekombinanttiproteiinit puhdistetaan metallikelaattiin perustuvalla menetelmällä, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC). Metallionit on kiinnitetty tiukasti sopiviin kelatoija-ligandeihin, joista yleisimpiä ovat iminodiasetaatti (IDA), nitrilotriasettaatti (NTA) ja tris(karboksimetyyli)etyleenidiamiini (TED). Metalleista parhaiten kelaatteihin kiinnittyvät Fe^{2+} -, Co^{2+} -, Ni^{2+} -, Cu^{2+} - ja Zn^{2+} -ionit, mutta myös Al^{3+} - ja Fe^{3+} -ioneita käytetään. Proteiinin histidiinihäntä tarttuu puoliksi kelatoituun metalliin. Proteiini voidaan eluoida pylväästä alentamalla pH:ta, jolloin histidiinit protonisoituvat. Eluointiin voidaan käyttää myös kilpailevaa kompleksinmuodostajaa, kuten imidatsolia tai EDTA:a, joka sitoutuu metalliin lujemmin kuin histidiinit ja siten syrjäyttää proteiinin. Etuna IMAC-kromatografiassa ovat miedot eluutio-olosuhteet, jotka eivät vaikuta proteiiniin haitallisesti. [9.]

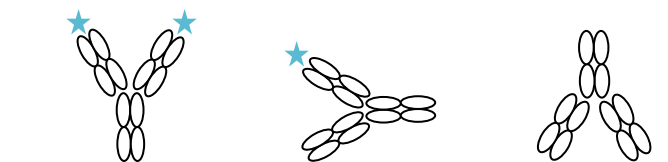
2.1.6 Rekombinanttivasta-aineiden immobilisointi

Vasta-aineita kiinnitetään eli immobilisoidaan pinnoille erilaisissa immunokokeissa, kuten microarray- ja ELISA-testissä (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Tässä opinnäytetyössä immobilisoitiin biotiinin avulla anti-foolihappovasta-aine avidiiniproteiinilla pinnoitettujen magneettihelmien pinnalle.

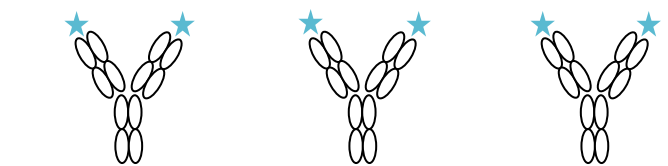
Rekombinanttivasta-aineita voidaan immobilisoida pinnoille satunnaisesti tai *orientoidusti* eli suunnatusti affiniteettihännän tai biotiinimolekyylin avulla. Satunnaisessa immobilisaatiossa vasta-ainetta ei suunnata, vaan se voi kiinnittyä pintaan eri kohdista vasta-ainemolekyyliä (kuva 2 a). Tämä saadaan aikaan esimerkiksi hydrofobisten alueiden interaktioilla pinnan kanssa tai kovalenttisesti kiinnittämällä ne pintaan. Orientoidussa immobilisaatiossa vasta-aine kiinnitetään pintaan esimerkiksi affiniteettihännän tai biotiinin avulla (kuva 2 b). Affiniteettihäntä, kuten histidiinihäntä, koodataan geeniin ennen vasta-aineen tuottamista, ja tällöin jokaisessa vasta-ainemolekyylissä häntä on kiinni samassa kohdassa. Jokainen vasta-aine kiinnittyy pintaan samansuuntaisesti affiniteettihännän avulla. Jos immobilisointi on satunnaista, saat-

taa vasta-aineen antigeenin tunnistavalle alueelle muodostua steerinen este, eivätkä kaikki vasta-aineet pysty sitomaan antigeeniä. Orientoidulla immobilisaatiolla saadaan enemmän aktiivisesti antigeeniä sitovia vasta-aineita kiinnitettyä pintaan. Immobilisointitapa vaikuttaa muun muassa kokeen herkkyyteen, detektorajaan ja dynaamiseen alueeseen. [10.]

a. Satunnainen



b. Orientoitu



Kuva 2. Vasta-aineiden immobilisointi pintaan a) satunnaisesti b) orientoidusti. Tähti kuvaa sitoutunutta antigeeniä.

Biotiini, eli vitamiini H, on vesiliukoinen orgaaninen molekyyli, joka sitoutuu tiukasti avidiiniproteiiniin, streptavidiniin (53 kD) ja näiden johdannaisiin. Avidiini-biotiini -sidoksista on vahvin tunnetuista proteiini-ligandi -sidoksista ja sen avulla voidaan kiinnittää biomolekyyliä avidiinikiinnitettyihin pintoihin, kuten nanopartikkeleihin.

Biotiini voidaan kiinnittää proteiiniin tai muuhun biomolekyyliin käyttämällä biotiinin johdannaisia, joissa olevan ylimääräisen reaktiivisen ryhmän avulla ne muodostavat kovalenttisen sidoksen kohteensa kanssa. Biotiinin johdannaisia ovat esimerkiksi biotiinin sukkinimidyyliesterit, jotka kiinnittyvät primääri-amiineihin lysiinitähteissä ja N-terminuksessa; biotiinimaleimidit, jotka reagoivat tioli-ryhmien kanssa, sekä valoon reagoivat biotiiniyhdisteet, jotka leimaavat biomolekyyliä epäspesifisesti tietyn aallonpituuden omaavassa valossa. [11, s. 136.]

2.2 Magneettihelmet

2.2.1 Magneettiset helmet biomolekyylien kantajina

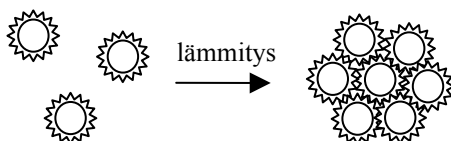
Magneettisten nano- ja mikrohelmien käyttö on kasvanut biologian, bioteknologian ja lääketieteen alalla. Magneettihelmien käyttö bakteerisolujen erotuksessa on jo käytössä oleva tekniikka [12; 13], ja sovelluksia diagnostiikkaan ja terapiaan on kehitteillä [14].

Magneettihelmet ovat pyöreitä, rautaoksidia sisältäviä partikkeleita, joiden koko voi vaihdella nanometreistä useisiin satoihin mikrometreihin. Rautaoksiditytimen ympärillä olevaan hydrofobiseen polymeeriin voidaan kovalenttisesti sitoa molekyyliä, kuten proteiineja.

Suurin osa markkinoilla olevista magneettihelmistä on superparamagneettisia, eli magneettisuutta esiintyy ainoastaan ulkoisen magneettikentän vaikutuksessa. Magneettikentän puuttuessa helmet eivät tartu toisiinsa, vaan pysyvät pääasiassa liuoksessa. Jotta magneettihelmet käyttäytyisivät tasalaatuisesti magneettikentässä, käytetään keskenään samankokoisia ja -muotoisia helmiä.

2.2.2 Olosuhteisiin reagoivat magneettiset nanopartikkelit

Magneettisen rautaytimen ympärillä oleva polymeeri voidaan valita siten, että helmien ominaisuudet muuttuvat olosuhteiden, kuten lämpötilan, pH:n tai ionivahvuuden mukaan. Nanokokoisten magneettihelmien pienestä koosta johtuen niillä on paljon pinta-alaa, mutta niiden kerääminen magneettiin on hankalaa. Lämpötilan muuttuessa *termoresponsiiviset*, lämpöön reagoivat, magneettiset nanopartikkelit muodostavat toistensa kanssa ryppäitä, jotka ovat tarpeeksi suuria tarttuakseen magneettiin (kuva 3). Heikosta magneettisuudesta johtuen ryppäitä ei kuitenkaan voida kerätä tavallisella magneetilla, vaan keräämiseen käytetään tavallista magneettia vahvempaa, kiinteätä neodymium-magneettia.



Kuva 3. Termoresponsiiviset magneettiset nanopartikkelit muodostavat lämmön vaikutuksesta ryppäitä.

2.3 Näytteenkäsittely ja vasta-aineiden sovellukset mikromittakaavan diagnostiikassa

Analyysimenetelmistä on jo pitkään pyritty tekemään automatisoituja analyysien helpottamiseksi. Mikrofluidistisissa järjestelmissä nesteitä liikutellaan kymmenien mikrometriä kokoisissa keskenään risteävissä kanavissa, usein sähköä tai painetta avulla. Kun automatisointi siirtyy mikromittakaavan järjestelmiin, materiaalien kulutus laskee mikro-, nano- tai jopa pikolitroihin ja analyysiajat nopeutuvat minuuteista sekunteihin. [15, s. 233 - 234.]

Tavoitteena on sovittaa mikrofluidistisille siruille monia tehtäviä, muiden muassa näytteen esikäsittelyä analyysia varten. Kliiniset näytematriisit, kuten kokoveri, seerumi, plasma, sylki ja virtsa, ovat kuitenkin hyvin monimutkaisia, ja näytteenkäsittelyn yhdistäminen onkin osoittautunut haastavaksi mikromittakaavan siruille. Diagnostiikkasysteemin suunnittelu ja toteuttaminen sirulla on monivaiheinen prosessi, joka alkaa diagnostisten molekyylien suunnittelulla, valmistuksella ja laadun analysoinnilla. Seuraavassa vaiheessa siru ja muut analyysiin vaadittavat komponentit valmistetaan. Näytteen esikäsittelyiden jälkeen suoritetaan analyysi sirulla ja käsitellään siitä saatu data. Tämän jälkeen systeemi voidaan muuntaa ja optimoida tuotteeksi esimerkiksi kliinisten näytteiden analysointia varten. Näytteenkäsittely onkin datankäsittelyn ohella avaintekijä mikromittakaavan analyysijärjestelmien kehityksessä [16, s. 468; 17, s. 56]. Kehityksestä huolimatta on edelleen usein käytännöllisempää suorittaa osa näytteen esikäsittelystä mikrosirun ulkopuolella, mikä edellyttää laboratorio-olosuhteita ja osaavaa henkilökuntaa. Diagnostisten ja analyttisten mikrosirujen kehityksessä tavoitteena on systeemi, joka on helppokäyttöinen, toistettava ja herkkä, jotta analyysi voidaan luotettavasti suorittaa laboratorion ulkopuolella lähellä potilasta.

Mikromittakaavan diagnostiikkasiruihin vasta-aineet ovat ei-luonnollisessa ympäristössä. Rekombinanttivasta-aineiden muokkauksella voidaan vasta-aineiden ominaisuuksia ohjata haluttuun suuntaan. Spesifisyyttä voidaan lisätä ja samalla ristiinreagoitua vähentää, affiniteettia parantaa, lisätä stabiiliisuutta erilaisissa olosuhteissa sekä leimata tai immobilisoida rekombinanttivasta-aine halutulla tavalla. [18; 19.]

Vasta-aineita mikrosiruilla käytetään liukoisessa muodossa muun muassa sitomaan analyyttiä immunotesteissä [20]. Immobilisoituja vasta-aineita hyödyntäviä mikromittakaavan testityyppejä on useita. Vasta-aineesta voidaan valmistaa affiniteettimatriisi rikastukseen tai se voidaan immobilisoida pienelle tarkoin määrätyle alueelle kuten mikroarrayssa. Vasta-aineet ovat eniten käytetty sitojaproteiiniryhmä diagnostiikassa, ja siksi on luonnollista että niitä käytetään myös miniatyrisoiduissa diagnostisissa systeemeissä.

3 KOKEELLINEN OSA

Työssä käytettyjen liuosten koostumukset liitteessä 1.

3.1 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia uusien, äskettäin markkinoille tulleiden termoresponsiivisten magneettisten nanopartikkeleiden soveltuvuutta näytteen esikäsitteilyyn mikromittakaavan diagnostiikassa. Työssä tuotettiin vasta-ainefragmentteja *Escherichia coli* -bakteerissa ja puhdistettiin ne metallaaffiniteettikromatografisesti. Lisäksi valmistettiin mallimolekyylistä, foolihaposta, proteiinikonjugaatti. Työssä myös verrattiin kahden mallivasta-aineen sitomiskapasiteetteja toisiinsa, tutkittiin saantoa puskurista ja magneettihelminen käyttäytymistä eri näytematriiseissa, sekä pH:n vaikutusta sitoutumiseen ja systeemin toistettavuutta.

3.2 Vasta-aineiden tuotto ja puhdistus

3.2.1 Anti-foolihappovasta-aineen tuotto

Anti-foolihappovasta-aineen geeni, joka sisälsi kuutta histidiiniä vastaavan geenialueen, oli kloonattu aiemmin pKKTac-tuottovektoriin ja transformoitu *Escherichia coli* -bakteerin tuottokantaan RV308 (ATCC 31608). Tässä työssä his-hännällistä anti-foolihappovasta-ainefragmenttia (Fab) tuotettiin *Escherichia coli* RV308 -bakteerissa. Bakteereita kasvatettiin 50 ml:n tilavuudessa (50 ml LB, 1 w/v-% glukoosi, 0.1 mg/ml ampicilliini (AMP) etanolissa) + 37 °C, 220 rpm sekoituksessa yön yli, jonka jälkeen se nuorennettiin 1:50 TB-kasvatusliuokseen 2 litran kasvatuksiksi (0.1 mg/ml AMP, 5.5 mM glukoosi) yhteensä kuudessa erässä. Kasvatusta jatkettiin + 30 °C 220 rpm sekoituksessa. Kasvua seurattiin mittaamalla kasvuliuoksen optista tiheyttä spektrofotometrisesti aallonpituudella 600 nm. Kun kasvu oli saavuttanut huippunsa 6 tunnin 30 minuutin kuluttua, vasta-aineen tuotto indusoitiin IPTG:llä (loppukonsentraatio 1 mM). Samalla lisättiin ampicilliinia (loppukonsentraatio 0.1 mg/ml). Vasta-aineen tuottoa jatkettiin yön yli.

Tuottoliuos sentrifugoitiin 5000 rpm 15 minuuttia solujen poistamiseksi ja jäljelle jäänyt liuos eli supernatantti DNAasi-käsiteltiin (3 mg *DNase I* (Roche, cat# 10932100), 3 ml 1 M MgCl₂ per 500 ml supernatanttia), jotta DNA:n runsas määrä ei häiritsisi puhdistusta. DNA:ta vapautuu supernatanttiin solujen kasvatuksessa, kun osa soluista hajoaa. DNAasi-entsyymien annettiin vaikuttaa + 37 °C välillä käänneellen 1 h. DNAasi-käsittelyn jälkeen supernatantti sentrifugoitiin uudelleen 8000 rpm 15 minuuttia ja suodatettiin Whatman (GF/C 110 mm) -lasikuitusuodattimella (cat # 1822110).

Vasta-ainetuotto analysoitiin Western blot -immunomäärityksellä kasvatusliuoksesta. Kontrollina käytettiin puhdistettua anti-foolihappovasta-ainetta (Fab) konsentraatioissa 1, 4, 6.5 ja 13 mg/l, jotka vastaavat tuottotasoja heikosta erinomaiseen. Sentrifugoituun supernatanttiin (15 µl) lisättiin 5 µl 4 x LSB-näytepuskuria. β-merkaptoetanolin puuttuessa näytepuskurista nähdään, ovatko disulfidisillat muodostuneet Fab-fragmentin kevyt- ja raskasketjun väliin. 15 % proteiinigeelien ajopuskurina käytettiin 250 ml 1 x Running Buffer -puskuria (0.1 % SDS). Western blot tehtiin Trans-Blot Transfer Medium -kalvolle (0.2 µm, Biorad, cat# 162-0112) 100 voltilla 1 h. Blottauksen jälkeen kalvo pestiin kolme kertaa TBST-puskurilla. Detektio-vasta-aineena käytettiin Goat Anti-Human IgG F(ab)₂ Alkaline Phosphatase Conjugated -vasta-ainetta (Rockland, cat# 709-1518), jonka annettiin tarttua kalvolle siirrettyyn vasta-aineeseen tunnin ajan. Tartutuksen jälkeen kalvo pestiin kolme kertaa TBST-puskurilla ja sen jälkeen kalvon värjäykseen käytettiin väriseosta, jossa oli 66 µl NBT, 33 µl BCIP ja 10 ml AP-puskuria. Värjättiin viisi minuuttia, jonka jälkeen värireaktio pysäytettiin tislatulla vedellä ja kalvo kuivattiin imupaperin välissä.

3.2.2 *Anti-foolihappovasta-aineen puhdistus*

100 ml *Chelating Sepharose Fast Flow* -geeliä (Ge Healthcare, cat# 17-0575-02) valmisteltiin poistamalla etanoli ja pesemällä se kolme kertaa tislatulla vedellä. Lisättiin 50 ml 200 mM nikkelikloridia ja tartutettiin kaksi tuntia huoneenlämmössä välillä sekoittaen. Tarttumaton nikkeli pestiin pois tislatulla vedellä.

Supernatantti laimennettiin 1:2 kaksinkertaisella tartutuspuskurilla (liite 1). Yhteen litraan laimennettua supernatanttia lisättiin 5 ml Ni²⁺-valmisteltua Sepharose -geeliä. Histidiinihännälliset vasta-ainefragmentit tartutettiin metalliaffiniteettimatriisiin pyöräjässä + 4 °C yön yli.

Pulloja seisotettiin noin 3 tuntia + 4 °C, jolloin geeli laskeutui pohjalle ja suurin osa supernatantista voitiin kaataa päältä pois. Loput pakattiin Bio-Radin lasipylvääseen (halkaisija 30 mm). Supernatantti valutettiin ulos (= effluentti). Geelimatriisia kertyi pylvääseen noin 1,5 cm. Geeli pestiin pesupuskureilla (liite 1), joissa oli 1 mM, 10 mM ja 25 mM imidatsolia. Pesut kerättiin fraktioihin 2 x 50 ml, 3 x 25 ml, 2 x 25 ml.

Histidiinihännällinen vasta-aine eluoiitiin kullakin eluointiliuoksella (50, 75, 100, 200 ja 500 mM imidatsolia peruspuskurissa, liite 1) aloittaen laimeimmasta. Eluoinnit kerättiin kukin kahdessa 5 ml:n fraktiossa.

3.2.3 Puhdistetun vasta-aineen pitoisuus ja karakterisointi

Proteiinin läsnäolo fraktioissa haarukoitiin alustavasti *BCA Protein Assay* -kitillä (Thermo Scientific, cat# 23225) ilman standardisuoraa.

BCA-määrityksen perusteella tehtiin valituille fraktioille Western blot- ja SDS-PAGE -ajot.

Puhdistuksen onnistumisen ja tartutuksen tehokkuuden seuraamiseksi Western blot ajettiin yhden pesu- ja viiden eluutiofraktion lisäksi laimentamattomasta ja konsentroimattomasta supernatantinäytteestä, effluentista ja puhdistetusta anti-foolihappovasta-aine (Fab) -kontrollista (200 ng). Latauspuskurina käytettiin 4 x LSB -latauspuskuria ja detektiovasta-aineena *Goat Anti-Human IgG F(ab)₂ Alkaline Phosphatase Conjugated* (Rockland) -vastaainetta.

Fraktioiden puhtauden määrittämiseksi ajettiin SDS-PAGE kolmesta pesu- ja viidestä eluutiofraktiosta. Kontrollina käytettiin puhdistettua anti-foolihappo-vasta-ainetta (Fab, 1 µg). Ennen värjäystä geeli pestiin kolme kertaa vedellä 10 minuuttia kerrallaan. Värjäys tehtiin *Page Blue Protein Staining Solution* -väriaineella (Fermentas, cat# R0571) 60 minuuttia, jonka jälkeen pestiin yli-

ylimääräinen väri pois vedellä. Geeli kuivattiin 10 % glyserolissa *Gel Drying Film* (25 x 28 cm, Promega, cat# V713B) -kalvojen väliin.

