

Tanja Vesikukka

**ELEKTROKEMIALLISEN PIKA-ANALYTIKKASOVELLUKSEN
KEHITTÄMINEN**

ELEKTROKEMIALLISEN PIKA-ANALYTIKKASOVELLUKSEN KEHITTÄMINEN

Tanja Vesikukka
Opinnäytetyö
Kevät 2015
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, laboratorioanalytiikan suuntautumisvaihtoehto

Tekijä: Tanja Vesikukka

Opinnäytetyön nimi: Elektrokemiallisen pika-analytiikkasovelluksen kehittäminen

Työn ohjaaja(t): Matti Nieminen, Marja Nissinen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2015

Sivumäärä: 35 + 2 liitettä

Tämä opinnäytetyö liittyy BioPrint -projektiin ja sen tavoitteena oli amylaasisensorin biomusteen optimointi. Biomusteen optimoinnilla pyrittiin löytämään mahdollisimman hyvin sensorin pinnalla toimiva entsyymiseos. Amylaasisensorikehitys tähtää pika-analytiikkamenetelmään, jolla pystyttäisiin mittaamaan stressimarkkerina toimivan α -amylaasientsyymin pitoisuus syljestä. Nykyisin stressihormonien, kuten kortisolin ja noradrenaliinin, määrittäminen tehdään verikokeilla. Syljen α -amylaasia mittaavalla pika-analytiikkamenetelmällä voitaisiin korvata ainakin osa kalliista verikokeista.

Työssä käytettiin BioPrint -projektissa silkipainotekniikalla valmistettuja sensoreita. Työ toteutettiin mittaamalla entsyymikäsiteltyjä painettuja sensoreita potentiostaatilla käyttämällä näytteinä maltoosi- ja α -amylaasistandardeja. Saadut mittaustulokset käsiteltiin Excel-taulukko-ohjelman avulla graafiseen muotoon. Tuloksia analysoitiin ja vertailtiin keskenään.

Maltoosistandardien mittaustuloksista voitiin päätellä, että sensorille kuivatut kolmen entsyymin seokset toimivat eri muovialustoille valmistetuilla sensoreilla. Entsyymiseosten paremmuudesta ei saatu täyttä varmuutta, koska niiden toimivuuteen vaikuttaa myös sensoreiden muovialusta eikä kaikkia entsyymiseoksia voitu testata samalle muovialustalle painetuilla sensoreilla. Alfa-amylaasistandardien mittauksista saatiin selville, että amylaasisensorin valmistus vaatii vielä optimointia, jotta α -amylaasientsyymin mittaaminen saadaan toimimaan sensorilla halutulla tavalla.

Vanhenevuustestauksissa vertailtiin eri säilytysmenetelmien ja entsyymiseokseen eroja. Säilytysmenetelmien vertailussa selvisi, että amylaasisensorit säilyivät parhaiten vakuumpakkauksessa jääkaapissa riippumatta entsyymiseoksesta. Eri entsyymiseosten välillä ei ollut suurta eroa säilyvyydessä.

Asiasanat: Amylaasisensori, biomuste, elektrokemiallinen biosensori

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 ELEKTROKEMIAALLISET SENSORIT	8
2.1 Biosensorit	10
2.2 Entsyymien toiminta amylaasisensorilla	11
3 SENSOREIDEN VALMISTUS JA TESTAUS	13
3.1 Perussensorit	13
3.2 Biosensoreiden valmistus	14
3.3 Sensoreiden mittaaminen	14
3.4 Sensoreiden optimointi eri standardiliuoksilla	15
3.5 Mittauksissa käytettävät välineet ja liuokset	16
4 BIOSENSOREIDEN KEHITYSTYÖN TULOKSET	18
4.1 Näytteen inkubaatioajan optimointi	19
4.2 Glutarittoman sensorin uudelleen käyttö	20
4.3 Biomusteiden koostumuksen optimointi maltoosistandardilla	20
4.3.1 Entsyymiseokset 2 ja 17	21
4.3.2 Entsyymiseos nro 8	23
4.3.3 Entsyymiseos nro 9	23
4.4 Neljän eri entsyymiseoksen yhteenveto	24
4.5 Vanhenemistestaukset	25
4.5.1 Olosuhteiden vaikutus sensoreiden säilyvyyteen	25
4.5.2 Entsyymiseoksen vaikutus säilyvyyteen	27
4.6 Alfa-amylaasi standardit	29
5 MITTAUSTULOSTEN ANALYSOINTIA	30
5.1 Inkubaatioajan optimointi	30
5.2 Entsyymiseosten vertailu	30

5.3 Vanhenemistestaukset	31
5.4 A-amylaasistandardi mittaukset	31
6 YHTEENVETO	32
LÄHTEET	34
LIITTEET	
KÄYTETYT REAGENSIT	
LIUOSTEN VALMISTAMINEN	

SANASTO

α -GD	α -glukosidaasi entsyymi
Biomuste	Entsyyminseos. Tässä työssä entsyymien lisäksi oli mukana kantajaproteiinia BSA:a tai ovalbumiinia, Tween20:a sekä PBS-puskuria.
Biosensori	Laite, joka havaitsee biokemiallisten reaktioiden tuottaman sähkö-, lämpö- tai optisen signaalin (IUPAC)
BSA	Bovine Serum Albumin. Seerumin albumiini, proteiini, jota eristetään nautaeläimistä
GOX	Glukoosioksidaasi entsyymi
MUT	Mutarotaasi entsyymi
Ovalbumiini	Proteiini, jota eristetään kananmunien valkuaisista
PB	Prussian Blue, preussinsininen, käytetään mediaattorina työelektrodilla
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuriliuos
Potentiostaatti	Mittalaite, jolla mitataan syntyvää virtaa
Tween	Polyoksietyleni sorbitoli esteri on viskoosinen neste, jota käytetään emulgaattorina.