3.2.4 *Anti-foolihappovasta-aineen jatkokäsittelyt*

Fraktiot jaettiin kahteen ryhmään niiden puhtauden perusteella ja yhdistettiin. Korkean imidatsolikonsentraation poistamiseksi proteiinierät dialysoitiin (Medicell International Ltd, 12-14000 Da, cat# DTV12000.10.000) 5 litrassa 1 x PBS-puskuria + 4 °C:ssa yön yli. Dialyysissa imidatsolipitoisuus laimentui laskennallisesti 100-kertaisesti (< 2,5 mM). Proteiinierien puhtautta tarkasteltiin SDS-PAGE -geeleillä, joissa ajettiin laimennossarjat puhtaasta anti-foolihappovasta-aineesta (0,5 µg, 1 µg ja 5 µg) sekä molemmista proteiinieristä laimentamattomana sekä laimennoksilla 1:2 ja 1:3. Toinen geeleistä ajettiin 4xLSB -latauspuskurilla ilman β-merkaptotetanolia, jotta nähtäisiin kokonainen Fab-fragmentti ja mahdollisesti liuoksessa olevien hajooneiden fragmenttien määrä, sekä toinen geeleistä latauspuskurilla, johon oli lisätty hapettavaa β-merkaptotetanolia.

Proteiinierät konsentroidtiin *Amicon Ultra -15, Ultracel -10k* (Millipore, cat# UFC901024) -konsentroitintiputkilla.

Proteiinierien konsentraatiot määritettiin spektrofotometrisesti mittaamalla niiden absorbanssi aallonpituudella 280 nm ja laskemalla konsentraatio Lambert Beerin lailla käyttäen hyväksi anti-foolihappovasta-aineen (Fab) ekstinktiokerrointa ja moolimassaa. Nämä määritettiin aminohapposekvenssistä *Peptide Property Calculator* -verkkolaskurin [21] avulla.

3.3 **Vasta-aineen biotinylointi**

Immobilisointia varten tuotettu anti-foolihappovasta-aine konjugoitiin biotiinin kanssa, eli biotinyloitiin. Vasta-aineliuos konsentroidtiin pitoisuuteen 2 mg/ml *Amicon Ultra -15, Ultracel -10k* (Millipore, cat# UFC901024) -konsentroitintiputkella. 1 mg sulfo-NHS-LC-biotiinia (Pierce, cat# 21336) liuotettiin 1 millilitraan tislattua vettä ja tätä lisättiin proteiiniliuokseen 74 µl. Inkuboitiin 2 tuntia huoneen lämmössä.

Proteiiniliuoksen vapaa biotiini poistettiin ja puskuri vaihdettiin PBS-puskuriksi geelisuodatuksella *EconoPac 10 DG* -pylväällä (Bio-Rad, cat# 732-2010). Pylväästä eluoitujen fraktioiden proteiinipitoisuus määritettiin ensin BCA-määrityksellä ja sen perusteella valittiin yhdistettävät fraktiot. Erien proteiinikonsentraatiot määritettiin mittaamalla absorbanssi spektrofotometrisesti aallonpituudella 280 nm ja laskemalla konsentraatio Lambert Beerin lailla käyttäen hyväksi anti-foolihappovasta-aineen (Fab) ekstinktiokerrointa ja moolimassaa (kohta 3.2.4).

Biotinyloinnin onnistuminen tarkastettiin ELISA-määrityksellä. Tartutettiin biotinyloitu anti-foolihappovasta-aine kahtena konsentraationa (300 ja 100 ng / 100 µl) ja kahtena rinnakkaisena kaupallisen StreptaWell-levyn kuoppiin (Roche, *StreptaWell High Bind*, cat# 11645692001) 15 minuuttia ravistelussa huoneenlämmössä. Kontrolleina käytettiin kahta konsentraatiota (300 ja 100 ng / 100 µl) anti-mykofenolihappovasta-ainetta (MPA-C1) ja nollakontrollina kuoppia, joihin ei tartutettu vasta-ainetta lainkaan.

Vasta-ainetartutuksen ja pesujen jälkeen lisättiin foolihappo-AP ja MPA-AP -antigeenit (300 ng /100 µl) ja inkuboitiin 1 tunti ravistelussa huoneenlämmössä. Pesujen jälkeen lisättiin *p-NPP* -substraatti (4-Nitrophenyl Phosphate Disodium Salt Hexahydrate, Sigma-Aldrich, cat# N4645) (100 µl, 2 mg/ml) dietanolamiini-MgCl₂-puskurissa (Reagen, cat# 170057) ja mitattiin absorbanssit aallonpituudella 405 nm 60 minuutin kuluttua.

3.4 Mallimolekyyliproteiinin konjugaatin valmistus

Foolihappo-pienmolekyyliproteiini konjugoitiin alkalinen fosfataasi -entsyymin (AP) kanssa. 17 mg *alkalista fosfataasia* (Sigma-Aldrich, cat# 5931) liuotettiin 1 ml:aan tislattua vettä ja vaihdettiin puskuri PBS:aan *Econopac* -pylväällä (Bio-Rad, cat# 732-2010). Pylväs valmistettiin ohjeen mukaan, näytteen lisäyksen jälkeen lisättiin 2 ml PBS-puskuria ja AP eluoi 150 µl:n fraktiossa.

Fraktioista tehtiin BCA-proteiinipitoisuusmääritys, jonka perusteella valittiin eniten alkalista fosfataasia sisältävät fraktiot ja yhdistettiin ne.

5.5 mg foolihappoa (Sigma-Aldric, cat# F7876) liuotettiin 200 µl:aan DMSO:ta. Foolihappo aktivoitiin *n*-hydroksysukkinimidillä, s-NHS (Pierce, Cat# 24500) ja vesiliukoisella karbodiimidillä, EDC (Pierce, cat# 22980). 7.06 mg S-NHS:a ja 6.23 mg EDC:a liuotettiin kukin 25 µl:aan tislattua vettä. Aktivointi teki foolihaposta reaktiivisen, ja se saatiin liitettävä kantajaproteiinin pinnalla oleviin lysiiniaminohappoihin miedoissa olosuhteissa, jotka eivät vaikuttaneet haitallisesti entsyymiin.

Foolihappoon lisättiin vuorotellen EDC:a ja s-NHS:a 1 µl:n erissä molempia yhteensä 10 µl. Sekoitettiin kaksi minuuttia.

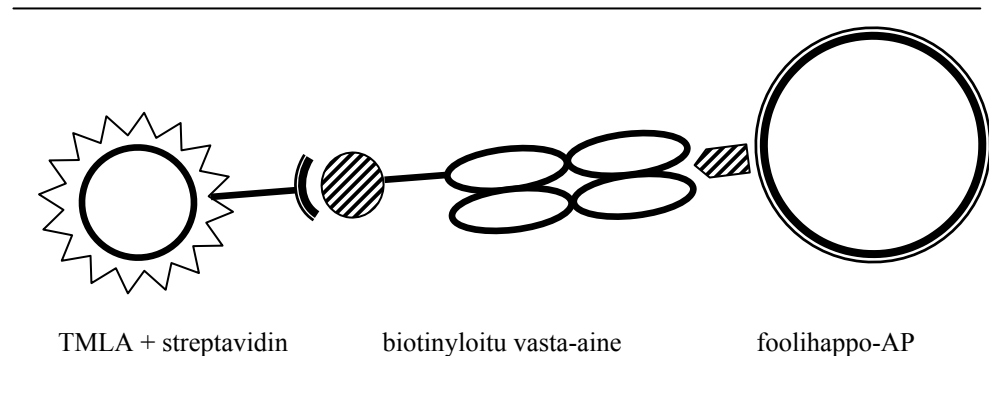
Aktivoitua hapteenia lisättiin 2 µl:n erissä yhteensä 10 µl yhteen milligrammaan alkalista fosfataasia (200 µl:ssa). Sekoitettiin lisäyksen välissä ja sekoitusta jatkettiin 15 minuuttia huoneenlämmössä ja yön yli + 4 °C.

Foolihappo-AP puhdistettiin seoksesta *Nap-5 Column* -kolonnilla (Illustra, Sephadex G-25 DNA Grade, cat# 17-0853-01). Pylväs tasapainotettiin 10 ml:lla TBS-puskuria. 250 µl näytettä eluoiitiin 100 µl:n fraktioissa TBS-puskurilla. Fraktioista tehtiin BCA-määritys konsentraation määrittämiseksi. Eniten konjugaattia sisältäneet fraktiot yhdistettiin ja tästä tehtiin uusi BCA-määritys lopullisen konsentraation määrittämiseksi. Standardina käytettiin alkalista fosfataasia. BCA-määritystä käytettiin, koska yksi foolihapon absorptiomaksimeista UV-alueella on 283 nm [22, s. 715], mikä häiritsee proteiinin spektrofotometrillä konsentraatiomääritystä aallonpituudella 280 nm.

3.5 Analyysisysteemin pystytys ja optimointi

Työn tarkoituksena oli tartuttaa magneettisiin partikkeleihin kiinnitettyyn vasta-aineeseen näytteessä oleva antigeeni ja detektoida sen määrä. Biotinyloitu vasta-aine kiinnitettiin streptavidini-biotiini -sidoksella kaupallisiin, 100 nm halkaisijaltaan oleviin streptavidini-konjugoituihin *termoresponsiivisiin magneettisiin nanopartikkeleihin* (TMLA) inkuboimalla huoneenlämmössä. Kiinnittymätön vasta-aine pestiin pois lämmittämällä näytettä lämpötilaan + 42 °C, jolloin magneettiset nanohelmet muodostivat ryppäitä ja ne voitiin kerätä magneettiin ja pipetoida liuos päältä pois. Partikkelit suspensioitiin kylmään puskuriiin, jolloin magneettiset ryppäät hajosivat ja nanopartik-

kelit suspensoituivat liuokseen. Alkalinen fosfataasi -entsyymiin kiinnitettyä hapteenia tartutettiin huoneenlämmössä helmien vasta-aineeseen. Kiinnittymätön antigeeni pestiin pois kuten edellä ja kiinnittyneen antigeenin määrä detektoitiin alkaliselle fosfataasille spesifillä substraatilla, joka muodosti keltaisen värin. Kuvassa 4 on piirroksena havainnollistettu foolihappo-AP -kokeen molekyylien kiinnittyminen toisiinsa.



Kuva 4. Kaavakuva systeemistä, missä foolihappo-AP tarttuu vasta-ainekonjugoituihin TMLA-nanopartikkeleihin, ei mittakaavassa.

Substraatin värinmuodostus loppui kun se pipetoitiin pois magneettihelmistä kuoppalevyille mittausta varten. Alkalisesta fosfataasista tehdyn standardisuoran kohdalla värinmuodostus jatkui vielä kuoppalevyllä. Tämän aikavälin aiheuttama vääristys haluttiin ehkäistä löytämällä reagenssi, jolla AP-entsyymien tuottaman värin kehitys voitaisiin pysäyttää kuoppalevyllä. Lisäksi AP-entsyymien värireaktio oli hyvin nopea ja laitteen mittausrajat tulivat nopeasti vastaan. Alkalinen fosfataasi irrottaa fosfaatin substraatista, jolloin muodostuu värireaktio. Mitä enemmän fosfaattia irtoaa, sitä voimakkaampi väri muodostuu. Entsyymien toiminta inhiboituu, kun liuoksessa on läsnä runsas määrä hajoamistuotetta ja siksi inhibitiotestejä tehtiin fosfaattipuskureilla.

Valmistaja Magnabeat Inc. suositteli tartuttamaan 50 µl:aan *Therma-Max LA-Avidin* (TMLA, cat# TML021) -nanohelmiä 10 µg biotinyloitua vasta-ainetta. Tätä suhdetta käytettiin oletuksena useimmissa TMLA-magneettihelmikokeissa.

3.5.1 Alkalisen fosfataasin inhibitio natriumdivetyfosfaatille

Alkalisen fosfataasin inhibitiota NaH_2PO_4 -puskurille tutkittiin. Alkalisesta fosfataasista tehtiin kuusi rinnakkaista ($2 \mu\text{g}$ $50 \mu\text{l}$:ssa PBS-puskuria). Lisättiin $200 \mu\text{l}$ 1 mg/ml p-NPP -substraattia (Sigma-Aldrich, cat# N4645) dietanolamiini- MgCl_2 -puskurissa (Reagena, cat# 170057) ja inkuboitiin 1 min. Viiteen putkeen lisättiin $100 \mu\text{l}$ NaH_2PO_4 -inhibiittoria konsentraatioissa 0.05, 0.063, 0.1, 0.25 ja 0.5 M. Kuudenteen putkeen lisättiin $100 \mu\text{l}$ tislattua vettä. Sekoitettiin ja pipetoitiin kuoppalevyille. Mitattiin absorbanssi aallonpituudella 405 nm aikapisteissä 5, 7, 9 ja 11 min.

Natriumdivetyfosfaatin inhibition käytettävyys lämpöön reagoivien magneettisten nanopartikkeleiden kanssa varmistettiin. $25 \mu\text{l}$:aan ja $10 \mu\text{l}$:aan TMLA-magneettihelmiä tartutettiin $5 \mu\text{g}$ ja $2 \mu\text{g}$ biotinyloitua anti-foolihappovasta-ainetta (Fab) 1 % BSA-liuoksessa (*Bovine Serum Albumin*, Sigma, cat# A8022) 15 minuuttia käännessä huoneenlämmössä. Tartutuksen jälkeen tarttumaton vasta-aine pestiin pois kolme kertaa $70 \mu\text{l}$:lla TBS-puskuria.

$5 \mu\text{g} / 2 \mu\text{g}$ foolihappo-AP -konjugaattia tartutettiin vasta-ainekonjugoituihin TMLA-nanopartikkeleihin 75 minuuttia käännessä huoneenlämmössä. Tarttumaton foolihappo-AP pestiin pois kolme kertaa $50 \mu\text{l}$:lla TBS-puskuria. Standardisuora tehtiin alkalisesta fosfataasista puolilaimennussarjana pitoisuuksilla 1, 0.5, 0.125, 0.0625 ja $0.03125 \mu\text{g}$ AP $55 \mu\text{l}$:ssa dietanolamiini- MgCl_2 -puskuria. Magneettihelmiin lisättiin $200 \mu\text{l}$ ja standardisuoraan $100 \mu\text{l}$ 0.5 mg/ml p-NPP -substraattia. Molempia inkuboitiin 2 minuuttia huoneenlämmössä ja 3 minuuttia $+ 42 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa magneettihelmien keräämistä varten. Nanopartikkeleiden keräyksen jälkeen $150 \mu\text{l}$ liuosta pipetoitiin kuoppalevyille, jossa oli odottamassa $50 \mu\text{l}$ 0.5 M NaH_2PO_4 -inhibiittoria. Mitattiin liuosten absorbanssit aallonpituudella 405 nm heti sekä aikapisteissä 5 ja 20 minuuttia.

3.5.2 Vasta-aineen affiniteetin vaikutus sitoutumisen saantoon

Tutkittiin erilaisten affiniteettien omaavien vasta-aineiden sitomiskykyä lämpöönreagoivien magneettisten nanopartikkeleiden (TMLA) kanssa. Antimykofenolihappo- ja anti-foolihappovasta-aineet immobilisoitiin TMLA-

magneettihelmien pinnalle ja vasta-aineille spesifistä hapteenia tartutettiin TBS-puskuriliuoksesta. Määritettiin tarttuneen hapteenin määrä magneettihelmissä.

10 µg aiemmin valmistettua biotinyloitua anti-mykofenolihappovasta-ainetta tartutettiin 50 µl:aan TMLA-magneettihelmiä 1 % BSA-liuoksessa inkuboidulla 20 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Työssä (kokeellisen osan kappaleissa 3.2 - 3.3) tuotettua, puhdistettua ja biotinyloitua anti-foolihappovasta-ainetta tartutettiin 10 µg 50 µl:aan TMLA-magneettihelmiä 1 % BSA-liuoksessa inkuboidulla 20 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Helmet pestiin kolme kertaa 100 µl:lla 0.01 % TBST ja suspensoitiin 50 µl:aan TBS-puskuria. Molemmat jaettiin kahteen 25 µl:n erään.

Anti-mykofenolihappovasta-ainetartutettuihin magneettihelmiin tartutettiin 5 µg aiemmin konjugoitua mykofenolihappo-AP -konjugaattia 100 µl:sta TBS-puskuria 75 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä kahdella rinnakkaisella. Anti-foolihappovasta-ainetartutettuihin magneettihelmiin tartutettiin 5 µg foolihappo-AP -konjugaattia (kokeellisen osan kappale 3.4) 100 µl:sta TBS-puskuria 75 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä kahdella rinnakkaisella.

Tartutuksen jälkeen helmet pestiin kolme kertaa 50 µl:lla 0.01 % TBST ja suspensoitiin kukin 110 µl:aan dietanolamiini-MgCl₂ -puskuria.

Alkalisesta fosfataasista tehtiin standardisuora puolilaimennussarjana yhdestä mikrogrammasta 0,03125 mikrogrammaan 55 µl:ssa dietanolamiini-MgCl₂ -puskuria kahdella rinnakkaisella.

0.5 mg/ml p-NPP -substraattiliuosta lisättiin näytteisiin 200 µl ja standardisuoraan 100 µl. Inkuboitiin 2 minuuttia huoneenlämmössä ja 3 minuuttia + 42 °C jonka aikana magneettihelmet kerättiin. Näytteiden supernatanttia ja standardisuoraa pipetoitiin 150 µl kuoppalevyille, jossa oli odottamassa 50 µl 0.5 M NaH₂PO₄ -inhibiittoria. Liuosten absorbanssit mitattiin aallonpituudella 405 nm.

3.5.3 *TMLA-magneettihelmien määrän vaikutus menetelmän toistettavuuteen*

Valmistaja Magnabeat Inc. suositteli immunitesteissä käytettäväksi 50 µl:aa TMLA-nanopartikkeleita, mutta alkalisen fosfataasin ja substraatin reaktion nopeuden ja voimakkuuden sekä kovan hinnan takia määrää haluttiin laskea.

TMLA-nanopartikkeleiden käyttäytymistä ja käytettävyyttä arvioitiin kolmella eri määrällä, 10, 25 ja 50 µl. Niistä arvioitiin rinnakkaisten toistettavuutta sekä määrän käytettävyyttä koko analyysin kannalta.

3.6 **Foolihappo-AP:n määrittäminen näytteestä TMLA-magneettihelmillä**

3.6.1 *Foolihappo-AP:n sitoutumisen saannon määrittäminen*

Haluttiin määrittää, kuinka paljon magneettipartikkelit sitovat näytteeseen li-sätystä foolihappo-AP -konjugaatista. Standardisuorana käytettiin alkalista fosfataasista tehtyä pitoisuusstandardia 0 - 2 µg AP. Tutkittiin pitoisuudet 0,5, 1 ja 2 µg foolihappo-AP:ta kahdella rinnakkaisella.

30 µg biotinyloitua anti-foolihappovasta-ainetta tartutettiin 150 µl:aan TMLA-magneettihelmiä 1 % BSA-liuoksessa inkuboimalla 15 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Helmet pestiin kolme kertaa 300 µl:lla 0,01 % TBST ja suspensoitiin 150 µl:aan TBS-puskuria. Jaettiin kuuteen 25 µl:n erään.

0,5, 1 ja 2 µg foolihappo-AP -konjugaattia tartutettiin 100 µl:sta TBS-puskuria kahdella rinnakkaisella 75 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä vasta-ainetartutettuihin magneettihelmiin. Helmet pestiin kolme kertaa 50 µl:lla 0,01 % TBST ja suspensoitiin 110 µl:aan TBS-puskuria.

Standardisuora tehtiin alkalista fosfataasista pitoisuuksilla 2, 1, 0,6, 0,4, 0,2 ja 0 µg AP 55 µl:ssa TBS-puskuria.

0,5 mg/ml p-NPP -substraattiliuosta lisättiin näytteisiin 200 µl ja standardisuoraan 100 µl. Inkuboitiin 3 minuuttia huoneenlämmössä ja 3 minuuttia + 42 °C, jonka aikana magneettihelmet kerättiin. Näytteiden supernatanttia ja standardisuora pipetoitiin 150 µl kuoppalevyille, jossa oli odottamassa 50 µl

0.5 M NaH_2PO_4 -inhibiittoria. Liuosten absorbanssit mitattiin aallonpituudella 405 nm.

3.6.2 Foolihappo-AP:n määrittely puskurista

Foolihappo-AP:n määrittelyä puskurista käytettiin mallina muilla matriiseilla tehdyille kokeille.

30 μg biotinyloitua anti-foolihappovasta-ainetta tartutettiin 150 μl :aan TMLA-magneettihelmiä 1 % BSA-liuoksessa inkuboimalla 15 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Helmet pestiin kolme kertaa 300 μl :lla 0.01 % TBST ja suspensoitiin 150 μl :aan TBS-puskuria. Jaettiin kuuteen 25 μl :n erään. Kuusi rinnakkaisista valittiin, jotta voidaan tehdä tilastollista analyysiä tuloksista, ja siksi, että magneettikeräjässä on kuusi paikkaa Eppendorf-putkille.

100 μl :sta TBS-puskuria tartutettiin 1 μg foolihappo-AP -konjugaattia 75 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä vasta-ainetartutettuihin magneettihelmiin kuudella rinnakkaisella. Helmet pestiin kolme kertaa 50 μl :lla 0.01 % TBST ja suspensoitiin 110 μl :aan dietanolamiini- MgCl_2 -puskuria.

Alkalisesta fosfataasista tehtiin standardisuora pitoisuuksilla 2, 1, 0.6, 0.4, 0.2 ja 0 μg AP 55 μl :ssa dietanolamiini- MgCl_2 -puskuria.

0.5 mg/ml p-NPP -substraattiliuosta lisättiin näytteisiin 200 μl ja standardisuoraan 100 μl . Inkuboitiin 3 minuuttia huoneenlämmössä ja 3 minuuttia + 42 °C jonka aikana magneettihelmet kerättiin. Näytteiden supernatanttia ja standardisuoraa pipetoitiin 150 μl kuoppalevyille, jossa oli odottamassa 50 μl 0.5 M NaH_2PO_4 -inhibiittoria. Liuosten absorbanssit mitattiin aallonpituudella 405 nm.

3.6.3 Foolihappo-AP:n määrittely kliinisistä matriiseista

Foolihapon tarttuminen määritettiin seerumista, syljestä ja virtsasta kuudella rinnakkaisella sekä identtisillä kokeilla. Näytematriiseja lukuun ottamatta kolme koetta suoritettiin kuten 3.6.2. Magneettihelmiin kiinnitettiin anti-foolihappovasta-aine ja foolihappo-AP -entsyymi. Kiinnittyneen hapterenin määrä analysoitiin p-NPP -substraatilla.

Kokeisiin valittiin kliiniseksi matriiseiksi seerumi, sylki ja virtsa, koska näiden analysointiin pyritään myös miniatyrisoiduissa analyysilaitteissa. Pakastettu seerumi oli hepariinikäsiteltyä ja peräisin VTT:n sisältä yksittäiseltä luovuttajalta. Kuudella rinnakkaisella kustakin matriisista voitiin määrittää tilastollista analyysiä toistettavuudelle.

3.6.4 Foolihappo-AP:n määrittäminen elintarvikematriiseista

Lämpöönreagoivien magneettisten nanopartikkeleiden käytettävyyttä elintarvikematriisien kanssa testattiin. Matriiseina toimivat rasvaton maito, kahvi, tee, omenamehu ja punaviini. Matriisit olivat kirkkaita ja viskositeetiltaan lähellä puskuria. Elintarvikenäytteistä tutkitaan usein muun muassa torjunta-ainejäämiä sekä muita erilaisia pienmolekyylejä. Tässä kokeessa mallimolekyylinä toimi foolihappo.

Koe suoritettiin kohdan 3.6.2 mukaisesti. Elintarvikematriisien pH-arvot määritettiin ennen koetta ja näytematriisien sakkautumisen takia hapteenin tartutuksen jälkeen kolmannessa pesussa magneettihelmet siirrettiin puhtaisiin Eppendorf-putkiin.

3.6.5 pH:n vaikutus hapteenin sitoutumisen saantoon elintarvikematriiseissa

Elintarvikematriiseissa omenamehun ja punaviinin pH-arvojen oletettiin vaikuttavan sitoutumiseen nanopartikkelikokeessa. Tässä kokeessa foolihappo-AP:n tarttumista testattiin sekä pH-säätämättömistä että pH:ltaan neutraaleiksi säädetyistä omenamehu- ja punaviininäytteistä. Kontrollinäytteenä toimi TBS-puskuri.

Koe suoritettiin kuten koe 3.6.2. Kussakin viidestä näytteestä käytettiin 25 µl magneettihelmiä ja Eppendorf-putket vaihdettiin hapteenin tartutuksen jälkeen kolmannessa pesussa.

3.6.6 Korkean proteiinipitoisuuden vaikutus TMLA-kokeeseen

Koska foolihappo-AP:n määrittäminen maidosta osoittautui vaikeaksi, kokeiltiin vaikuttaako kokeeseen suuri proteiinimäärä vai aiheuttaako maidon pääproteiini kaseiini spesifisesti ongelmia. Tarttuminen määritettiin puskurista, kaseiinista (*Casein sodium salt from bovine milk*, Sigma, cat# C8654) sekä BSA-

proteiinista (*Bovine Serum Albumin*, Sigma, cat# A8022) kuten puskurista kohdassa 3.6.2.

Rasvattomassa maidossa on proteiineja keskimäärin 3.8 g /100 ml [23] eli 38 mg/ml ja noin 80 % maidon proteiineista on kaseiinia. Tästä arvioitiin kaseiinin määräksi rasvattomassa maidossa 30.4 mg/ml. Kokeessa käytettiin kaseiini- ja BSA-pitoisuuksina 30.4 mg/ml kahtena rinnakkaisena sekä kontrollina kahta rinnakkaista puskurinäytettä.

3.6.7 Lämpöönreagoivien magneettihelmien vertailu *Dynabeads*- ja *Mag@Trac* -magneettihelmiin

TMLA-magneettihelmiä vertailtiin perinteisiin streptavidini-konjugoituihin magneettihelmiin ja samalla arvioitiin niiden käytettävyyttä.

200 µg *Dynabeads*-helmiä (20 µl, Invitrogen, cat#112.06D) ja *Mag@Trac*-helmiä (20µl, PlexPress, cat#20011) esipestiin kolme kertaa 50 µl:lla 0.01 % TBST-puskuria. 10 µg biotinyloitua anti-foolihappovasta-ainetta tartutettiin 15 minuuttia huoneenlämmössä kevyessä täristyksessä esipestyihin *Dynabeads*- ja *Mag@Trac*-helmiin sekä TMLA-helmiin (200 µg, 50 µl). Tartutuksen jälkeen helmet pestiin 50 µl:lla 0.01 % TBST-puskuria ja viimeiseksi suspensoitiin helmet TBS-puskuriin alkuperäiseen tilavuuteen sekä jaettiin kukin kahteen erään (*Dynabeads* ja *Mag@Trac* 10 µl, TMLA 25 µl). *Dynabeads*- ja *Mag@Trac*-helmiä ei lämmitetty pesujen aikana.

Vasta-aineimmobilisoituihin helmiin tartutettiin 1 µg foolihappo-AP -konjugaattia 100 µl:ssa TBS-puskuria 75 minuuttia huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa. Tartutuksen jälkeen helmet pestiin 50 µl:lla 0.01 % TBST-puskuria ja lopuksi ne suspensoitiin 110 µl:aan dietanolamiini-MgCl₂-puskuria.

Alkalisen fosfataasin standardisuora tehtiin kuten kohdassa 3.6.2. P-NPP -substraattia (0.5 mg/ml) lisättiin näytteisiin 200 µl ja standardisuoraan 100 µl. Inkuboitii 3 minuuttia huoneenlämmössä ja 3 minuuttia + 42 °C, jonka aikana helmet kerättiin magneettiin. Näytteiden supernatanttia ja standardisuoraa pipetoitiin 150 µl kuoppalevyille, jossa oli odottamassa 50 µl NaH₂PO₄-inhibiittoria. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 405 nm.

3.6.8 Tilastollinen analyysi

Kuusi rinnakkaista näytettä sisältäneistä kokeista tehtiin tilastollista analyysiä toistettavuuden määrittämiseksi. Näytteistä laskettiin keskihajonta (kaava 1), suhteellinen keskihajonta (kaava 2) sekä 95 % luottamustaso (kaava 3).

$$\text{Keskihajonta } s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}, \text{ missä } \bar{x} = \text{keskiarvo} \quad (1)$$

$$\text{RSD } \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%, \text{ missä } s = \text{keskihajonta}, \bar{x} = \text{keskiarvo} \quad (2)$$

$$95 \text{ \% luottamustaso} = \bar{x} \pm 2s, \text{ missä } \bar{x} = \text{keskiarvo}, s = \text{keskihajonta} \quad (3)$$

3.7 Foolihapon määrittäminen kapillaarielektroforeesilla

Molekyylien erotuksessa ja detektoinnissa voidaan käyttää kapillaarielektroforeesia, joka erottelee näytteen ionit niiden varauksen ja massan mukaan. Se on yleisesti käytetty erotusmenetelmä myös mikrosirulla.

Työssä käytettiin Beckman-Coulter P/ACE MDQ -kapillaarielektroforeesilaitetta. 27 µl biotinyloitua anti-foolihappovasta-ainetta tartutettiin 135 µl:aan TMLA-magneettihelmiä inkuboimalla 15 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Magneettihelmet pestiin kolme kertaa 300 µl:lla 0.01 % TBST-puskuria.

0.25 µg 10 % etanoliin liuotettua foolihappoa (Sigma-Aldric, cat# F7876) tartutettiin 100 µl:sta TBS-puskuria vasta-ainekonjugoituihin magneettihelmiin 75 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Pestiin kolme kertaa 300 µl:lla. Pesujen jälkeen helmet suspensoitiin 200 µl:aan 10 % etanolia ja inkuboitiin 10 minuuttia + 65 °C:ssa foolihapon eluoimiseksi irti vasta-aineesta. Näyte siirrettiin magneettiin, helmet kerättiin ja liuos pipetoitiin näytteeksi kapillaarielektroforeesiin. Foolihaposta tehtiin standardisuora kahtena rinnakkaisena 0.05 - 10 µg foolihappoa 200 µl:ssa 10 % etanolia.

Foolihappo määritettiin Thermo Scientific NanoDrop-spektrofotometrillä ennen kapillaarielektroforeesia standardisuorista ja näytteestä. Kapillaarielektroforeesijossa käytettiin taulukossa 1 näkyviä parametreja.

Taulukko 1. Kapillaarielektroforeesijon olosuhteet

Ajopuskuri	50 mM ammoniumasetaatti, pH 11
Näytteen paineinjektointi	0.5 psi 10 sec
Ajo-olosuhteet	30 kV + 25 °C
Näytteiden säilytys	+ 10 °C
Kapillaari	i.d. 50 µM, o.d. 375 µm, fused-silica, ei pinnoitusta, kokonaispituus 80 cm, pituus detektorille 70 cm
Detektointi	256 nm (referensseinä 214 ja 283 nm)

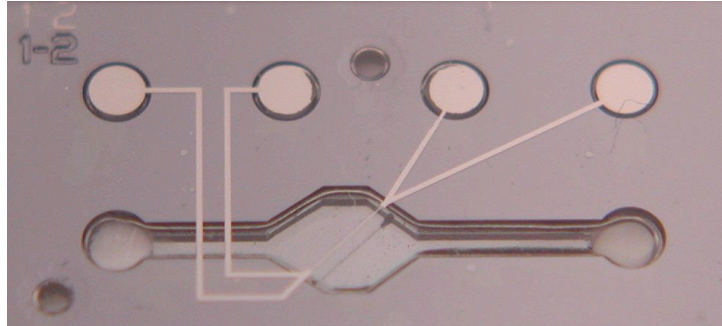
3.8 TMLA-magneettihelmien käyttäytyminen piisirulla

TMLA-magneettihelmiä testattiin mikrosirulla, jotta saataisiin kuva niiden käyttäytymisestä mikrofluidistisissa kanavissa. Haluttiin myös nähdä muodostavatko helmet lämmitetyllä sirulla rypäitä, jotka voitaisiin kiinnittää kammioon ulkoisella magneetilla.

Biotinyloitu anti-foolihappovasta-aine tehtiin fluoresoivaksi leimaamalla se *Alexa Fluor 488* -fluoresenssileimalla (Invitrogen, cat# A10235) kitin ohjeen mukaan. 5 µg fluoresenssileimattua vasta-ainetta tartutettiin 25 µl:aan TMLA-magneettihelmiä 1 % BSA-liuoksessa inkuboimalla 15 minuuttia huoneenlämmössä kääntelyssä. Magneettihelmet pestiin kolme kertaa 50 µl:lla 0.01 % TBST-puskuria. Lopuksi magneettihelmet suspensoitiin 25 µl:aan 0.05 % TBST-puskuria.

Fluoresenssileimattujen TMLA-magneettihelmien käyttäytymistä testattiin piisirulla. Aiemmin PCR-monistusta varten VTT:llä valmistetut piisirut (kuva 5) olivat kooltaan 13 x 7 mm, ja ne koostuivat 500 µm:n paksuisista piialustasta ja lasikannesta. Nestekanavisto oli etsattu piiosaan, jonka pohjassa oleva molybdeeniohutkalvovastus lämmitti sirua. Lasikannen alapintaan kiinnitetty platinainen ohutkalvovastus mittasi lämpötilaa suoraan nestekontaktista ja sirun lämpötilaa voitiin säätää tietokoneohjelmalla. Sirun keskellä olevan kammion halkaisija oli 2 mm ja syvyys 350 µm. Tilavuudeltaan kammio oli noin 1 µl. Kammioon tulevan nestekanavan halkaisija oli 600 µm. Nestettä

pumpattiin sirun toisessa päässä olevasta sisääntuloreiästä kammioon ja se poistettiin toisessa päässä olevasta ulosmenoreiästä. Fluoresenssi havainnoitiin 488-leiman virittävällä lasersäteellä ja kameralla. [24.]



Kuva 5. Piisiru. Kuva Ari Hokkanen, VTT.

Siru pestiin kylmällä 0.1 % TBST-puskurilla. 1 μ l *Alexa 488* -fluoresenssileimattuja ja vasta-ainekonjugoituja TMLA-partikkeleita injektoidiin sirulle kahden ilmakuplan välissä ja pysäytettiin kammion kohdalle. Käynnistettiin kylmän puskurin virtaus. Detektoitiin fluoresenssi ennen ja jälkeen eluoinnin puskurilla.

Seuraavassa kokeessa 1 μ l *Alexa 488* -fluoresenssileimattuja ja vasta-ainekonjugoituja TMLA-partikkeleita injektoidiin sirulle kuten edellä ja pysäytettiin kammion kohdalle. Kammio lämmitettiin mittarin mukaan lämpötilaan 55 °C ja sen päälle asetettiin magneetti. Kylmän puskurin hidas virtaus käynnistettiin. Kammion lämpötilaa säädettiin niin, että se näytti koko ajan vähintään 50 °C. Puskuria ajettiin sirulle 5 minuuttia. Virtaus pysäytettiin ja fluoresenssi kammiossa detektoitiin. Beadien pesu pois kammioista aloitettiin laskeamalla sirun lämpötila huoneenlämpöön ja huuhtelemalla sitä puskurilla hitaalla nopeudella 5 minuuttia. Kammion fluoresenssi detektoitiin. Puskurin virtausnopeus nostettiin maksimiin ja huuhdeltiin 2 min. Kammion fluoresenssi detektoitiin.

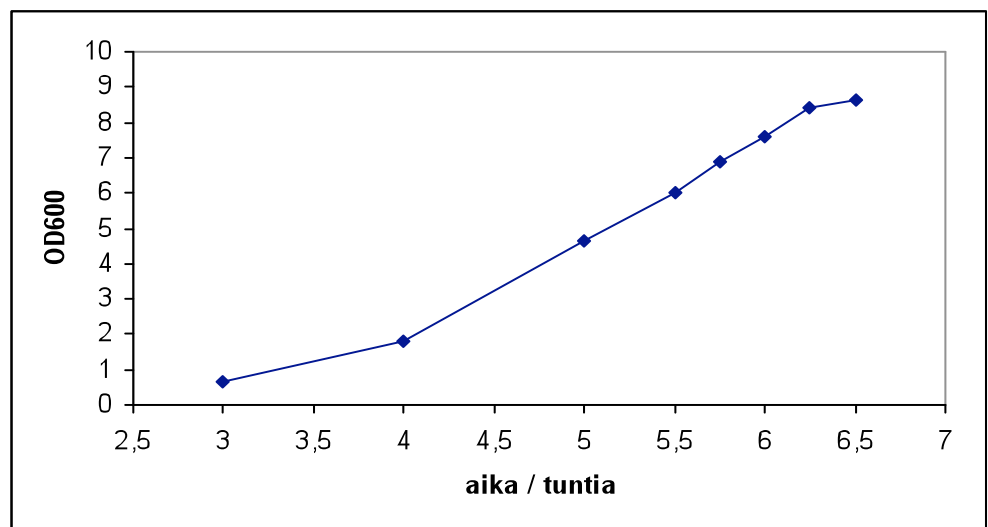
4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Kokeista mitatut absorbanssi-arvot taulukoituina liitteessä 2.

4.1 Vasta-aineen tuotto ja puhdistus

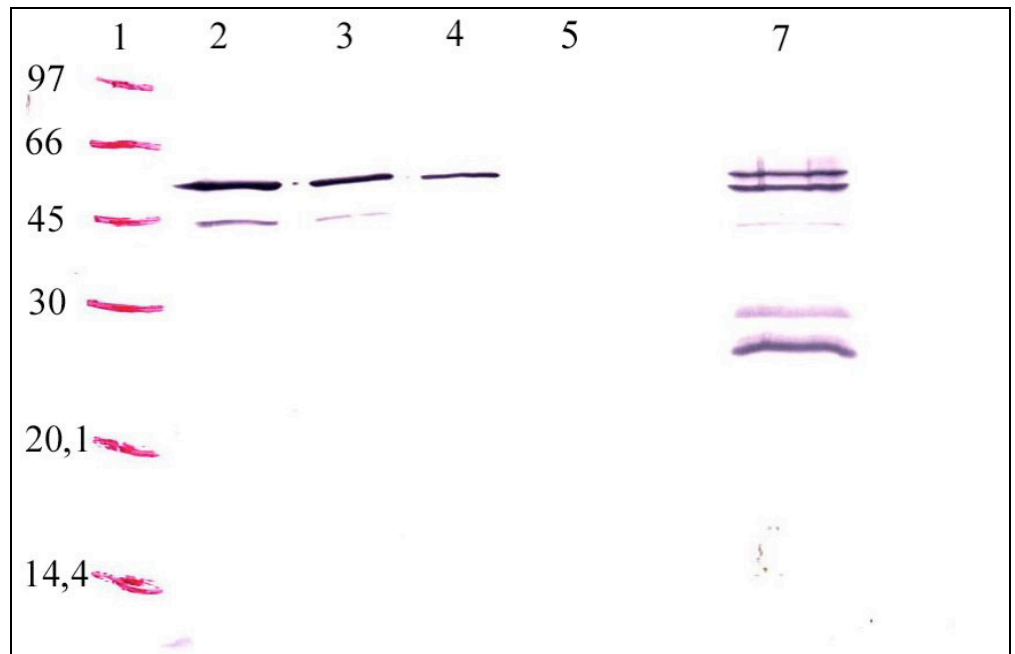
4.1.1 Anti-foolihappovasta-aineen tuotto

Anti-foolihappovasta-aineen tuotossa *E. coli* kasvukäyrää seurattiin mittaamalla tuottoliuoksen optinen tiheys OD600, jotta optimaalinen indusointihetki paljastuisi. Kuvassa 6 on esitetty *E. coli* kasvukäyrä ajan funktiona. Käyrä vastaa tyypillistä *E. coli* kasvukäyrää tällä ajanjaksolla.