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö liittyy BioPrint -projektissa painettujen sensorien ja amylaasisensorien kehitystyöhön. BioPrint -projekti on Oulun ammattikorkeakoulun Tekniikan yksikön, Oulun yliopiston mikroelektroniikan ja materiaalfysiikan laboratorien ja VTT:n yhteishanke, jota ovat olleet rahoittamassa Euroopan unioni, osallistuja organisaatiot sekä pienet ja keskisuuret yritykset.

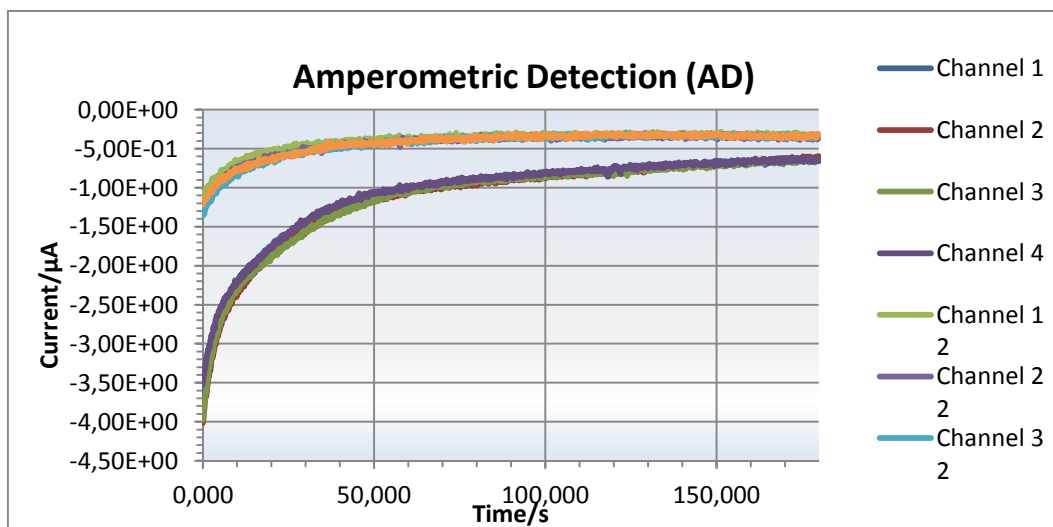
Amylaasisensoreita on tutkittu ja kehitelty eripuolilla maailmaa ja Suomessakin Kajaanin yliopistokeskuksessa. Amylaasisensorin avulla stressin kehitystä elimistössä voitaisiin mitata helposti sylkinäytteen avulla ilman kalliita ja kajoavia verikokeita. Näytematriisina sylki on kuitenkin haastava ja kehitystyötä on vielä paljon. Toimivan amylaasisensorin merkitys stressin pika-diagnostiikassa olisi kaupallisesti hyvin merkittävä, koska jo olemassa oleva painotekniikka mahdollistaisi sensoreiden massatuotannon, joka pitäisi tuotantokustannukset alhaisina. Kysyntää halvemmalle analyysimenetelmälle olisi urheilulääketieteen, työterveyshuollon sekä julkisen että yksityisen terveydenhuollon puolella.

Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa sensorin toimivuutta optimoimalla sensorin valmistuksessa käytettävää biomusteen koostumusta. Ensin tutkittiin sensorien musteseoksia maltoosistandardien avulla ja parhaiten toimivia musteseoksia tutkittiin myös α -amylaasistandardien avulla. Samanaikaisesti tutkittiin myös biosensoreiden säilyvyyttä erilaisissa olosuhteissa ja erilaisilla biomusteseoksilla.