Kuva 6. *E. coli* -bakteerin kasvukäyrä tunteina anti-foolihappovasta-aineen tuotossa

6.5 tunnin päästä kasvatuksen alusta tuotto indusoitiin IPTG:llä ja vasta-aineen annettiin tuottaa yön yli. Tuotosta ajettiin Western blot (kuva 7). Tuotoksi arvioitiin Western blot -kalvon perusteella noin 3 mg/l, mikä on tyypillinen tuottotaso rekombinanttivasta-aineelle (Fab) pienen mittakaavan kasvatuksissa. Tuotto oli riittävä, jotta puhdistus kannatti aloittaa.



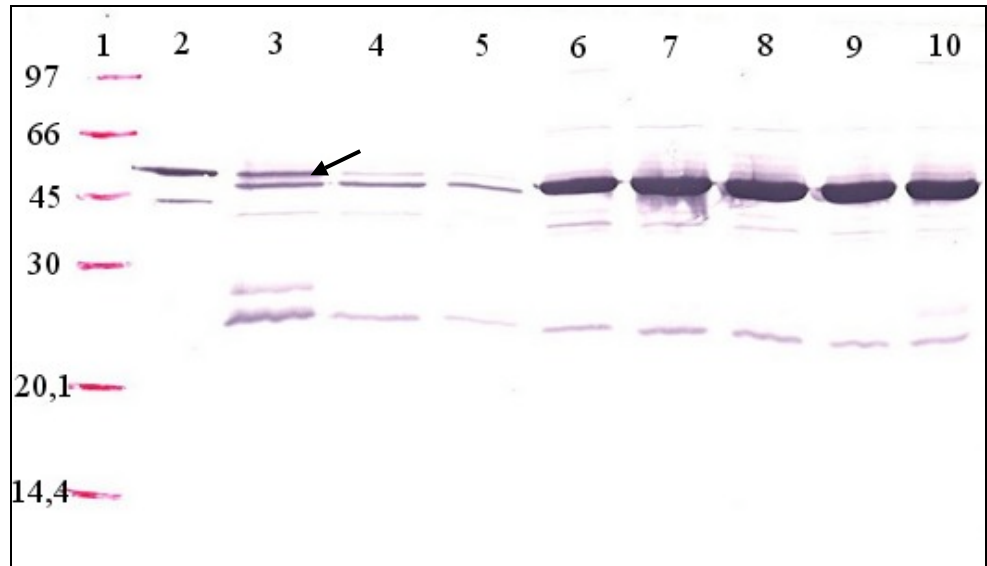
Kuva 7. Anti-foolihappovasta-aineen tuotto. 1. LMW, 2. Fab-standardi 13 mg/ml, 3. Fab-standardi 6.5 mg/ml, 4. Fab-standardi 4 mg/ml, 5. Fab-standardi 1 mg/ml, 7. tuoton supernatantti. Redusoimaton geeli.

4.1.2 Tuotetun anti-foolihappovasta-aineen pitoisuus ja karakterisointi

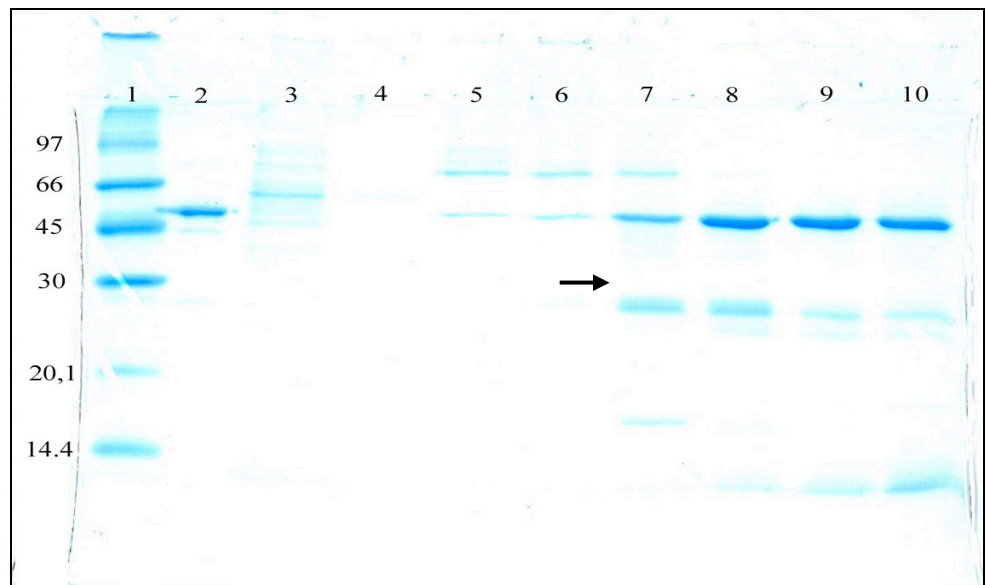
Anti-foolihappovasta-aine puhdistettiin metalliaffiniteettikromatografialla. Puhdistuksen onnistumista tarkasteltiin Western blotin (kuva 8) sekä proteiinigeelin (SDS-PAGE) (kuva 9) avulla. Western blotissa käytetty immuno-reaktio mahdollistaa vasta-aineen täsmällisen havaitsemisen, jolloin voidaan analysoida myös runsaasti muita proteiineja sisältäviä näytteitä. Detektiovas- ta-aine tunnistaa myös hajoamistuotteet ja irralliset ketjut. SDS-PAGE sovel- tuu puhdistettujen proteiinien analyysiin.

Western blot -ajoon valittiin fraktioita puhdistuksen eri vaiheista. Siinä lähtö- näytteen nuolella merkityn vyöhykkeen väheneminen effluentista ja pesu- fraktioista kertoo histidiinihännällisen proteiinin tarttumisen onnistuneen. SDS-PAGE-geelissä voidaan havaita puhdistuneen proteiinin rikastumaa. Mitä suuremmaksi eluutioliuoksen imidatsoli-pitoisuus kasvoi, sitä puhtaam- pia fraktioita saatiin eluotua ulos. Halutun proteiinin puuttuminen pesufrak- tioista osoittaa pesujen onnistuneen. Kuvassa nuoli kuvaa irrallisia ketjuja. Puhtauden lisäksi SDS-PAGE auttaa arvioimaan Fab-vasta-ainefragmentin (n. 50 kDa) irrallisten kevyt- ja raskasketjujen (n. 25 kDa) osuutta tuotossa.

Tässä SDS-PAGE-geelin perusteella voidaan arvioida irrallisten ketjujen osuus vähäiseksi, alle 10 %, josta ei ole haittaa vasta-aineella tehtäviin jatkokokeisiin.



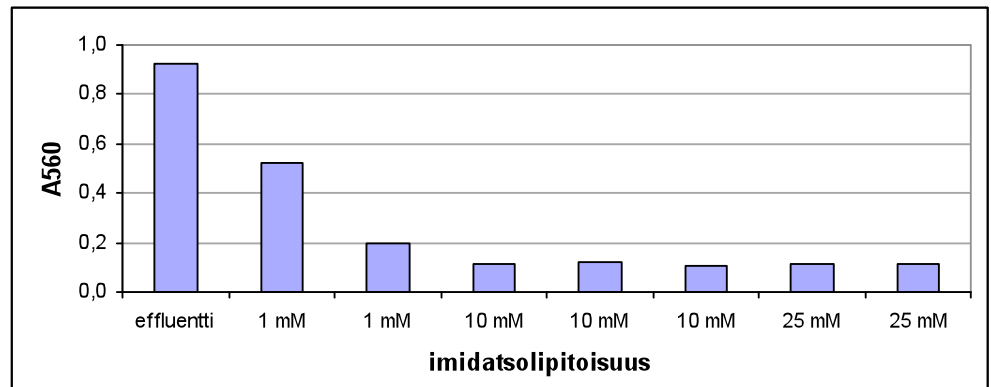
Kuva 8. Western blot anti-foolihappovasta-aineen tuotosta. 1. LMW, 2. 13 mg/ml, 3. lähtönäyte, 4. effluentti, 5. pesufraktio 1mM, 6. eluutiofraktio (ef) 100 mM, 7. ef 100 mM, 8. ef 200 mM, 9. ef 200 mM, 10. ef 500 mM. Nuoli osoittaa matriisiin tarttunutta Fab-fragmenttia.



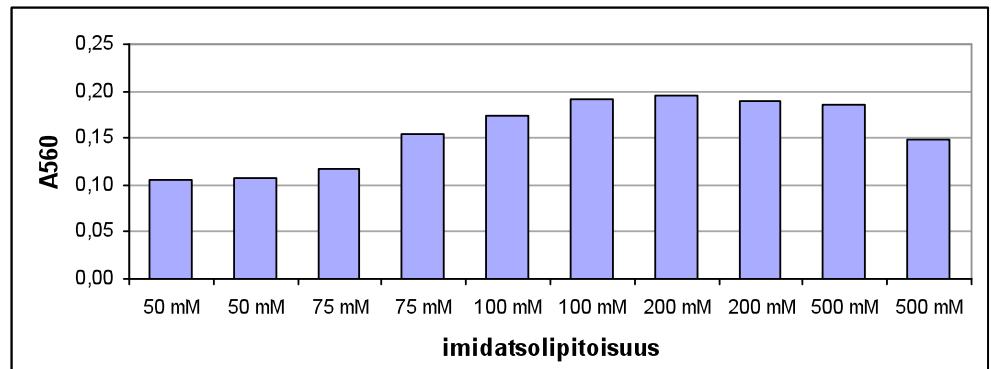
Kuva 9. SDS-PAGE anti-foolihappovasta-aineen tuotosta. 1. LMW, 2. 1 µg, 3. pesufraktio (pf) 1 mM, 4. pf 1mM, 5. pf 25 mM, 6. eluutiofraktio (ef) 50 mM, 7. ef 75 mM, 8. ef 100 mM, 9. ef 200 mM, 10. ef 500 mM. Nuoli osoittaa irrallisia ketjuja.

Fraktioiden proteiinipitoisuutta arvioitiin BCA-määrittelyksellä (kuvat 10 ja 11). Kuvassa 10 näkyy effluentin ja pesujen proteiinipitoisuudet. Effluentissa ja ensimmäisessä pesussa oleva runsas proteiinimäärä koostuu *E. coli* omis-

ta proteiineista, jotka eivät tartu metallikelaattiin. Eluutiofraktioiden proteiinipitoisuudet näkyvät kuvassa 11.



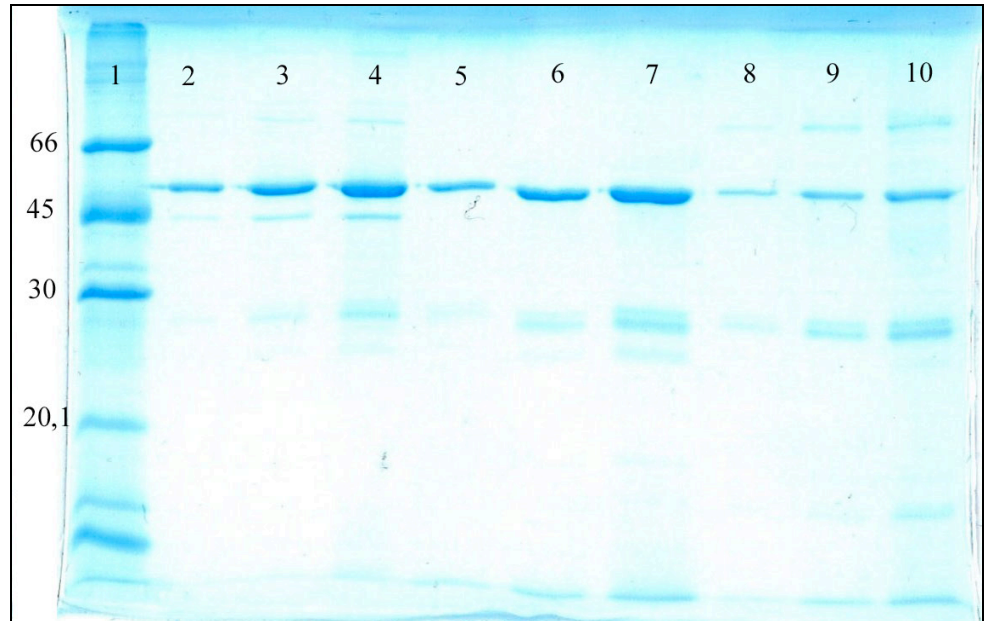
Kuva 10. Anti-foolihappovasta-aineen puhdistuksen effluentin ja pesujen proteiinipitoisuudet BCA-määrityksessä.



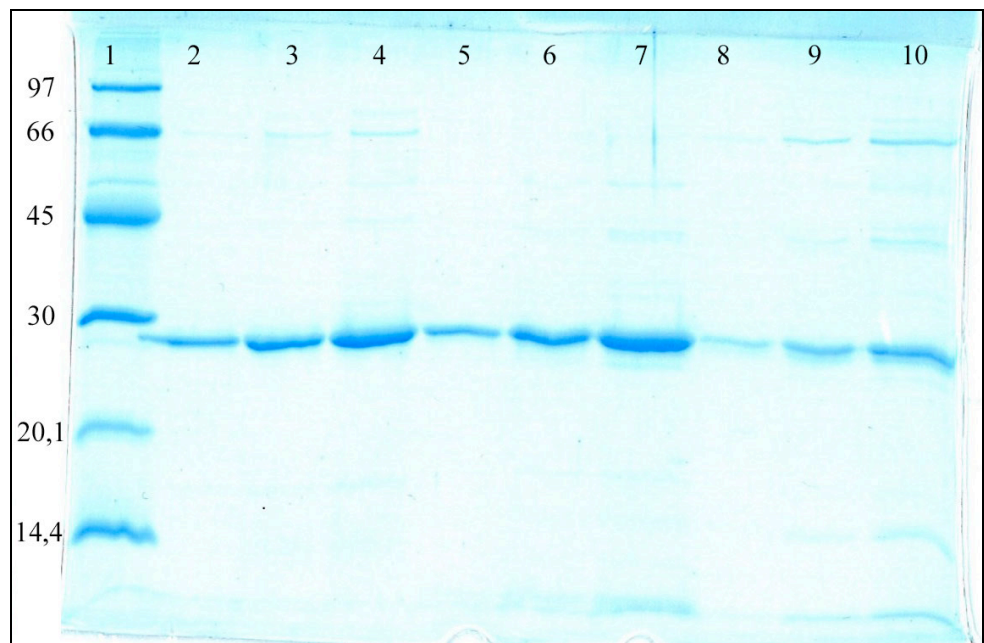
Kuva 11. Anti-foolihappovasta-aineen puhdistuksen eluutiofraktioiden proteiinipitoisuudet BCA-määrityksessä.

4.1.3 Anti-foolihappovasta-aineen jatkokäsittelyt

Puhdistetun anti-foolihappovasta-aineen fraktiot yhdistettiin niiden puhtausien perusteella ja dialysoitujen erien puhtautta arvioitiin kahdella SDS-PAGE-geelillä. Redusoimattomassa geelissä (kuva 12) halutun Fab-fragmentin disulfidisillat ovat ehjät ja kokonaisen molekyylin koko on noin 50 kDa. Irralliset Fab-fragmentin kevyt- ja raskasketjut näkyvät vyöhykkeessä, jonka koko on n. 25 kDa. Redusoidussa geelissä (kuva 13) näytteisiin on lisätty β -merkaptotetanolia, joka rikkoo disulfidisillat domeenien väliltä. Tällöin kaikkien fragmenttien koko on n. 25 kDa. Proteiinierien puhtausien todettiin riittävän nanopartikkelitestaukseen.



Kuva 12. Redusoimaton proteiinigeeli. 1. LMW, 2. Fab-standardi 0,5 µg, 3. Fab-standardi 1 µg, 4. Fab-standardi 2 µg, 5. pooli 1 1:3, 6. pooli 1 1:2, 7. pooli 1 1:1, 8. pooli 2 1:3, 9. pooli 2 1:2, 10. pooli 2 1:1.



Kuva 13. Redusoitu proteiinigeeli. 1. LMW, 2. Fab-standardi 0,5 µg, 3. Fab-standardi 1 µg, 4. Fab-standardi 2 µg, 5. pooli 1 1:3, 6. pooli 1 1:2, 7. pooli 1 1:1, 8. pooli 2 1:3, 9. pooli 2 1:2, 10. pooli 2 1:1.

Dialysoidut erät konsentroitiin pienempään tilavuuteen. Erä 1 konsentroitiin lähtötilavuudesta 20 ml lopputilavuuteen 6 ml. Erä 2 konsentroitiin lähtötilavuudesta 35 ml, lopputilavuuteen 3,5 ml.

Dialysoitujen proteiininäytteiden absorbansseiksi määritettiin: seos 1: $A = 0.777$ (A_{280}), seos 2: $A = 0.621$ (A_{280})

Ekstinktiokerroin määritettiin aminohapposekvenssistä *Peptide Property Calculator* [21] -verkkolaskurin avulla erikseen kevyt- ja raskasketjulle. Fab-fragmentin ekstinktiokerroin on näiden yhteenlaskettu summa.

$$\text{Kevytketju: } 36160 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

$$\text{Raskasketju: } 55790 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

$$\text{Fab-ekstinktiokerroin: } (36160 + 55790) \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} = 88950 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

Moolimassa saatiin laskemalla yhteen samalla laskurilla määritetyt kevyt- ja raskasketjun massat:

$$\text{Kevytketju: } 22701 \text{ g/mol}$$

$$\text{Raskasketju: } 25053 \text{ g/mol}$$

$$\text{Fab-moolimassa: } (22701 + 25053) \text{ g/mol} = 47754 \text{ g/mol}$$

Liuosten proteiinkonsentraatio laskettiin Lambert Beerin lailla, kaava 4.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \Leftrightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (4)$$

missä A = mitattu absorbanssi A_{280} , ε = ekstinktiokerroin, l = valotien pituus kyvetissä.

Näiden tietojen perusteella voitiin määrittää liuosten konsentraatiot seuraavasti:

$$\begin{aligned} \text{Erä 1: } c &= \frac{0.777}{88950 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot 47754 \text{ g/mol} \\ &= 0.42 \text{ g/l} = 0.42 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Erä 2: } c &= \frac{0.621}{88950 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot 47754 \text{ g/mol} \\ &= 0.33 \text{ g/l} = 0.33 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

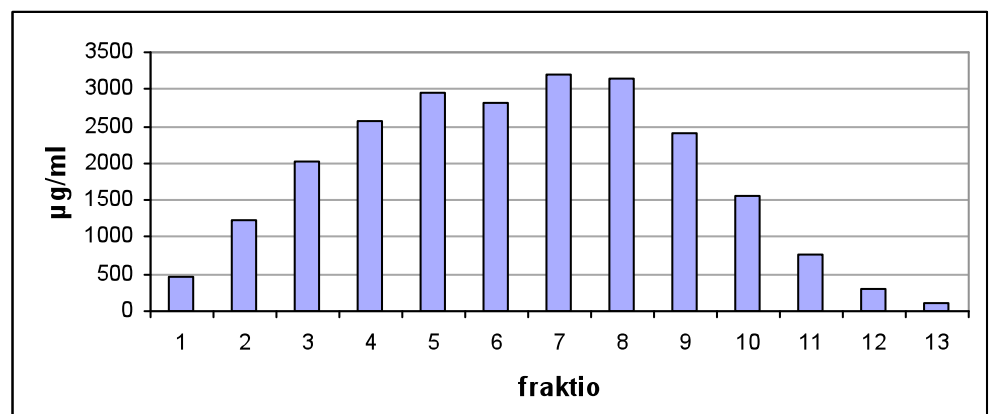
Kokonaisproteiinimäärät arvioitiin tilavuuden perusteella.

Erä 1: 6 ml \rightarrow n. 2.5 mg.

Erä 2: 3,5 ml \rightarrow n. 1.2 mg.

4.2 Vasta-aineen biotinylointi

Biotinyloinnin jälkeen BCA-määrittelyksellä löydettiin eniten proteiinia sisältävät fraktiot (kuva 14), ja sen perusteella yhdistettiin fraktiot 3 - 9.



Kuva 14. BCA-määrittelyksen fraktioiden proteiinipitoisuudet biotinyloidulle anti-foolihappovasta-aineelle

Biotinyloidun vasta-aineen konsentraatio määritettiin mittaamalla absorbanssi spektrofotometrisesti aallonpituudella 280 nm ja laskemalla tästä teoreettinen konsentraatio vasta-aineen ekstinktiokertoimen ja moolimassan avulla (ekstinktiokertoimen ja moolimassan määrittelykset kappaleessa 4.1.3).

$$\text{Seos 1: } A_{280} (1:10) = 0.257 \rightarrow 1:1 = 2.570$$

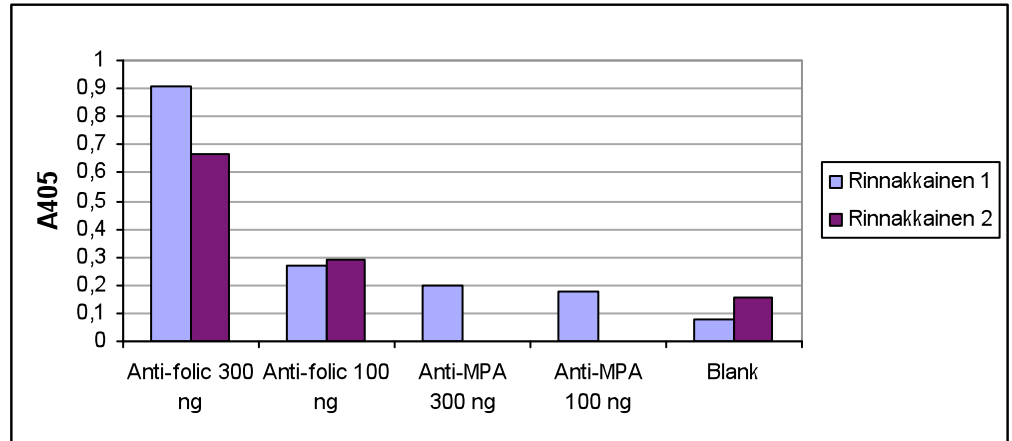
$$\text{Konsentraatio: } \frac{2.570}{88950 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot 47754 \text{ g/mol} = 1.38 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Seos 2: } A_{280} (1:1) = 0.953$$

$$\text{Konsentraatio: } \frac{0.953}{88950 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot 47754 \text{ g/mol} = 0.51 \text{ mg/ml}$$

Biotinyloinnin onnistuminen todettiin ELISA-testillä, jossa biotinyloitu vasta-aine-fragmentti kiinnitettiin kaupalliseen streptavidiinipinnoitettuun le-

vyyn eri konsentraatioissa kaksina rinnakkaisina. Tarttuneen vasta-aineen määrä detektoitiin kohdassa 3.4 valmistetulla foolihappo-AP-konjugaatilla. Kontrollina käytettiin aiemmin tehtyjä, biotinyloitua mykofenolihappo-vasta-ainetta ja sille spesifistä mykofenolihappo-AP-konjugaattia. Kuvassa 15 on mitatut absorbanssit aallonpituudella 405 nm.

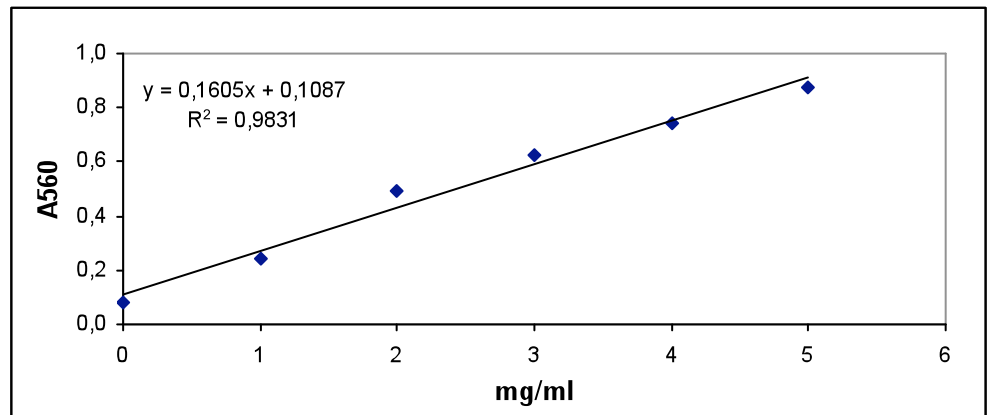


Kuva 15. ELISA-testi biotinyloidulle vasta-ainefragmentille. Osasta näytteistä kaksi rinnakkaista.

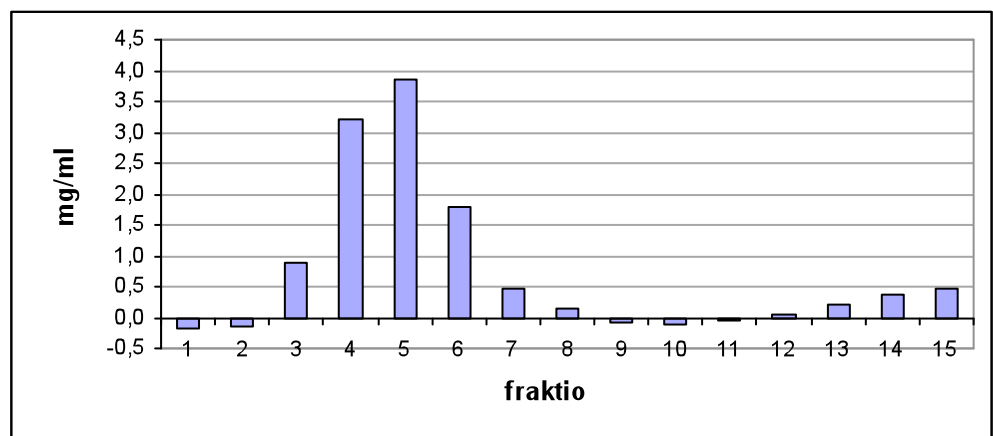
Todettiin, että vasta-aine oli tarttunut streptavidini-pinnoitetulle levyille, joten biotinylointi oli onnistunut.

4.3 Mallimolekyyliproteiinkonjugaatin valmistus

Foolihappo konjugoitiin karboksyyli-ryhmästään alkalinen fosfataasi -entsyymiin aminoryhmiin. Puhdistuksen jälkeen foolihappo-alkalinen fosfataasi -fraktioiden proteiinkonsentraatiot määritettiin BCA-testillä, jossa standardisuorana käytettiin alkalisesta fosfataasista tehtyä laimennussarjaa. Kuvassa 16 on standardisuora ja kuvassa 17 fraktioiden konsentraatiot standardisuoran perusteella.

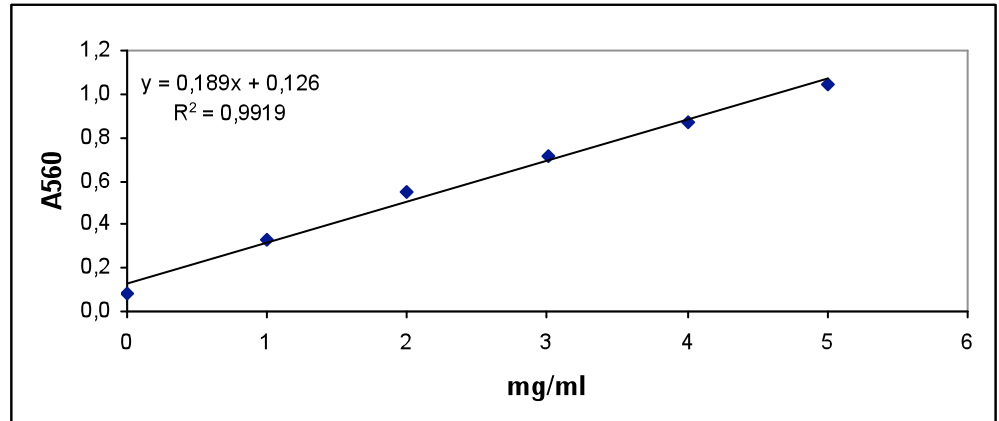


Kuva 16. Standardisuora alkalisella fosfataasilla.



Kuva 17. Foolihappo-alkalinen fosfataasi -konjugaatin pitoisuudet fraktioissa.

Fraktiot 3 - 7 yhdistettiin (500 μ l), koska niihin oli eluoitunut eniten proteiinia. Seoksen proteiinipitoisuus määritettiin uudelleen BCA-määrityksellä kahden rinnakkaisen AP-standardisuoran perusteella. Foolihappo-AP -seoksen kahden rinnakkaisen absorbansseiksi mitattiin aallonpituudella 560 nm 0.535 ja 0.513. Tästä saatiin keskiarvoksi 0.524 ja siitä laskettiin alkali- sen fosfataasin standardisuoran (keskiarvo) (kuva 18) perusteella konjugaatin pitoisuus.



Kuva 18. Standardisuora alkalisesta fosfataasista kahden rinnakkaisen keskiarvosta.

$$x = \frac{y - 0.126}{0.189}, \quad y = 0.524$$

$$x = \frac{0.524 - 0.126}{0.189} = 2.106$$

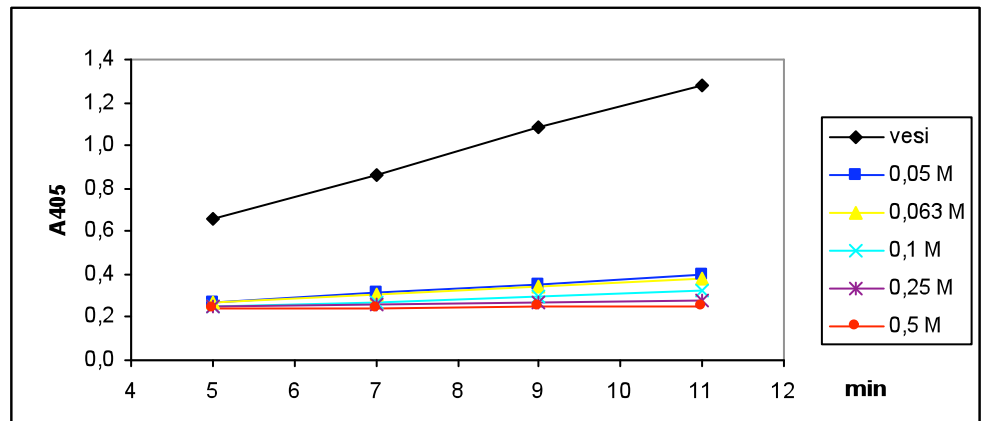
Foolihappo-alkalinen fosfataasi -konjugaatin proteiini-konsentraatioksi saatiin 2.1 mg/ml.

4.4 Analyysisysteemin pystytys ja optimointi

4.4.1 Alkalisen fosfataasin inhibiitio natriumdivetyfosfaatille

Alkalisen fosfaatin inhibitiota natriumdivetyfosfaatille tutkittiin, koska alkalisesta fosfataasista tuottama värireaktio oli hyvin nopea ja laitteen mittausrajat tulivat nopeasti vastaan. Myös aikaero TMLA-näytteiden ja standardisuoran välillä haluttiin estää pysäyttämällä kaikkien reaktio samanaikaisesti.

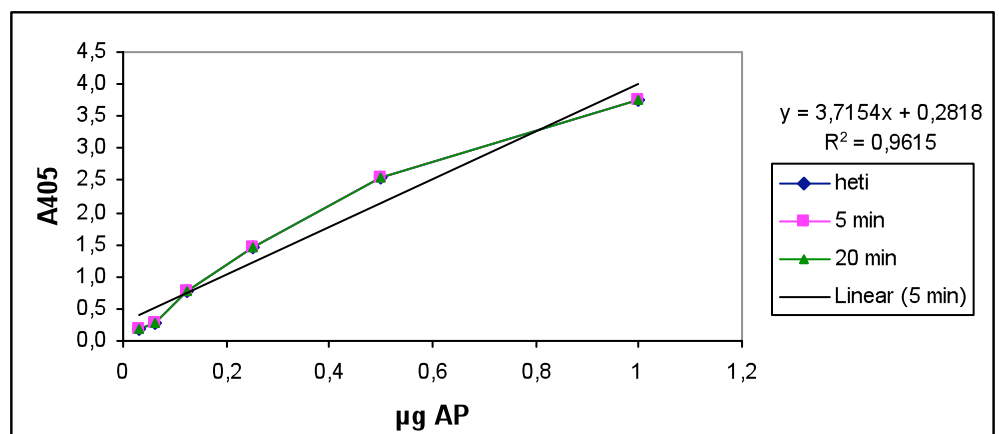
Alkalisen fosfataasin ja substraatin reaktiota seurattiin neljässä aikapisteessä inhibiittorin läsnä ollessa ja ilman mittaamalla liuosten absorbanssi aallonpituudella 405 nm (kuva 19).



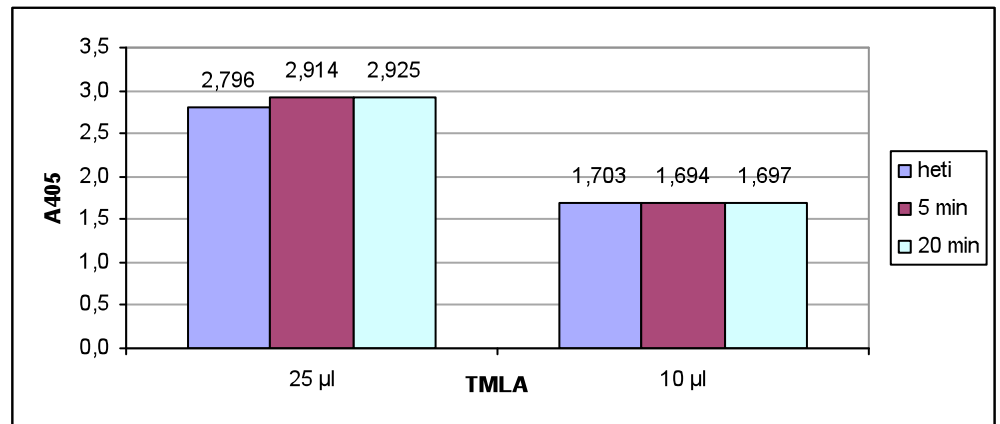
Kuva 19. Alkalisen fosfataasin värinmuodostus eri aikapisteissä aallonpituudella 405 nm. Mustassa sarjassa inhibiittorin tilalla vettä, värillisissä inhibiittoria eri konsentraatioilla.

Todettiin natriumdivetyfosfaatin inhiboivan reaktiota, koska vettä sisältäneen näytteen absorbanssi kasvoi ajan funktiona, mutta inhibiittoria sisältäneiden näytteiden absorbanssi kasvoi vain hyvin vähän tai ei ollenkaan.

Inhibition toimivuus testattiin TMLA-nanopartikkeleiden läsnä ollessa käyttämällä reaktion lopettamiseen 0.5 M natriumdivetyfosfaattia ja mittaamalla liuosten absorbanssi heti sekä aikapisteillä 5 ja 20 min. Alkalisen fosfataasin standardisuoran mittaustulokset ovat kuvassa 20. Magneettihelmien (25 ja 10 μ l) mittaustulokset ovat kuvassa 21.



Kuva 20. AP-standardisuora kahdella rinnakkaisella mitattuna heti sekä aikapisteissä 5 ja 20 min. Suorat ovat yhtenevät.

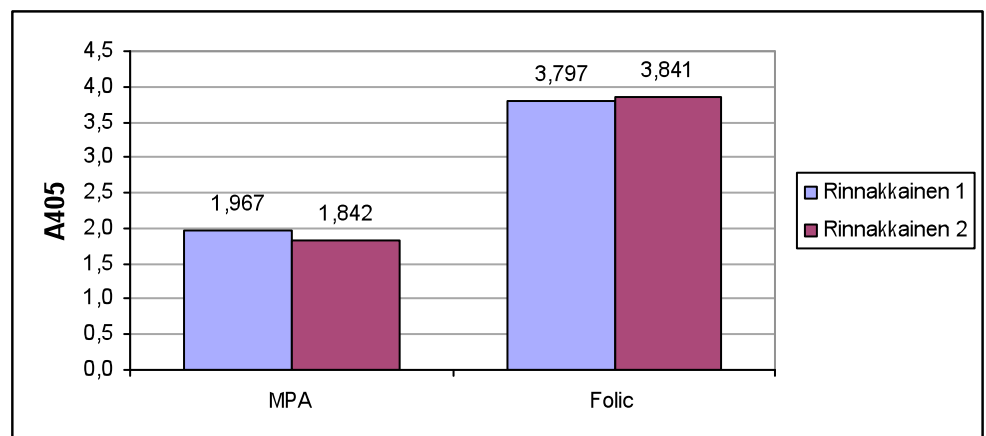


Kuva 21. TMLA-näytteiden absorbanssit kahdella eri helmimäärällä mitattuina.

Todettiin natriumdivetyfosfaatin pysäyttävän alkalisen fosfaasin reaktion sekä standardisuorassa että näytteissä, eikä se vaikuttanut häiritsevän magneettihelmikoetta. Jatkokokeissa päätettiin käyttää 50 µl 0.5 M NaH_2PO_4 -inhibiittoria entsyymireaktion pysäyttämiseen.

4.4.2 Vasta-aineen affiniteetin vaikutus sitoutumisen saantoon

Anti-foolihappo- ja anti-mykofenolihappovasta-aineiden sitomiskapasiteetteja vertailtiin kiinnittämällä ne TMLA-nanopartikkeleihin ja tartuttamalla samat määrät vasta-aineille spesifisiä antigeeneja 100 µl:sta TBS-puskuria. Näytteiden absorbanssit ovat kuvassa 22.



Kuva 22. Tarttumistehokkuuden vertailu anti-mykofenolihappo (MPA)- ja anti-foolihappovasta-aineilla (folic). Kaksi rinnakkaista.

Todettiin anti-foolihappovasta-aineella olevan noin kaksinkertainen sitomiskapasiteetti antigeeniä kohtaan verrattuna anti-mykofenolihappovasta-

aineeseen. Jatkokokeissa päätettiin käyttää anti-foolihappovasta-ainetta, jolla oli parempi affiniteetti.