2 ELEKTROKEMIALLISET SENSORIT

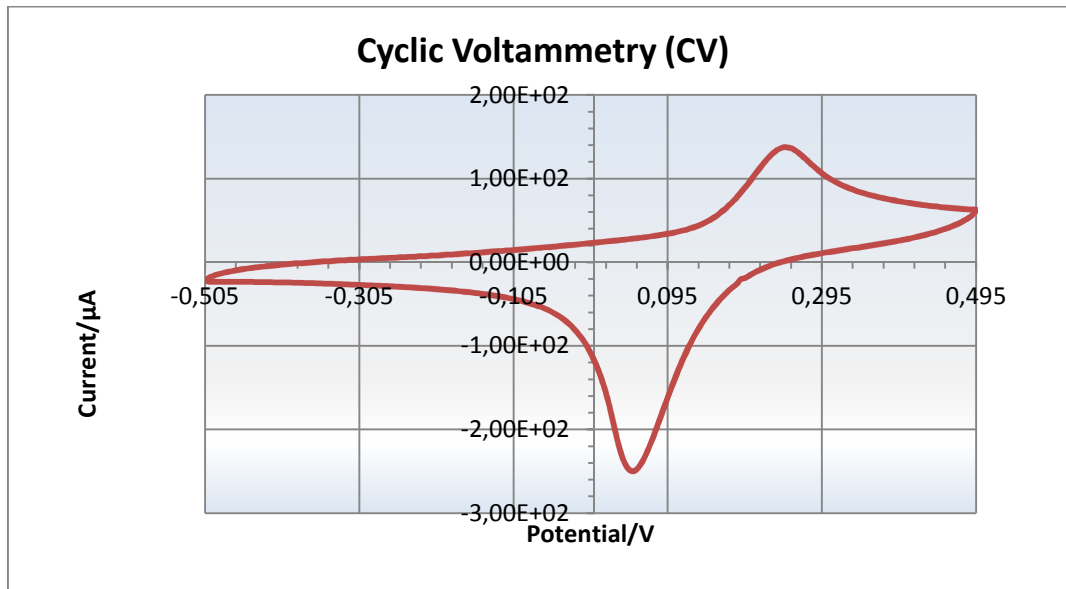
Elektrokemiallisessa sensorissa on kaksi tai kolme erilaisista johtavista materiaaleista valmistettua elektrodiä. Tällaisia materiaaleja ovat muun muassa platina, kulta, hopea ja grafiitti. Kahden elektrodin elektrokemiallinen kenno muodostuu työ- ja vastaelektrodista ja kolmen elektrodin työ-, vasta- ja referensielektrodista. Liuoksen ja elektrodin välille muodostuu puolikennopotentiaali. Kahden eri materiaalista koostuvan elektrodin välille muodostuu elektrolyyttiliuoksessa kennopotentiaali, jonka potentiaaliero on mitattavissa. Tällaista kokonaisuutta kutsutaan sähkökemialliseksi kennoksi. (1, s. 1750; 2, s. 3–5)

Elektrokemiallisilla sensoreilla tehdään kahden tyyppisiä mittauksia, amperometrisiä ja voltametrisiä. Amperometrisissä mittauksissa (kuva 1) työelektrodille syötettävä jännite pidetään vakiona ja mitataan virtaa ajan funktiona.



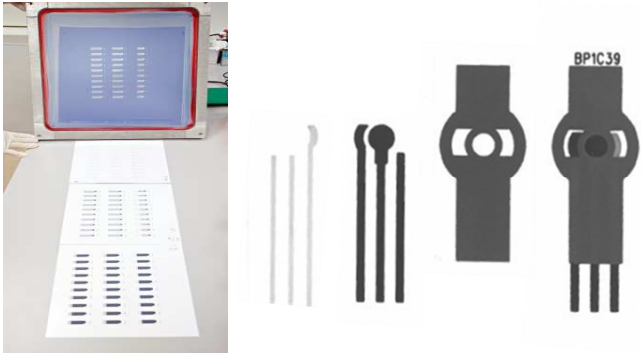
KUVA 1. Tässä amperometrinen mittauksen kuvaajassa on kaksi eri standardin arvoa. Mittauksen loppuvaiheissa entsyymireaktiot saavuttavat tasapainotilan, jossa virtojen arvot ovat vakioita. Näiden vakioiden avulla voidaan piirtää kalibraatiokuvaaja, jossa virran arvo on esitetty standardiliuoksen konsentraation funktiona

Voltametrisissa mittauksissa (kuva 2) jännitettä vaihdellaan ja virtaa mitataan jännitteen funktiona (1, s. 1749–1750; 2, s. 3–5, 8).



KUVA 2. Syklisen voltametrian mittauksissa jännitettä vaihdellaan. Kuvaajassa virran arvo on esitetty jännitteen funktiona.

Elektrodeja voidaan painaa silkkipainotekniikalla PET-muoviin, jolloin sensori valmistuu kerros kerrokselta erilaisista musteista (kuva 3). Silkkipainotekniikalla pystytään valmistamaan pieniä sensoreita suuria määriä varsin kustannustehokkaasti. Hyvä esimerkki tällaisista sensoreista ovat verensokerimittauksissa käytettävät glukosisensoriliuskat. (3, s. 712; 4, s. 3188)



KUVA 3. Grafiittisensori valmistetaan kerros kerrokselta kolmesta eri musteesta. Ensin painetaan hopeamusteella referenssielektrodi, jonka kuivuttua painetaan grafiittimusteella työ- ja vastaelektrodi. Sensori viimeistellään sähköä eristävällä mustekerroksella (5. s. 6.)

2.1 Biosensorit

Sensoreista tulee biosensoreita, kun niihin lisätään bioaktiivisia aineita, kuten entsyymejä. Biosensori on laite, joka havaitsee biokemiallisen reaktion tuottaman sähkö-, lämpö- tai optisen signaalin. Elektrokemialliset biosensorit ovat usein pieniä, kertakäyttöisiä PVC- tai PET-muoviin painettuja entsyymikäsiteltyjä sensoreita. Sensoreiden pieni koko ja mahdollisuus massatuotantoon pienentävät valmistuskustannuksia. Biosensoreiden kaupallisia sovelluksia, kuten verensokerimittauksissa käytettävät glukosisensoriliuskat ja raskaustestit ovat jo markkinoilla. Tällä hetkellä biosensoriteollisuuden markkina-arvo on noin 13 miljardia dollaria ja sen ennustetaan kasvavan tulevaisuudessa. Uusia biosensorisovellutuksia kehitelläänkin kokoajan lisää kuluttajamarkkinoille. (1, s. 1748–1750; 6; 4, s. 3187, 3194)

Amylaasisensori on yksi tutkimuksen kohteena olevista sovelluksista, jota on kehitelty muun muassa Kajaanin yliopistokeskuksessa ja useissa kiinalaisissa tutkimushankkeissa. Amylaasisensori reagoi syljen α -amylaasientsyymiin, joka laukaisee sensorilla ketjureaktion, jonka lopputuloksena syntyy mitattava virta. Syntyvä virta on riippuvainen α -amylaasientsyymien konsentraatiosta. Alfa-

amylaasientsyömin määrä syljessä korreloi henkisen ja fyysisen stressin kanssa. Stressiä voidaan tutkia myös verikokeilla määritettävistä kortisoli- ja katekoliamiinihormoniarvoista, mikä vaatii laboratorioalan ammattiosaamista. Toimiva pika-analytiikkamenetelmä stressin määrittämiseksi syljestä olisi asiakasystävällisempää ja kustannustehokkaampaa, koska se ei vaatisi erityisosaamista eikä erikoisvälineitä. (7, s. 243–248; 8, s. 1217–1220)

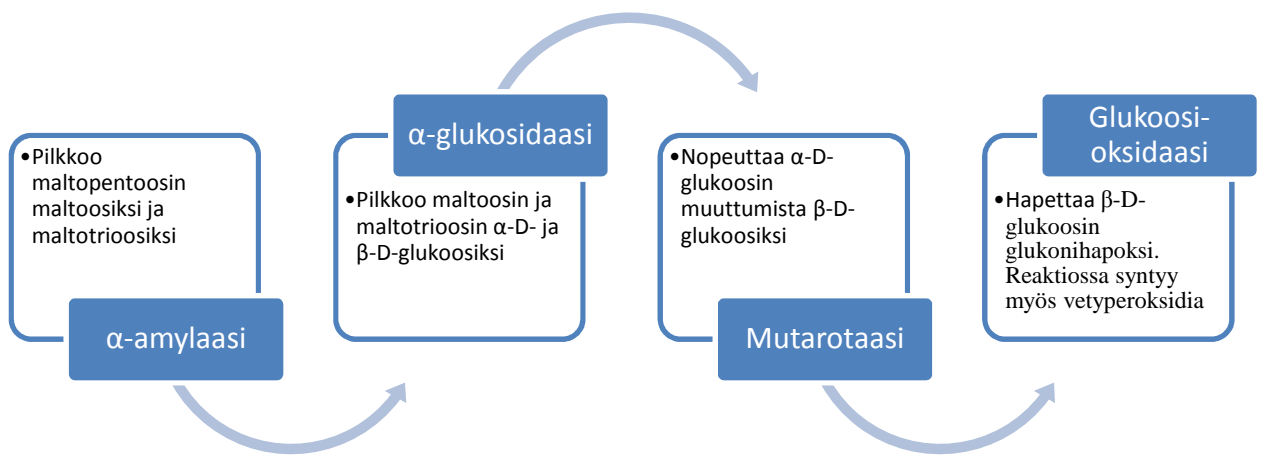
2.2 Entsyymien toiminta amylaasisensorilla

Entsyymit ovat useimmiten proteiineista muodostuneita ja toimivat reaktioissa katalyytteinä. Lisäksi ne ovat monimutkaisen rakenteensa vuoksi hyvin spesifisiä (9, s. 52). Entsyymit ovat hyvin tarkkoja toimintaolosuhteistaan, kuten lämpötilasta, pH:sta, suolapitoisuudesta ja valosta. (1, s. 1748)

Amylaasisensoreilla käytettäviä entsyymejä ovat α -glukoosidaasi, mutarotaasi ja glukoosioksidaasi, mutta joskus mutarotaasientsyymi on jätetty pois. Amylaasisensorin nimi tulee näytteen sisältämästä α -amylaasista. (7, s. 245; 8, s. 1218).

Kuvasta 4 nähdään α -amylaasin aikaansaama ketjureaktio amylaasisensorin pinnalla. Alfa-amylaasi pilkkoo maltopentoosin maltoosisiksi ja maltotriosisiksi, jotka α -glukoosidaasi hajottaa α - ja β -D-glukoosiksi. Mutarotaasi nopeuttaa α -D-glukoosin muuttumista β -D-glukoosiksi, jonka glukoosioksidaasi pilkkoo D-glukonihapoksi. Glukoosioksidaasin koentsyyminä toimiva flaviiniadeniin nukleotidi, FAD, toimii elektronin siirtäjänä ja napaten glukoosilta kaksi elektronia ja siirtäen ne happimolekyylille (O_2), jolloin syntyy vetyperoksidia (H_2O_2). (7, s. 245; 10, s. 6–7)

Sensorin pinnalla mediaattorina toimiva Prussian Blue -muste katalysoi vetyperoksidin pelkistymistä vedeksi, jolloin musteen rauta(II)-ioni hapettuu rauta(III) ioniksi. Rauta(III)-ionien pelkistyessä takaisin rauta(II)-ioneiksi vapautuvat elektronit aiheuttavat mitattavan virran. (2, s. 19)



KUVA 4. Entsyymireaktiot α -amylaasi sensorin pinnalla, kun α -amylaasi on ensin pilkkonut tärkkelyksen maltoosiksi ja maltotriosiksi (7, s. 245–246; 8, s. 1218.)