4.4.3 TMLA-magneettihelmien määrän vaikutus menetelmän toistettavuuteen

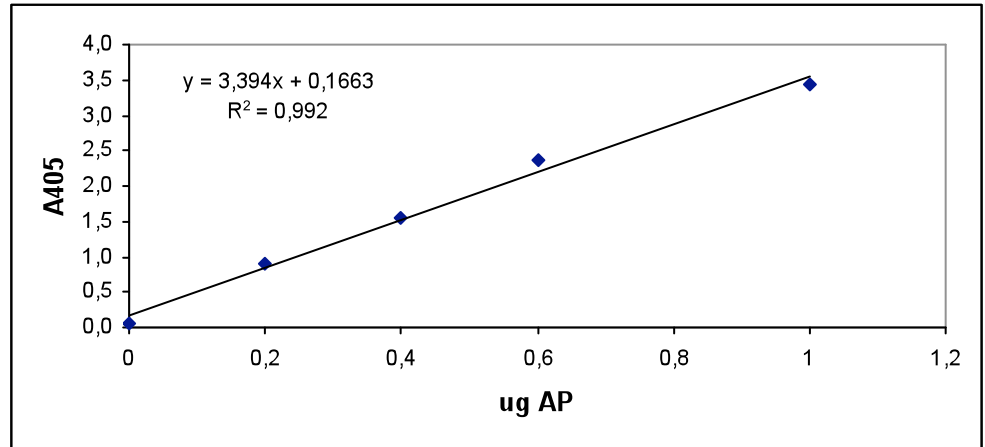
TMLA-magneettihelmien käyttäytymistä ja käytettävyyttä arvioitiin anti-foolihappovasta-aineella kolmella eri määrällä helmiä, 10, 25 ja 50 µl:lla. Kokeissa havaittiin, että 10 µl:lla TMLA-magneettihelmiä rinnakkaisten toistettavuus oli heikohko. Koko analyysiä ajatellen määrä oli hyvä, sillä tartutusmäärien ollessa pienemmät värinmuodostus oli hitaampaa. 25 µl magneettihelmiä oli helposti käsiteltävä helmimäärä, mutta värinmuodostus oli melko nopea. Rinnakkaiset olivat tällä määrällä melko toistettavia. Valmistajan suosittelema määrä, 50 µl magneettihelmiä, oli helppo käsitellä ja rinnakkaiset olivat toistettavia, mutta analyysissä tartutetun antigeeni-AP-entsyymikonjugaatin hyvästä katalyyttisestä aktiivisuudesta johtuen värinmuodostuminen oli todella nopeaa.

Jatkokokeissa päätettiin käyttää 25 µl:aa TMLA-magneettihelmiä, koska tämä määrä antoi toistettavia tuloksia ja magneettihelmien sitoma alkalinen fosfataasi oli mahdollista määrittää spektrofotometrisesti laitteen lineaarisella alueella.

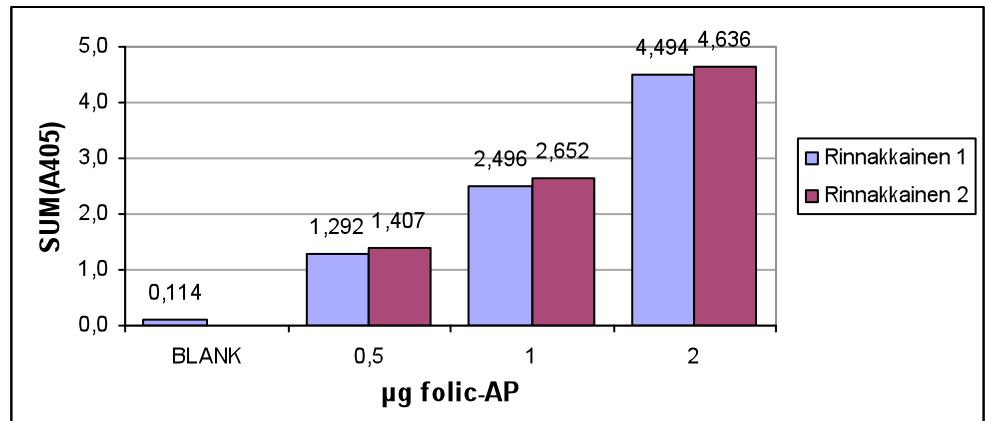
4.5 Foolihappo-AP:n määrittäminen näytteestä TMLA-magneettihelmillä

4.5.1 Foolihappo-AP:n sitoutumisen saannon määrittäminen

Foolihappo-AP:n sitoutumista määritettiin 100 µl:sta TBS-puskuria. Kokeessa tutkittiin foolihappo-AP -konjugaatin määrät 0,5, 1 ja 2 µg. Kuvassa 23 on standardisuora tälle kokeelle ja kuvassa 24 rinnakkaisten absorbanssien aallonpituudella 405 nm.



Kuva 23. AP-standardisuora lineaarisella alueella 0 - 1 μg



Kuva 24. TMLA-näytteiden absorbanssit aallonpituudella 405 nm foolihappo-AP:n saantokokeessa kahdella rinnakkaisella

Standardisuoran avulla määritettiin näytteiden foolihappo-AP -määrät. Taulukossa 2 on laskettu saannot rinnakkaisten keskiarvoille.

Taulukko 2. Foolihappo-AP:n tartutuksen saannot

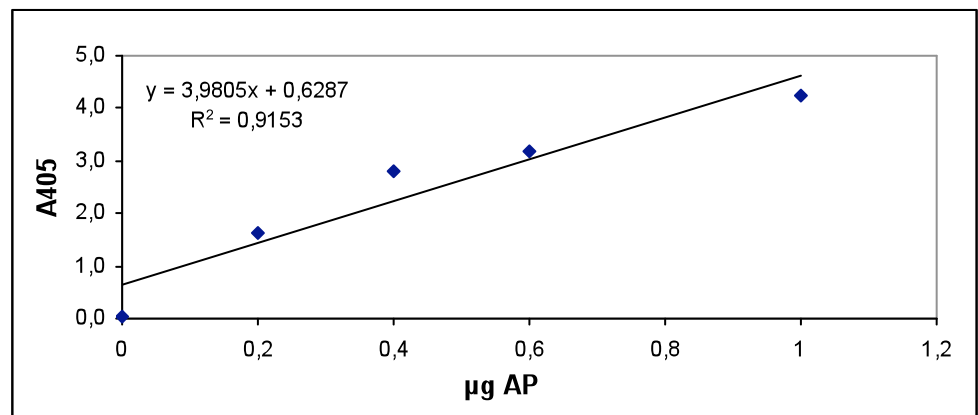
näyte	lisätty foolihappo-AP (μg)	std.suoran mukaan (μg)	%
A, B	0,5	0,349	70
C, D	1	0,709	71
E, F	2	1,296	65

Saantokokeesta saadut tulokset ovat hyvin alustavia ja lisäkokeita tarvitaan laajemmalla pitoisuusalueella. Aiemmin määritetty anti-foolihappovasta-aineen affiniteetti 100 nM on riittävä pylväsmuotoisessa näytteen käsittelyssä, koska siinä muodostuu useita tasapainoja, mutta tämän kokeen yhdessä

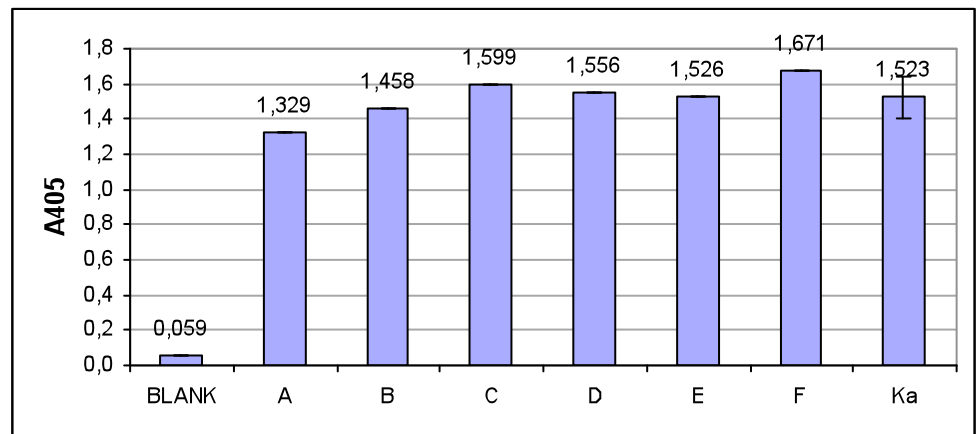
tasapainossa se aiheuttaa saantojen alentumista. Lisäksi näytteen lämmittäminen saattaa vaikuttaa affiniteettiin ja sitä kautta saantoon alentavasti.

4.5.2 Foolihappo-AP:n määrittäminen puskurista

Alkaliseen fosfataasiin konjugoitu foolihappo tartutettiin vasta-ainetta sisältäviin TMLA-helmiin TBS-puskurista. Standardisuora tehtiin kokeen sisäiseksi referenssiksi (kuva 25). Myös muissa kokeissa tehtiin standardisuora samasta syystä, mutta ne on jätetty opinnäytetyön tuloksista pois. TMLA-näytteiden absorbanssit ovat kuvassa 26.



Kuva 25. Alkalisen fosfataasin standardisuora kahdella rinnakkaisella pitoisuuksilla 0 - 1 µg AP



Kuva 26. Foolihappo-AP:n toistettavuuden määrittäminen 100 µl:sta TBS-puskurista kuudella rinnakkaisella

Tilastolliset analyysit (taulukko 3) suoritettiin kohdan 3.6.8 mukaisesti kuudesta rinnakkaisesta näytteestä.

Taulukko 3. Tilastotietoa rinnakkaisten näytteiden hajonnasta

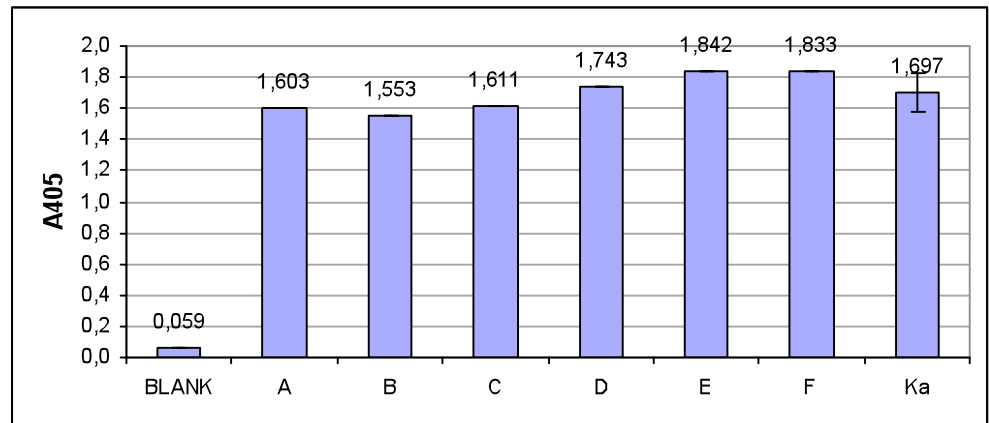
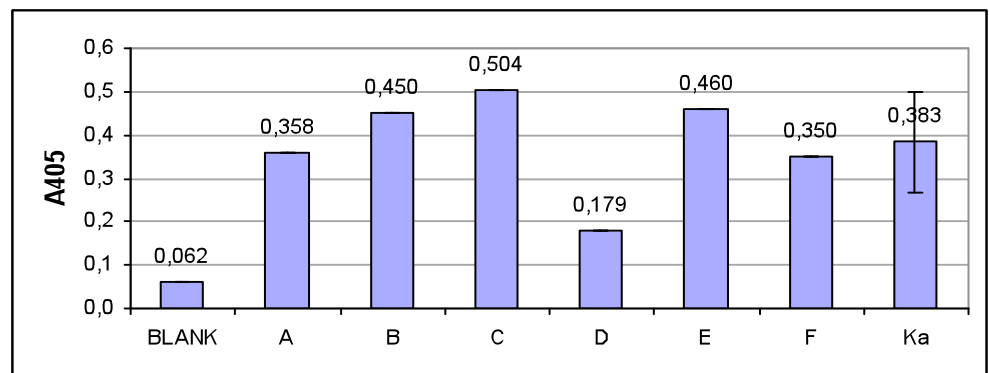
Keskiarvo	1,523
Keskihajonta s	0,119
Keskiarvo $\pm 2s = 1,523 \pm$	0,238
RSD %	8 %

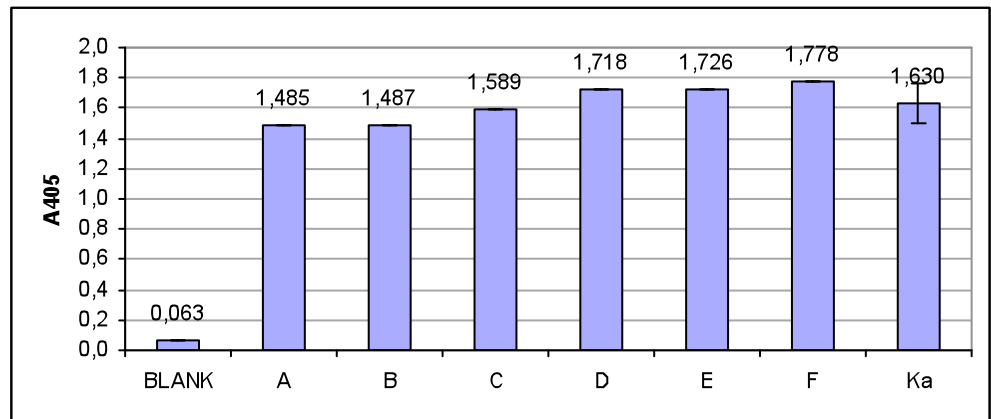
Foolihappo-AP:n tartutus vasta-aineimmobilisoiuihin TMLA-magneettihelmiin TBS-puskurista oli tässä kokeessa melko toistettavaa.

4.5.3 Foolihappo-AP:n määrittäminen kliinisistä matriiseista

Foolihappo-AP tartutettiin vasta-aineimmobilisoiuihin TMLA-magneettihelmiin identtisillä kokeilla kolmesta eri kliinisestä matriisista, seerumista, syljestä ja virtsasta.

Seerumikokeen TMLA-näytteiden vasteet ovat kuvassa 27. Kuvassa 28 näkyvät sylkikokeen tulokset ja virtsakokeen tulokset ovat kuvassa 29.

Kuva 27. Foolihapon toistettavuuden määrittäminen 100 μ l:sta seerumia kuudella rinnakkaisellaKuva 28. Foolihapon toistettavuuden määrittäminen 100 μ l:sta sylkeä kuudella rinnakkaisella



Kuva 29. Foolihapon toistettavuuden määrittäminen 100 µl:sta virtsaa kuudella rinnakkaisella

Tilastolliset analyysit suoritettiin kohdan 3.6.8 mukaisesti kuudesta rinnakkaisesta näytteestä (taulukko 4). Puskurikokeen (4.5.2) tulokset ovat verrokina.

Taulukko 4. Sitoutumissaannot ja tilastolliset analyysit kliinisten matriisien kokeista

	Seerumi	Sylki	Virtsa	Puskuri (4.5.2)
Keskihajonta s	0,125	0,117	0,128	0,119
Keskiarvo ± 2s =	1,697 ± 0,251	0,383 ± 0,234	1,523 ± 0,256	1,523 ± 0,238
RSD %	7 %	31 %	8 %	8 %

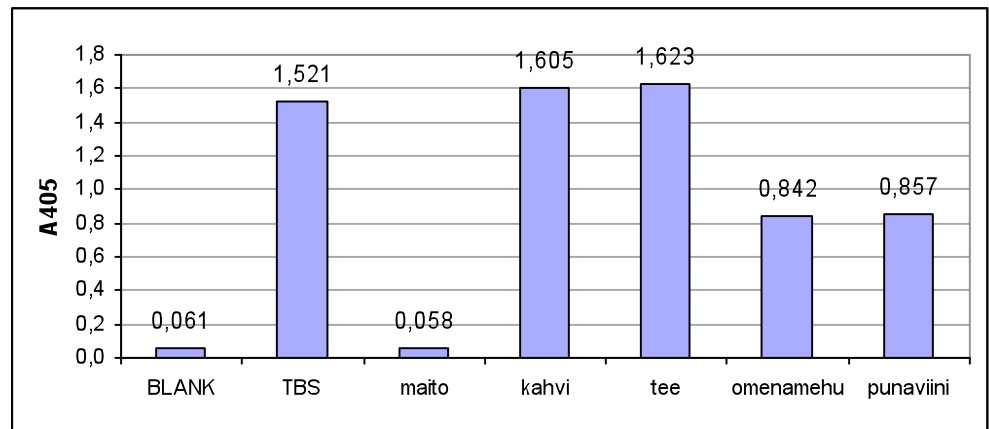
Kliiniset matriisit foolihappo-AP:n määrittämiselle TMLA-magneettihelmillä toimivat hyvin, lukuun ottamatta sylkeä, missä haitaksi muodostui sen fyysinen olemus. Magneettipartikkeleiden peseminen syljestä erilleen oli hankalaa, koska partikkelit eivät päässeet liikkumaan matriisissa täysin vapaasti. Seerumissa ja virtsassa magneettipartikkelit käyttäytyivät kuten TBS-puskurissa. Toistettavuudeltaan TMLA-magneettihelmet soveltuvat tässä systeemissä näytteenkäsittelyyn seerumista ja virtsasta, mutta eivät syljestä.

4.5.4 Foolihappo-AP:n määrittäminen elintarvikematriiseista

Foolihappo-AP:n tarttumista lämpöönreagoiviin magneettisiin nanopartikkeleihin (TMLA) määritettiin elintarvikematriiseista maito, kahvi, tee, omenamehu ja punaviini. Näytematriisien pH-arvoiksi mitattiin taulukossa 5 näkyvät arvot. Luontaisen foolihapon määrää elintarvikematriiseista ei mitattu. Kuvassa 30 ovat elintarvikematriisien vasteet.

Taulukko 5. Elintarvikematriisien pH-arvot

Rasvaton maito	6.7
Kahvi	5.2
Tee	5.8
Omenamehu	3.6
Punaviini	3.6

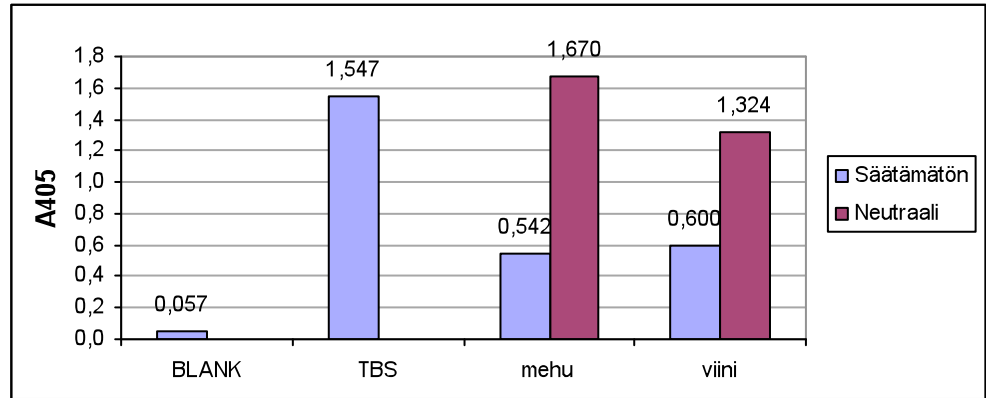


Kuva 30. Foolihappo-AP:n tarttumistehokkuuden määrittäminen 100 µl:sta elintarvikematriiseista

Elintarvikematriiseilla sitoutumisen saannot vaihtelivat runsaasti. Kahvilla ja teellä saannot olivat samaa luokkaa kuin puskurilla, mutta omenamehulla ja punaviinillä saannot olivat alhaisemmat, ja maidosta foolihappo-AP:ta ei kyetty määrittämään. Elintarvikematriiseista maito osoittautui haastavimmaksi, koska jokin maidossa esti magneettipartikkeleita joko kerääntymästä suuremmiksi ryppäiksi tai kiinnittymästä magneettiin. Maidosta ei tällä menetelmällä voida määrittää antigeenin osuutta. Happamissa matriiseissa, omenamehussa ja punaviinissä, pH:n arveltiin vaikuttavan saantotasoihin heikentävästi. Tämän kokeen perusteella foolihappo-AP -pitoisuuksia voidaan määrittää TMLA-magneettihelmillä kahvista ja teestä.