3 SENSOREIDEN VALMISTUS JA TESTAUS

3.1 Perussensorit

Käytettävät sensorit valmistettiin BioPrint -projektin silkkipainolla kolmelle eri muovikalvolle, joiden kaupalliset nimet olivat Hydroprint, Valox ja Melinex (kuva 5). Muovikalvon pinnalle painettiin silkkipainotekniikalla erilaisilla musteilla kerroksittain eristekerros, työ-, vertailu- ja vastaelektrodi. Työelektrodi oli grafiittia, jossa on mukana mediaattorina kaliumrauta(II)heksasyanoferraattia(III) (Prussian Blue). Vastaelektrodi oli grafiittia ja vertailuelektrodi hopea tai hopea/hopeakloridia. Perussensoreista saatiin biosensoreita lisäämällä sensorin pinnalle biomustetta eli entsyymiseosta.



KUVA 5. Kuvassa on silkkipainotekniikalla painettuja grafiittisensoreita muovikalvilla.

3.2 Biosensoreiden valmistus

Entsyymiseosten käyttäytymistä sensorin pinnalla tutkittiin amperometrisesti maltoosistandardeilla. Tavoitteena oli löytää entsyymiseos, joka antaisi mahdollisimman pitkälle lineaarisen ja kulmakertoimeltaan suuren standardisuoran. Entsyymiseokset vaihtelivat α -amylaasin, glukoosioksidaasin ja mutarotaasin määrien suhteen. Kaikki entsyymiseokset sisälsivät lisäksi 1,3 %:a joko BSA:ta tai ovalbumiinia, 0,1 % Tween20 ja PBS-puskuria. Eri entsyymiseokset numeroitiin 1–17, jotta sekaannuksilta välttyttäisiin (taulukko 1). Entsyymiseokset valmistettiin tarkasti ohjeen mukaan jäähauteessa. Sensoreille pipetoitiin kullekin 2 μ l:a entsyymiseosta ja arkki kuivattiin ja säilytettiin mittaukseen asti eksikaattorissa huoneenlämmössä.

TAULUKKO 1. Biomusteiden ainesosataulukossa muutokset perusseokseen nro 2 verrattuna näkyvät numeroarvoina. Viiva ilmaisee, ettei kyseistä ainesosaa ole seoksessa. PBS-puskuria on kaikissa seoksissa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Nro
BSA	1,0	1,3					1,15								1,15		-	%
Ovalb.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	%
1 x PBS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	puskuri
Tween20		0,1																%
α - GD		0,2	0,1		0,1	0,1	0,1	0,3			0,3	0,3	0,3		0,15	-	0,2	U/sensori
MUT		1,2		0,6	0,6	0,6			1,8		1,8	1,8		1,8	0,9	-	1,2	U/sensori
GOX		0,2				0,1				0,3		0,3	0,3	0,3				U/sensori

3.3 Sensoreiden mittaaminen

Sensorit leikattiin arkista saksilla ja asetettiin potentiostaatin liittimiin ja näytteet pipetoitiin 30 μ l:n pisaroina sensoreille. Entsyymiseoksellisella sensorilla mitat-

tiin aluksi syklinen voltametria eli cv, jonka avulla määritettiin amperometrisissa mittauksissa käytettävä mittausjännite katodisen piikin huipun paikasta. Syklisten voltametrian mittauksissa käytettiin näytteenä 0,1M KCl in PBS pH 7.0 - liuosta.

Amperometriseen mittaukseen asetettiin käytettävä mittausjännite ja ajoaika, muut parametrit, viiveaika t 8 sekuntia ja mittapisteiden lukuväli t 0,1 sekuntia, pidettiin samana. Ajoaikana käytettiin yleisesti 180 sekuntia. Näytetilavuutena käytettiin normaalisti 30 μ l:aa, paitsi mitattaessa α -amylaasistandardeja malto-pentoosilla käsiteltyjen suodatinpaperien kanssa, jolloin käytettiin näytetilavuutena 20 μ l:aa. Suodatinpaperilla pyrittiin yksinkertaistamaan ja stabiloimaan mittauksia. Mittausliuos pipetoitiin ja levitettiin sensorille pipetin avulla niin, että nestepinta peitti elektrodit. Mittaus käynnistettiin joko heti tai halutun inkubaatioajan jälkeen. Mittaustulokset tallennettiin päivämäärän mukaan omaksi kansiksi tietokoneelle.

Saatu mittausdata pystyttiin identifioimaan työpäiväkirjaan tehtyjen merkintöjen avulla. Työpäiväkirjaan merkittiin potentiostaatin kanavan numero, mitattavien sensoreiden numerot, sensoriarkin tiedot, lisätyn entsyymiseoksen numero, mittausprotokolla, päivämäärä ja useimmiten myös ilmankosteus. Tulokset laskettiin 3–4 rinnakkaisen mittauksen virran keskiarvona aikaväliltä 135–140 sekuntia, jolloin saavutettiin entsyymireaktion tasapainotila (kuva 1).

3.4 Sensoreiden optimointi eri standardiliuoksilla

Biosensoreiden toimivuutta tutkittiin glukoosi-, maltoosi- ja α -amylaasistandardien avulla. Glukoosistandardeilla tutkittiin biomusteessa olevan glukoosioksidaasin toimivuutta ja maltoosistandardeilla kaikkien kolmen biomuste-entsyymien toimivuutta. Alfa-amylaasistandardeilla tutkittiin α -amylaasientsyymien toimivuutta yksin sekä yhteistoimivuutta kolmen muun entsyymien kanssa sensorin pinnalla. Standardien valmistusta varten tehtiin pipe-

tointitaulukko, jonka avulla pyrittiin pienentämään virheen mahdollisuutta. Taulukko 2 on hyvä esimerkki pipetointitaulukosta.

Glukoosistandardeilla mitattaessa käytettiin sensoreita, joiden biomusteessa oli entsyyminä vain glukoosioksidaasia. Standardit valmistettiin 0,1 molaarisesta kaliumkloridifosfaattipuskuriliuoksesta, jonka pH oli 7.0 (KCl in PBS pH 7.0) ja 100 mM glukoosiliuoksesta, joka oli valmistettu steriiliin veteen tuntia aiemmin.

Alfa-amylaasistandardit valmistettiin taulukon 2 mukaisesti mikrosentrifuugiputkiin, joissa näytettä inkuboitiin 1 minuutin ajan ennen sensorille pipetoimista. Standardit sisälsivät kaupallista α -amylaasia, entsyymin substraattia maltopentoosia ja mittauspuskuria.

TAULUKKO 2. α -amylaasistandardin pipetoimistaulukko

U/ml (α-amylaasi)	0	100	200	400	600
75 mM maltopentoosiliuos	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
0,1 M KCl in PBS pH 7,0 -liuos	28 μ l	26,5 μ l	25 μ l	22 μ l	19 μ l
2000 U/ml α -amylaasiliuos	0	1,5 μ l	3,0 μ l	6,0 μ l	9,0 μ l

Osa amylaasistandardikuuvaajan mittauksista tehtiin siten, että 0,1 molaariseen kaliumkloridi fosfaattipuskuriin tehty α -amylaasiliuos pipetoitiin sensorin pinnalle asetetulle suodatinpaperille, johon oli kuivattu entsyymin substraattia, maltopentoosia. Tällöin mittauksissa näytetilavuutena käytettiin poikkeuksellisesti 20 μ l:aa. Maltoosinstandardiliuos valmistettiin 100 mM maltoosi-vesiliuoksesta ja 0,1M KCl in PBS pH 7,0 -liuoksesta. Inkubaatioaikana käytettiin 30 sekuntia.

3.5 Mittauksissa käytettävät välineet ja liuokset

Mittauksissa käytettyjen reagenssien lista on liitteenä 1. Mittauksissa käytettiin yleisiä laboratorion perusvälineitä sekä PalmSens -potentiostaattia (Palm Inst-

rument BV, The Netherlands). Käytetyt liuokset autoklavoitiin tai valmistettiin autoklavoituun veteen tai PBS pH 7,0 -liuokseen ja suodatettiin ennen mittaus-
ta. Liuosten valmistus on esitetty liitteessä 2. Käytettävät pipetinkärjet ja Eppendorf-putket autoklavoitiin myös.

4 BIOSENSOREIDEN KEHITYSTYÖN TULOKSET

Potentiostaatilla mitattiin sensoreista saatua virtaa 0,1 sekunnin välein. Palm-Sens -ohjelmalla saadut tulokset siirrettiin Excel-taulukkolaskentaohjelmaan, jolla saadut tulokset käsiteltiin. Virran keskiarvo laskettiin ajoajan viiden viimeisen sekunnin ajalta tai aikaisemmalta viiden sekunnin ajanjaksolta, jolloin virranarvo oli jo tasaantunut. 3–4 rinnakkaisen mittauksen arvoista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja CV-prosentti. Laskukaavat on esitetty kaavoissa 1–3 (11, s 109). Nolla-standardin arvo eli puskurilla mitattu arvo vähennettiin muiden standardien tuloksista. Täten kuvaajan alku saatiin asetettua origoon. Standardikuvaajat piirrettiin esittämällä virranarvo standardien konsentraatioiden funktiona. Keskiarvo lasketaan kaavalla 1.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

KAAVA 1

n = lukumäärä

Keskihajonta lasketaan kaavalla 2.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