4.5.5 pH:n vaikutus hapteen sitoutumisen saantoon elintarvikematriiseissa

Happaman pH:n arveltiin vaikuttavan heikentävästi TMLA-magneettihelmikokeeseen ja sen vaikutusta testattiin vertaamalla sitoutumisen saantoja happamilla sekä neutraaliksi säädetyillä juomilla. Näytteiden absorbanssit ovat kuvassa 31.

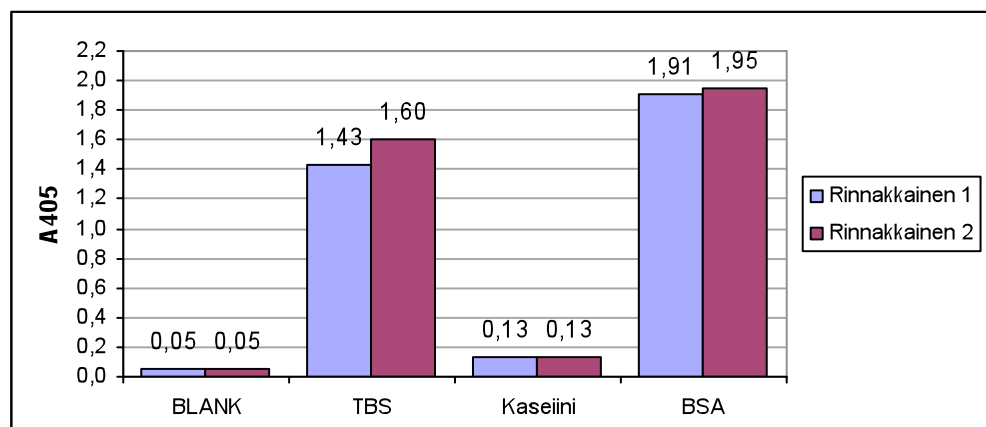


Kuva 31. TMLA-näytteiden absorbanssit säätämättömille ja neutraaleiksi säädetyille elintarvikkeille

Havaittiin suuret erot vasteissa happamien ja neutraalien näytematriisien välillä. Suurten erojen perusteella todettiin, että hapan pH vaikuttaa negatiivisesti TMLA-magneettihelmikokeessa antigeenin tarttumiseen. Alhaiset vasteet happamissa näytteissä saattoivat aiheutua myös alkalisen fosfataasin aktiivisuuden heikentymisestä, mutta sitä ei tässä työssä tutkittu.

4.5.6 Korkean proteiinipitoisuuden vaikutus TMLA-kokeeseen

Koska maidosta ei voitu TMLA-magneettihelmillä määrittää foolihappo-AP:n määrää näytteessä, kokeiltiin johtuuko helmien käyttäytyminen maitoproteiinista vai yleisesti suuresta proteiinimäärästä näytteessä. Foolihappo-AP tartutettiin kaksilla rinnakkaisilla vasta-aineimmobilisoiuihin TMLA-magneettihelmiin kaseiinista ja BSA:sta. Matriiseissa käytetty proteiini-konsentraatio 30.4 mg/ml vastaa arviota maidon kaseiinipitoisuudesta. Vertailukohtana käytettiin TBS-puskuria. Näytteiden absorbanssit ovat kuvassa 32.

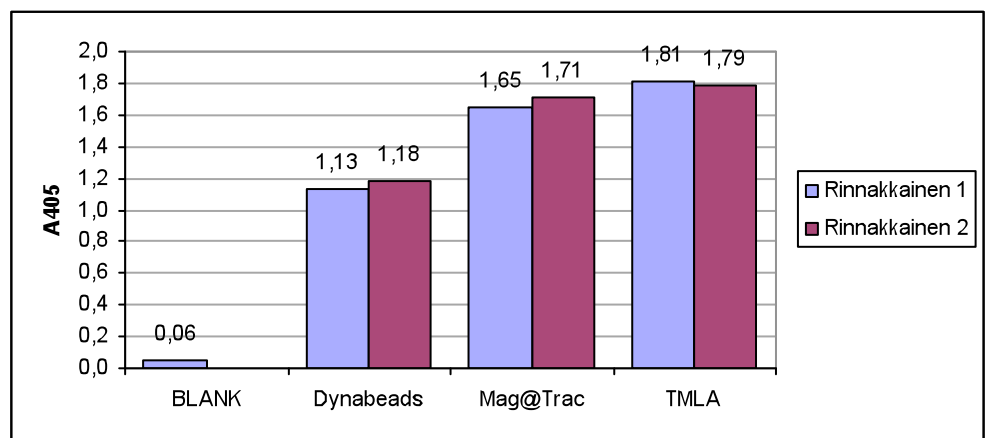


Kuva 32. Foolihappo-AP:n tarttuminen proteiiniliuoksista kahdella rinnakkaisella

Todettiin, että suuri kaseiinimäärä häiritsee TMLA-magneettihelmien toimintaa näytteissä, mutta suuri BSA-proteiinimäärä ei vaikuta kokeeseen heikentävästi.

4.5.7 Lämpöönreagoivien magneettihelmien vertailu Dynabeads- ja Mag@Trac-magneettihelmiin

Lämpöönreagoivia TMLA-nanohelmiä vertailtiin perinteisiin magneettihelmiin. Samaan määrään vasta-aineimmobilisoituja Dynabeads-, Mag@Trac- ja TMLA-helmiä tartutettiin identtiset määrät foolihappo-AP -konjugaattia kaksilla rinnakkasilla. Näytteiden absorbanssit ovat kuvassa 33.



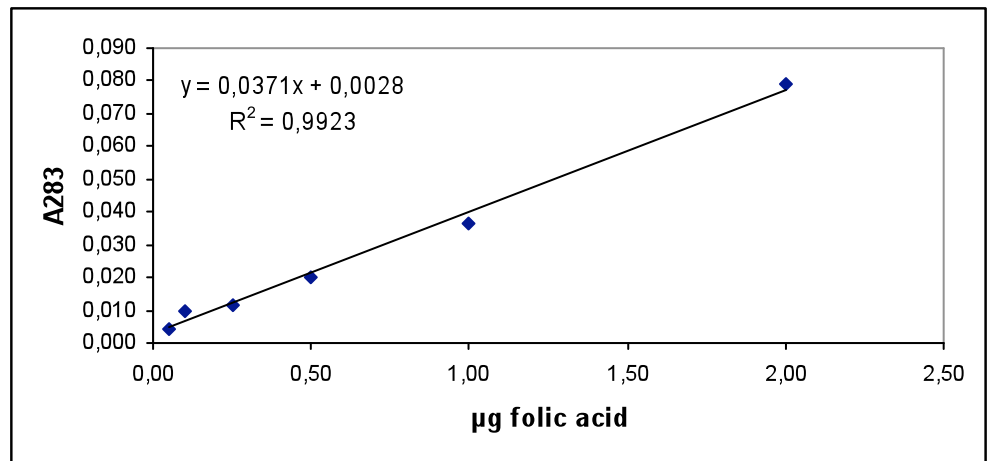
Kuva 33. Foolihappo-AP:n tarttumistehokkuuden määrittäminen eri magneettihelmillä, kahdet rinnakkaiset

Perinteiset magneettihelmet olivat helppokäyttöisempiä kuin lämpöönreagoivat TMLA-helmet, mutta niiden saannot jäivät alhaisemmiksi. TMLA-helmien vasteeseen verrattuna Mag@Trac-helmet olivat 7 % ja Dynabeads-helmet 36 % huonompia. Mag@Trac-helmien pinnalla markkinoidaan olevan enemmän sitoutuneita streptavidinimolekyylejä kuin muilla magneettihelmillä, ja sen saanto oli lähellä TMLA-nanohelmien saantoa. Kooltaan Dynabeads-helmet (2.8 μm) ja Mag@Trac-helmet (0.7 μm) ovat suurempia kuin TMLA-nanohelmet (100 nm). Kokonsa puolesta nanokokoisilla magneettihelmillä saattaisi olla enemmän käyttökohteita.

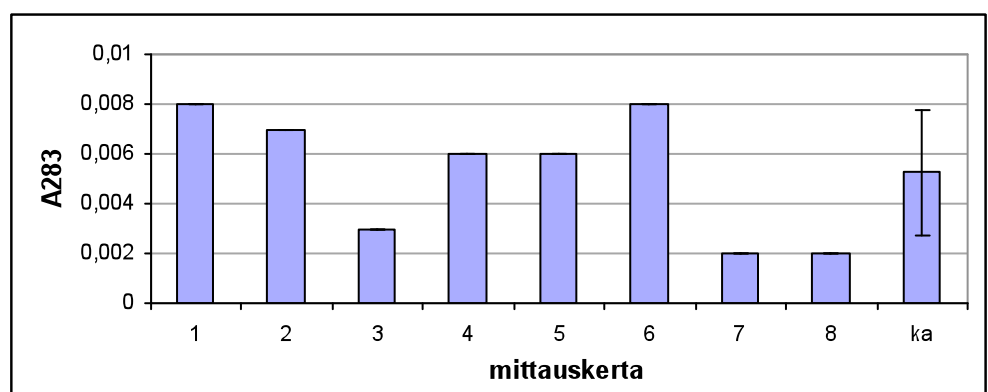
4.6 Foolihapon määrittäminen kapillaarielektroforeesilla

Foolihappo tartutettiin TMLA-magneettihelmiin 100 µl:sta TBS-puskuria ja eluotettiin irti 10 % etanolissa + 65 °C:ssa. Standardisuora 0 - 2 µg tehtiin foolihaposta.

Näytteen ja standardisuorien foolihappopitoisuus määritettiin ennen kapillaarielektroforeesiajoa spektrofotometrisesti myös NanoDrop -spektrofotometrillä. Kaksi rinnakkaista standardisuoraa mitattiin kerran ja näyte kahdeksan kertaa. Standardisuora on kuvassa 34 ja näytteiden absorbanssit kuvassa 35.

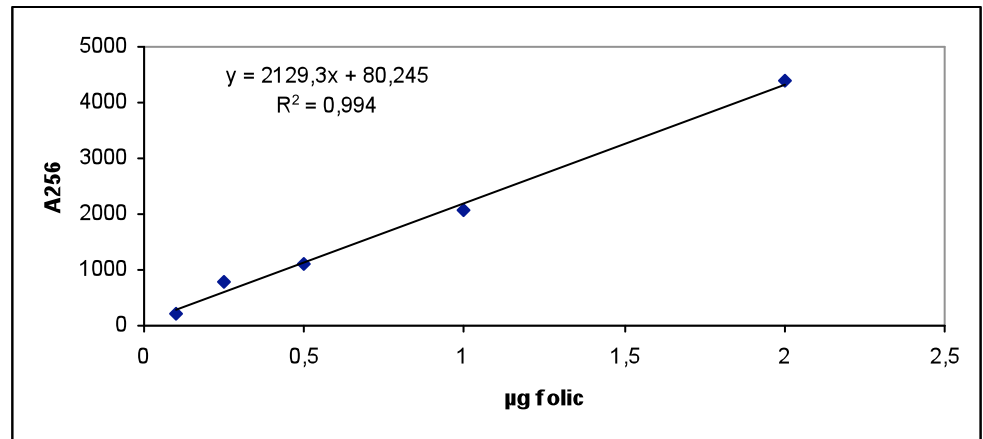


Kuva 34. NanoDrop-laitteella mitattu standardisuora



Kuva 35. NanoDrop-laitteella mitatut absorbanssit näytteelle ja niiden keskiarvo

Kapillaarielektroforeesilla mitattu standardisuora on kuvassa 36.



Kuva 36. Foolihapon standardisuora kapillaarielektroforeesissa 0.1-2 µg kahdella rinnakkaisella

Standardisuorassa alinta pistettä (0.05 µg) ei kyetty detektoimaan kapillaarielektroforeesissa. Myös näytteessä olleen foolihapon määrä oli liian pieni detektoitavaksi. Liitteessä 3 näkyy spektrit korkeimmasta standardista (2 µg, alempi spektri) ja näytteestä (ylempi spektri) aallonpituudella 256 nm, joka antoi ajon korkeassa pH:ssa suuremman vasteen kuin aallonpituus 283 nm. Näytteen spektristä voidaan kuitenkin havaita hyvin pieni piikki samassa kohdassa, kuin standardissa olevan foolihapon piikki sijaitsee.

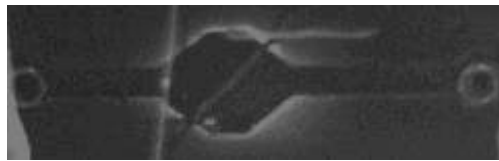
NanoDrop-laitteella näytteelle mitattujen tulosten keskiarvosta voidaan laskea standardisuoran avulla foolihappopitoisuus 0.078 µg (RSD 50 %). Näytteiden hajonta johtuu foolihapon hyvin pienestä määrästä näytteessä.

TMLA-helmien käyttöä näytteenkäsittelyssä ennen kapillaarielektroforeesia tulee optimoida lisää, jotta voidaan saada todellisia tuloksia. Helmet sitovat kuitenkin verrattain vähän vasta-ainetta, jolloin myös antigeenin määrä jää vähäiseksi ja hankalaksi detektoida. Tästä syystä näytteenkäsittelyssä tulisi käyttää suurta määrää kalliita helmiä.

Eluointiprosentti foolihapolle TMLA-helmistä oli tässä kokeessa noin 30 % NanoDrop-laitteella mitatun tuloksen perusteella. Myös eluutiolosuhteet tulee optimoida, jotta voidaan saavuttaa mitattavia määriä analyyyttiä.

4.7 TMLA-magneettihelmien käyttäytyminen piisirulla

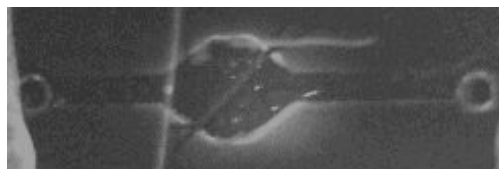
TMLA-magneettihelmien käyttäytymistä testattiin lämmitettävällä piisirulla. Tyhjä siru detektoitiin lasersäteellä (kuva 37). Fluoresoivien TMLA-magneettihelmien injektoimisen jälkeen kammio detektoitiin uudelleen (kuva 38). Fluoresenssi erottui selvästi ja voitiin todeta magneettihelmien olevan kammiossa. Magneettihelmet poistettiin kammioista käynnistämällä kylmän puskurin virtaus. Todettiin fluoresenssin häviävän kammioista. Detektoitiin kammio puskurivirtauksen jälkeen (kuva 39). Fluoresenssin todettiin lähteneen puskurin mukana lähes kokonaan.



Kuva 37. Tyhjä kammio



Kuva 38. Fluoresenssin detektointi kammiossa



Kuva 39. Tyhjäksi huuhdeltu kammio

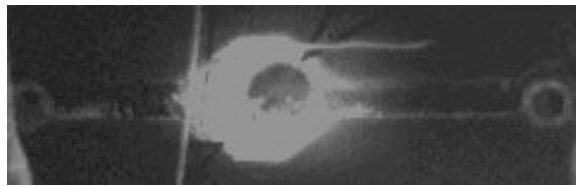
Testattiin TMLA-magneettihelmien käyttäytymistä piisirulla magneetin kanssa. Injektoitiin magneettihelmet sirulle ja lämmön sekä magneetin avulla pidettiin niitä kammiossa samalla kun huuhdeltiin sirua puskurilla. Helmet voitiin nähdä fluoresenssina kammiossa sekä ennen magneetin asettamista että huuhtelun jälkeen. Kuvassa 40 helmet kammiossa huuhtelun jälkeen.

Sirua huuhdeltiin puskurilla hitaalla virtauksella, mutta fluoresenssi ei vähentynyt kammiossa. Edes virtausnopeuden nosto maksimiin ei poistanut fluoresenssia kammioista (kuva 41). Tarttumista sirun kanavien pintaan pyrittiin eh-

käisemään käyttämällä Tween 20 -pinta-aktiivista ainetta puskurissa, mutta silti jokin fluoresenssileimassa tarttui kanavaan mahdollisesti lämmityksen tai ajan vaikutuksesta.



Kuva 40. Magneettihelmet kammiossa



Kuva 41. Fluoresenssi kammiossa huuhtelun jälkeen

Mikrosiruilla tullaan jatkamaan testejä termoresponsiivisten nanopartikkeleiden kanssa. Alkutavoitteena on estää fluoresenssin tarttuminen sirun pintoihin jonkinlaisella pinnoitteella tai lisäaineella. Myös leimattuja antigeenejä tullaan kokeilemaan sekä tutkimaan lisää magneettisten partikkeleiden käyttäytymistä sirulla.

5 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli kehittää termoresponsiivisiin magneettisiin nanopartikkeleihin perustuva näytteenkäsittelymenetelmä miniatyrisoituja analyysilaitteita varten. Työssä käytettiin vasta-ainefragmentteja mallimolekyylien määrittämiseen näytematriiseista.

Työ aloitettiin tuottamalla anti-foolihappovasta-aine (Fab) pienimuotoisessa kasvatuksessa ja puhdistamalla se onnistuneesti metalliaffiniteetikromatografian avulla. Vasta-aineen tuottotaso ja puhtaus kromatografian jälkeen todettiin riittäviksi analyysihin. Vasta-aine biotinyloitiin ja mallimolekyyli foolihappo konjugoitiin alkalinen fosfataasi -entsyymiin.

Analyysisysteemiä optimoitiin ennen varsinaisia määryksiä. Alkaliselle fosfataasille etsittiin inhibiittori, jotta entsyymireaktio kyettiin pysäyttämään samanaikaisesti sekä näytteissä että standardisuorassa. Todettiin natriumdiveytyfosfaatin inhiboivan reaktiota. Vasta-aineen affiniteetin vaikutusta sitoutumisen saantoon testattiin kahden eri vasta-aineen avulla. Osoittautui, että saannot laskivat noin puoleen heikomman affiniteetin omaavalla anti-mykofenolihappovasta-aineella kuin anti-foolihappovasta-aineella. Tästä syystä jatkokokeissa päädyttiin käyttämään anti-foolihappovasta-ainetta, jolla oli parempi affiniteetti. Magneettihelmien määrän vaikutusta niiden käytettävyyteen tarkasteltiin kolmella eri määrällä, 10, 25 ja 50 μl :lla. Päädyttiin käyttämään 25 μl :aa, koska se oli helpompi käsitellä tässä systeemissä kuin 10 μl ja rinnakkaiset olivat toistettavampia. Käytettäessä 50 μl helmiä, ne puolestaan antoivat heti voimakkaan vasteen, mikä vaikeutti koejärjestelyjä.