KAAVA 2

\bar{x} = keskiarvo

x_i = i:nneen mittauksen lukuarvo

n = lukumäärä

Suhteellinen keskihajonta eli CV-% lasketaan kaavalla 3

$$CV\% = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \cdot 100\%$$

KAAVA 3

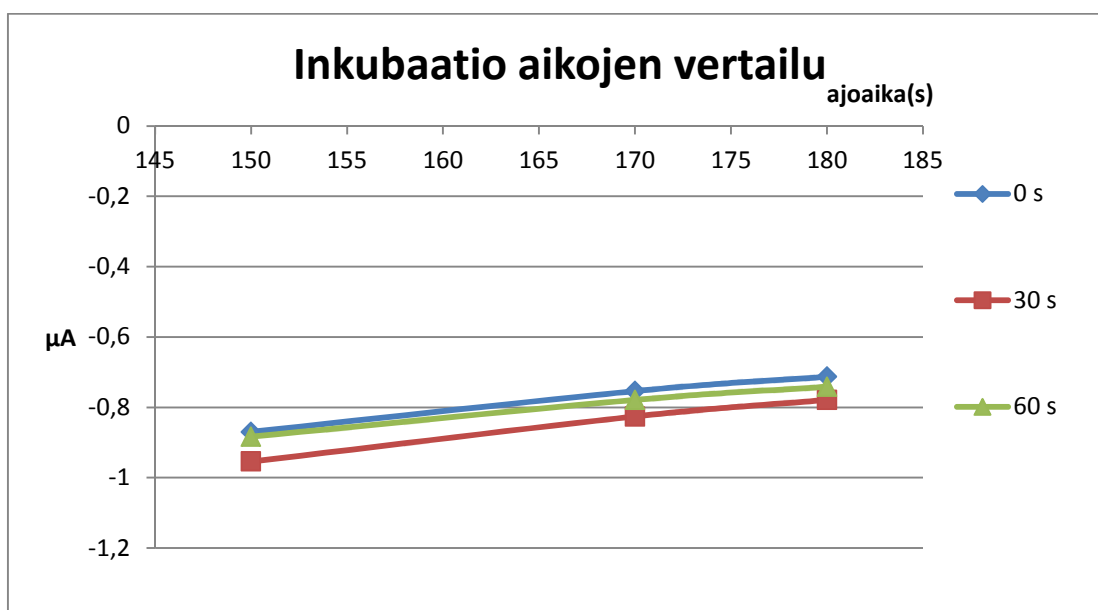
σ = keskihajonta

$|\bar{x}|$ = keskiarvon itseisarvo

4.1 Näytteen inkubaatioajan optimointi

Kolmea eri inkubaatioaikaa (0, 30 ja 60 sekuntia) vertailtiin entsyymiseoksella 2. Kaikki mittaukset tehtiin kolmella rinnakkaisella sensorilla, 1 millimolaarisella maltoosiliuoksella ja mittausjännitteellä 90 millivoltia. Mittauksissa virran arvo ei saavuttanut tasapainotilaa, jossa virran arvo olisi pysynyt vakiona. Tasapainotilan saavuttamiseksi olisi vaadittu pidempi mittausaika, jota ei kuitenkaan haluttu käyttää.

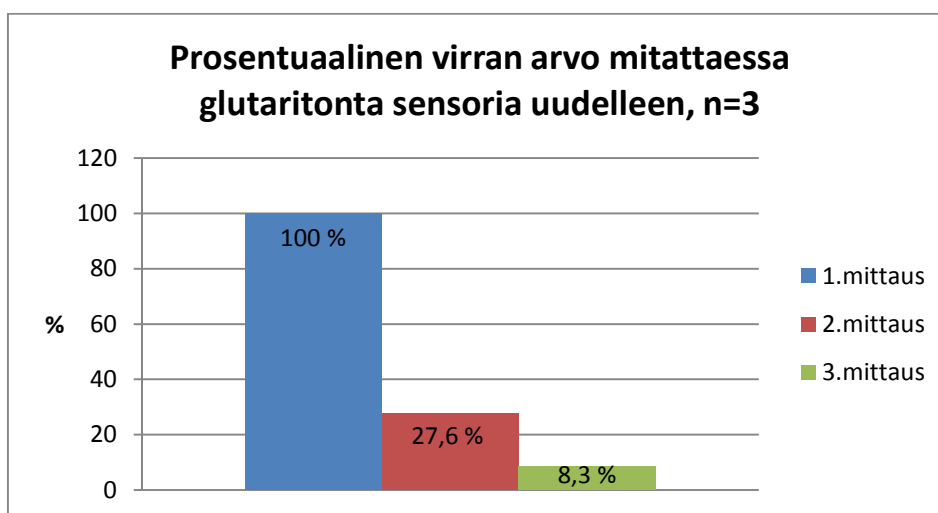
Saatuja virran arvoja vertailtiin kolmessa eri aikapisteessä: 150, 170 ja 180 sekuntia. Suuria eroja inkubaatioaikojen välillä ei havaittu, mutta inkubaatioaika 30 sekuntia antoi hiukan muita suuremman virran itseisarvon ja sen kuvaajan kulmakerroin oli suurin ja korrelaatiokerroin paras, jolloin mittauspisteet erottuivat parhaiten toisistaan (kuva 6). Maltoosisensoreiden mittauksissa päädyttiin käyttämään 30 sekunnin inkubaatioaikaa ennen mittausten käynnistämistä.



KUVA 6. Amylaasisensoreiden inkubaatioajaksi valittiin 30 s, koska tällä inkubaatioajalla mittauspisteet erottuivat parhaiten toisistaan ja lisäksi saatiin hieman suuremmat virran itseisarvot.

4.2 Glutarittoman sensorin uudelleen käyttö

Entsyymiseoksen pysymistä sensorin pinnalla testattiin ilman sensoreiden gluta-
taraldehydi käsittelyä. Testaus suoritettiin, koska haluttiin selvittää voitaisiinko
samaa sensoria käyttää useampia kertoja. Mittauksessa käytettiin 1 millimolaa-
rista maltoosistandardia, joka vaihdettiin uuteen ennen uuden mittauksen aloit-
tamista. Mittausten välillä sensorit huudeltiin ja ilmakuivattiin. Mittauksessa käy-
tettiin 90 millivoltin mittausjännitettä, 180 sekunnin ajoaikaa ja 30 sekunnin in-
kubaatioaikaa. Mittauksessa käytettiin kolmea rinnakkaista sensoria. Saatuja
mittaustuloksia tarkasteltiin prosentuaalisesti suhteessa ensimmäisen mittauk-
sen arvoon. Kuvasta 7 huomataan, että virran arvo pienenee yli 70 % ensim-
mäisen mittauksen jälkeen. Sensori ei siis ole uudelleen käytettävä ilman gluta-
raldehydiä.