Foolihappo-AP -konjugaattia määritettiin erilaisista näytematriiseista TMLA-magneettihelmillä. Kliinisistä matriiseista seerumissa ja virtsassa magneettihelmien käyttäytyminen systeemissä oli verrattavissa puskurikontrolliin, mutta viskositeettinsa takia TMLA-magneettihelmien kerääminen magneettiin oli hyvin hankalaa, joten niiden käyttö käsittelemättömälle syljelle on vaikeaa. Elintarvikematriiseissa foolihappo onnistuttiin määrittämään puskuriin verrattavalla tasolla kahvista ja teestä, sekä pH:ltaan neutraaleiksi säädetyistä omenamehusta ja punaviinistä. Alhainen pH vaikutti saantoihin alentavasti.

Todettiin myös maitoproteiinin vaikuttavan radikaalisti TMLA-magneettihelmien käyttäytymiseen eikä foolihappo-AP -konjugaattia voitu tällä menetelmällä määrittää maidosta. Kun TMLA-magneettihelmiä vertailtiin perinteisiin magneettihelmiin, havaittiin nanokokoisten lämpöönreagoivien helmien antavan parhaan saannon.

TMLA-helmillä testattiin myös näytteenkäsittelyä kapillaarielektroforeesia varten. Vasta-aineimmobilisoitujen helmien avulla tartutetun ja niistä irrotetun foolihapon määrä tutkittiin ensin NanoDrop-spektrofotometrillä ja sen jälkeen kapillaarielektroforeesilla standardisuoran avulla. Foolihapon pieni pitoisuus aiheutti spektrofotometrillä mitattuna suuren hajonnan ja kapillaarielektroforeesilla sitä ei saatu lainkaan näkyviin. Näytteenkäsittelyn ja eluution olosuhteita tullaan optimoimaan lisää, jotta foolihapon määrittäminen kapillaarielektroforeesilla olisi mahdollista.

Piisirulle vietyinä TMLA-magneettihelmet saatiin kulkemaan kanavassa, mutta ongelmaksi muodostui fluoresenssin kiinnittyminen kammion seiniin. Jatkokokeissa etsitään erilaisia pinta-aktiivisia aineita estämään pintoihin kiinnittymistä sekä testataan foolihapon tartutusta vasta-aineimmobilisoiuihin magneettihelmiin sirulla.

Työssä keskityttiin tutkimaan uusien termoresponsiivisten magneettisten nanopartikkeleiden soveltuvuutta näytteenkäsittelyyn. Kirjallisuudessa näistä nanopartikkeleista raportoitiin ensimmäistä kertaa vuonna 1994 [25] ja niitä on käytetty esimerkiksi tiettyjen solujen erotukseen [26]. Näiden partikkeleiden soveltuvuutta näytteenkäsittelyyn ei ole aiemmin näin systemaattisesti tutkittu ja raportoitu. Myöskään vertailua perinteisiin magneettipartikkeleihin ei ole tehty. Tämä opinnäytetyö tuo paljon uutta tietoa näiden partikkeleiden soveltuvuudesta näytteenkäsittelyyn.

Tutkimusta TMLA-magneettihelmillä tullaan jatkamaan testaamalla saantoja suuremmista tilavuuksista erilaisia matriiseja, ja liuosmuotoisista matriiseista siirrytään kiinteämpiin, kuten soseisiin. Myös paremman affiniteetin vasta-aineita saatetaan ottaa kokeiluun. Mikrosirutestit jatkuvat eluutiokokeilla, sekä kapillaarielektroforeesin olosuhteita tullaan optimoimaan.

VIITELUETTELO

- [1] Abbas, A. K. – Lichtman, A. H., *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Science, USA, 1991.
- [2] Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. Centers for Disease Control, *MMWR* 41 (No. RR-14), 1992.
- [3] Hoffpauer, D. W. – Bonnette, R. E., Enrichment update on folic acid. *Cereal Foods World*, W-1998-0424-02F, USA, 1998.
- [4] Elbarbry, F. A. – Shoker, A. S., Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clinical Biochemistry* 40 (2007), s. 752 - 764.
- [5] Janeway, A. – Travers, P. – Walport, M. – Shlomchik, M., *Immuno Biology*, 6th edition. USA, 2005.
- [6] Walsh, G., *Pharmaceutical Biotechnology - Concepts and Applications*. England, 2007.
- [7] Schumann, W. – Ferreira, L., Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology* 27 (2004), s. 442 - 453.
- [8] Arnau, J., Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 48 (2006), s. 1 - 13.
- [9] Kågedal, L., Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Purification: Principles, high-resolution methods, and applications, second edition*. Ed. Janson, Jan-Christer, Rydén, Lars. Wiley-VCH, 1998.
- [10] Cretich, M. ym., Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions. *Biomolecular Engineering* 23 (2006), s. 77 - 88.
- [11] Hirsch, J. D. – Haugland, R. P.: Conjugation of antibodies to biotin, Ed. Burns, Robert, *Immunochemical Protocols, Third Edition*. Humana Press, USA, 2005.
- [12] Pérez, F. G. – Mascini, M., Immunomagnetic separation with mediated flow injection analysis amperometric detection of viable *Escherichia coli* O157. *Analytical Chemistry* 70 (1998), s. 2380 - 2386.
- [13] Chu, P. ym., Development of a rapid and sensitive immunomagnetic-bead based assay for detecting *Bacillus cereus* in milk. *European Food Research and Technology* 229 (2009), s. 73 - 81.
- [14] Bhattarai, S. R. ym., Laboratory formulated magnetic nanoparticles for enhancement of viral gene expression in suspension cell line. *Journal of Virological Methods* 147 (2008), s. 213 - 218.

- [15] Lichtenberg, J. – de Rooji, N. F. – Verpoorte, E., Sample pre-treatment on microfabricated devices. *Talanta* 56 (2002), s. 233 - 266.
- [16] Ríos, A. ym., Challenges of analytical Microsystems. *Trends in Analytical Chemistry* 25, no 5 (2006), s. 467 - 479.
- [17] Wingren, C. – Borrebaeck, C., Antibody microarray analysis of directly labelled complex proteomes. *Current Opinion in Biotechnology* 19 (2008), s. 55 - 61.
- [18] Korpinmäki, T. ym., Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. *Protein Engineering* 16 (2003), s. 37 - 46.
- [19] Ewert, S. – Honegger, A. – Plückthun, A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34 (2004), s. 184 - 199.
- [20] Herr, A. ym., Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *PNAS* 104 (2007), s. 5268 - 5273.
- [21] Chazan, A., *Peptide Calculator version 1.00*. Center for Biotechnology, Northwestern University, Evanston, USA. [verkkolähde, viitattu 29.7.2009]. Saatavissa: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>.
- [22] *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Twelfth Edition*, ed. Budavari, Susan. Merck & Co Inc, USA, 1996.
- [23] Rasvaton maito, ravintoarvot. Fineli, Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, ravitsemusyksikkö. [verkkolähde, viitattu 2.10.2009]. Saatavissa: <http://www.fineli.fi/>.
- [24] Hokkanen, Ari, erikoistutkija, VTT. Re: Piisirujen dimensiot [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Niina Vähäkainu. Lähetetty 14.10.2009 [viitattu 15.10.2009].
- [25] Kondo, A. – Kamura, H. – Higashitani, K., Development and application of thermo-sensitive magnetic immunomicrospheres for antibody purification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (1994), s. 99 - 105.
- [26] Hoshino, A. ym., Separation of murine neutrophils and macrophages by thermoresponsive magnetic nanoparticles. *Biotechnology Progress* 23 (2007), s. 1513 - 1516.

Kokeissa käytetyt liuoksetProteiinin tuotto

LB - Luria Broth (Yeast Extract 5 g, Tryptone 10 g, NaCl 10 g, Agar BiTek 15 g, tot.vol. 1000 ml)

TB - Terrific Broth (Tryptone 12 g, Yeast extract 24 g, Glycerol (87%) 4 ml, tot.vol. 900 ml)

Ampisilliini, 100 mg/ml in 40 % EtOH, steriilisuodatettu.

IPTG (Isopropyl b-d thiogalactopyranoside), 1 M

Proteiinin puhdistus ja karakterisointi

4 x LSB (29 ml DDIW, 5 ml 1 M Tris pH 6.8, 11.6 ml 87% Glycerol, 2 g SDS, 10 mg Bromphenol blue)

4 x LSB + β -Me (24 ml DDIW, 5 ml 1 M Tris pH 6.8, 11.6 ml 87% Glycerol, 2 g SDS, 10 mg Bromphenol blue, 5 ml β -Mercaptoethanol)

Western Blotting

Buffer (20 % Ethanol, 192 mM Glycine, 25 mM Tris)

Colour Reaction (66 μ l NBT, 33 μ l BCIP, 10 ml AP-buffer)

AP-puskuri (100 mM Tris pH9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)

Puskurit

RB - 10 x Running Buffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycine, tot. vol 2000 ml in DDIW)

2 x tartutuspuskuri (20 mM HEPES pH 7.4, 0,4 M NaCl, 2 mM Imidazole pH 7.4, 20 % Glycerol)

2 x peruspuskuri (20 mM HEPES pH 7.4, 2 M NaCl, 20 % Glycerol)

Pesupuskurit (1 x peruspuskuri, imidatsolipitoisuus 1 - 20 mM)

Eluointipuskurit (1 x peruspuskuri, imidatsolipitoisuus 50 -500 mM)

10 x PBS - Phosphate Buffered Saline (0.12 M Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 0.03 M NaH₂PO₄ · H₂O, 1.5 M NaCl, tot.vol. 2000 ml in DDIW, pH 6.65)

10 x TBS - Tris-Buffered Saline (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, tot.vol 5000 ml in DDIW)

TBST (1 x TBS, Tween 20)

Kokeiden mittaustulokset taulukoituina4.1.1 Anti-foolihappovasta-aineen tuotto

Taulukko: Escherichia coli -bakteerin kasvuliuksen absorbanssiarvot tunteina kasvatuksen alkamisesta

aika / h	laimennos-suhde	OD600	
		laim.	1:1
3	1:2	0,321	0,642
4	1:3	0,601	1,803
5	1:5	0,927	4,635
5,5	1:5	1,199	5,995
5,75	1:5	1,382	6,91
6	1:10	0,759	7,59
6,25	1:10	0,842	8,42
6,5	1:10	0,864	8,64

4.1.2 Proteiinintuoton fraktioiden proteiinipitoisuudet**Pesuliukset**

	A560
effluentti	0,923
1 mM	0,522
1 mM	0,195
10 mM	0,112
10 mM	0,118
10 mM	0,103
25 mM	0,110
25 mM	0,111

Eluutiot

	A560
50 mM	0,106
50 mM	0,107
75 mM	0,118
75 mM	0,155
100 mM	0,174
100 mM	0,192
200 mM	0,196
200 mM	0,189
500 mM	0,186
500 mM	0,149

4.2 Vasta-aineen biotinylointi

Taulukko 6. BSA-standardisuora aallonpituudella 560 nm

$\mu\text{g/ml}$	A560
0	0,080
25	0,092
125	0,140
250	0,190
500	0,279
1000	0,357
2000	0,542

Taulukko 7. Biotinyloidun vasta-aineen fraktioiden absorbanssit

fraktio	A560	$\mu\text{g/ml}$ suoran avulla
1	0,206	460
2	0,358	1220
3	0,521	2035
4	0,629	2575
5	0,707	2965
6	0,680	2830
7	0,754	3200
8	0,742	3140
9	0,596	2410
10	0,426	1560
11	0,267	765
12	0,172	290
13	0,138	120

Taulukko: Biotinyloinnin varmistus ELISA-testillä (absorbanssiarvot aallonpituudella 405 nm)

	60 min
Folic 300 ng	0,906
Folic 300 ng	0,664
Folic 100 ng	0,268
Folic 100 ng	0,292
MPA 300 ng	0,199
MPA 100 ng	0,176
Blank	0,076
Blank	0,153

4.3 Mallimolekyyli-proteiinikonjugaatin fraktioiden BCA

Standardisuora 1	
mg/ml	A560
0	0,078
1	0,246
2	0,493
3	0,623
4	0,742
5	0,878

Fraktiot	A560	mg/ml AP-stand
1	0,080	-0,179
2	0,087	-0,135
3	0,251	0,887
4	0,623	3,204
5	0,727	3,852
6	0,397	1,796
7	0,183	0,463
8	0,130	0,133
9	0,098	-0,067
10	0,092	-0,104
11	0,099	-0,060
12	0,116	0,045
13	0,141	0,201
14	0,169	0,376
15	0,184	0,460

Standardisuora	
mg/ml	A560
0	0,082
1	0,332
2	0,546
3	0,713
4	0,872
5	1,047

4.4.1 Alkalisen fosfataasin inhibitio NaH₂PO₄:lle

Taulukko 8. Alkalisen fosfataasin värinmuodostus eri aikapisteissä aallonpituudella 405 nm (inhibiittorina NaH₂PO₄ ja koe ilman helmiä)

min	vesi	M NaH ₂ PO ₄				
		0,05	0,063	0,1	0,25	0,5
5	0,656	0,268	0,267	0,249	0,246	0,239
7	0,867	0,311	0,303	0,273	0,260	0,245
9	1,081	0,356	0,343	0,298	0,267	0,251
11	1,281	0,398	0,380	0,321	0,276	0,252

Taulukko: AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm (koe helmien kanssa)

µg AP	heti	5 min	20 min
1	3,747	3,751	3,748
0,5	2,557	2,543	2,551
0,25	1,468	1,463	1,467
0,125	0,765	0,765	0,767
0,0625	0,286	0,287	0,291
0,03125	0,194	0,198	0,201

Taulukko: TMLA-näytteiden absorbanssit aallonpituudella 405 nm

	heti	5 min	20 min
25 µl	2,796	2,914	2,925
10 µl	1,703	1,694	1,697

4.4.2 Vasta-aineen affiniteetin vaikutus sitoutumisen saantoon

Taulukko 9. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm

µg AP	A405
1	4,383
0,5	2,896
0,25	1,550
0,125	0,995
0,0625	0,522
0,03125	0,275

Taulukko 10. MPA- ja anti-foolihappovasta-aineiden vertailu

	A405
MPA	1,967
MPA	1,842
Folic	3,797
Folic	3,841

4.5.1 Foolihappo-AP:n sitoutumisen saannon määrittäminen

Taulukko 11. AP-standardisuoran absorbanssit suurten pitoisuuksien kokeessa

µg AP	A405
2	4,581
1	3,446
0,6	2,363
0,4	1,547
0,2	0,894
0	0,050

Taulukko 12. TMLA-kokeen tulokset suuremmille pitoisuuksille

		SUM (A405)
BLANK		0,114
A	0,5	1,292
B	0,5	1,407
C	1	2,496
D	1	2,652
E	2	4,494
F	2	4,636

4.5.2 Foolihappo-AP:n tartutus puskurista

Taulukko: AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm

ug AP	A405
2	4,688
1	4,246
0,6	3,166
0,4	2,802
0,2	1,635
0	0,053

Taulukko: TMLA-näytteiden absorbanssiarvot puskurista aallonpituudella 405 nm

	A405	keskihajonta
puskuri	0,059	0
A	1,329	0
B	1,458	0
C	1,599	0
D	1,556	0
E	1,526	0
F	1,671	0
A - F	1,523	0,119

4.5.3 Foolihappo-AP:n määrittäminen kliinisistä näytteistä

Seerumi

Taulukko 13. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm

µg AP	A405
2	5,722
1	4,278
0,6	3,042
0,4	2,630
0,2	1,754
0	0,052

Taulukko 14. TMLA-näytteiden absorbanssiarvot seerumista aallonpituudella 405 nm

	A405	hajonta
puskuri	0,059	0
A	1,603	0
B	1,553	0
C	1,611	0
D	1,743	0
E	1,842	0
F	1,833	0
A - F	1,697	0,125

Sylki*Taulukko 15. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm*

$\mu\text{g/ml}$	A560
2	4,699
1	4,249
0,6	3,071
0,4	2,690
0,2	1,976
0	0,050

Taulukko 16. TMLA-näytteiden absorbanssiarvot syljestä aallonpituudella 405 nm

	A405	hajonta
puskuri	0,062	0
A	0,358	0
B	0,450	0
C	0,504	0
D	0,179	0
E	0,460	0
F	0,350	0
A - F	0,383	0,117

Virtsä*Taulukko 17. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm*

$\mu\text{g AP}$	A405
2	4,579
1	4,063
0,6	3,159
0,4	2,610
0,2	1,595
0	0,054

Taulukko 18. TMLA-näytteiden absorbanssiarvot virtsasta aallonpituudella 405 nm

	A405	hajonta
puskuri	0,063	0
A	1,485	0
B	1,487	0
C	1,589	0
D	1,718	0
E	1,726	0
F	1,778	0
A - F	1,630	0,128

4.5.4 Foolihapon tartutus elintarvikematriiseista*Taulukko 19. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm*

$\mu\text{g AP}$	A405
2	4,480
1	4,181
0,6	3,169
0,4	2,765
0,2	1,433
0	0,049

Taulukko 20. TMLA-näytteiden absorbanssiarvot elintarvikematriiseista aallonpituudella 405 nm

		A405
	BLANK	0,058
A	TBS	1,382
B	maito	0,085
C	kahvi	1,324
D	tee	1,619
E	omenamehu	0,763
F	punaviini	1,568

4.5.5 pH:n vaikutus hapteenin sitoutumisen saantoon elintarvikematriiseilla

Taulukko 21. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm.

$\mu\text{g AP}$	A405
2	5,260
1	4,251
0,6	3,266
0,4	2,437
0,2	1,634
0	0,051

Taulukko 22. TMLA-näytteiden absorbanssit elintarvikenäytteille.

		A405
puskuri	BLANK	0,057
A	TBS	1,547
B	mehu	0,542
C	mehu pH-säätö	1,670
D	viini	0,600
E	viini ph-säätö	1,324

4.5.6 Korkean proteiinipitoisuuden vaikutus TMLA-kokeeseen

Taulukko 23. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm.

$\mu\text{g AP}$	A405
2	4,040
1	3,585
0,6	3,549
0,4	2,933
0,2	1,938
0	0,050

Taulukko 24. TMLA-näytteiden absorbanssit proteiiniliuoksista.

		A405
	BLANK	0,054
A	TBS	1,434
B	TBS	1,598
C	Kaseiini	0,127
D	Kaseiini	0,134
E	BSA	1,912
F	BSA	1,947

4.5.7 Lämpöönreagoivien magneettihelmien vertailu Dynabeads- ja Mag@Trac -magneettihelmiin

Taulukko 25. AP-standardisuoran absorbanssit aallonpituudella 405 nm.

$\mu\text{g AP}$	A405
2	4,370
1	3,957
0,6	3,315
0,4	2,741
0,2	1,788
0	0,058

Taulukko 26. Absorbanssiarvot eri magneettihelmille.

		A405
BLANK		0,057
Dynabeads	A	1,129
Dynabeads	B	1,180
Mag@Trac	C	1,654
Mag@Trac	D	1,711
TMLA	E	1,815
TMLA	F	1,788

4.6 Foolihapon määrittäminen kapillaarielektroforeesilla

Taulukko 27. Standardisuorasta mitatut arvot kapillaarielektroforeesijossa.

$\mu\text{g folic}$	tmigr	area	height
0,05	-	-	-
0,1	14,746	206	63
0,25	14,975	802	188
0,5	15,15	1124	308
1	15,325	2075	628
2	15,488	4392	1255

Foolihapon spektri kapillaarielektroforeesissa
(Ylempänä näyte, alempana foolihapon standardi 2 µg)