*KUVA 7. Glutarittomien sensorien prosentuaaliset virran arvot, kun 2. ja 3. mit-
tauksen tuloksia verrattiin 1. mittauksen arvoihin. Mittaliuoksena käytettiin 1 mil-
limolaarista maltoosistandardia.*

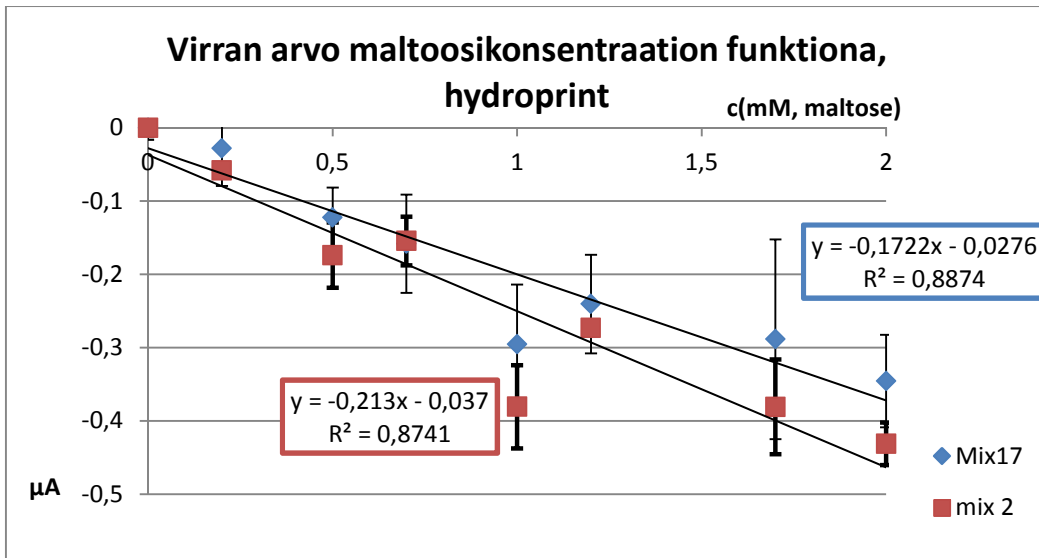
4.3 Biomusteiden koostumuksen optimointi maltoosistandardilla

Biomusteen koostumusta optimoitiin vertailemalla erilaisten entsyymiseosten
toimivuutta sensorilla. Seosten koostumukset on esitetty taulukossa 1. Entsyy-

miseoksia tutkittiin aluksi lyhyillä neljän standardin sarjoilla. Tutkimuksissa vertailtiin standardipisteiden hajontaa, standardikuvaajan lineaarisuutta ja kuvaajan kulmakerrointa. Alkutestien jälkeen entsyymiseoksia 2, 8, 9, 16 ja 17 tutkittiin tarkemmin pidemmällä standardisarjoilla. Entsyymiseoksia tutkittiin myös eri muovialustoille painetuilla sensoreilla. Virtojen keskiarvo laskettiin aikaväliltä 135–140 sekuntia.

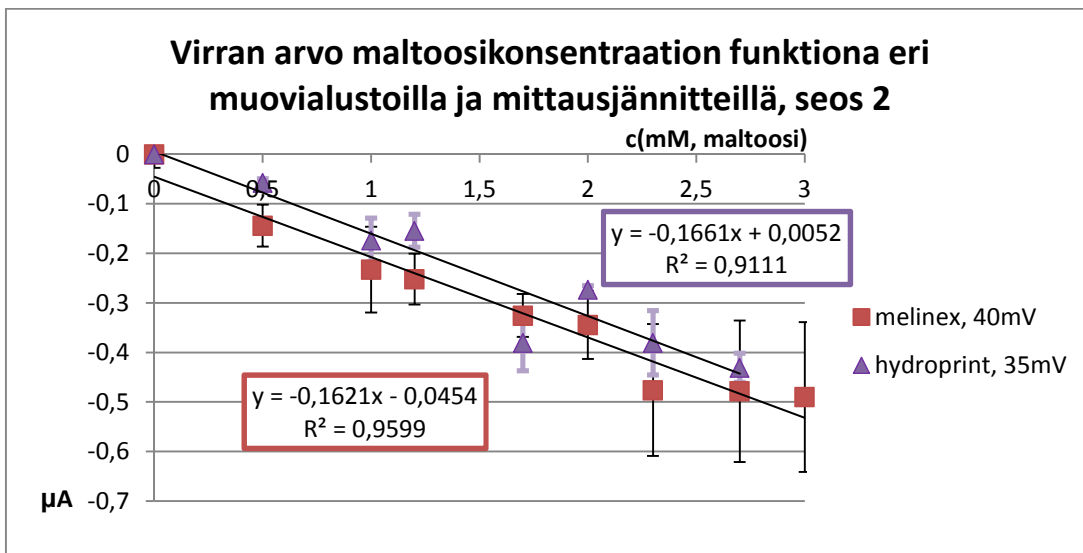
4.3.1 Entsyymiseokset 2 ja 17

Seokset 2 ja 17 eroavat vain siinä, että seoksessa 17 BSA:n tilalla käytettiin kantajaproteiininä ovalbumiinia. Kuvasta 8 nähdään, että seosten 2 ja 17 standardikuvaajat poikkeavat vain hieman toisistaan, mutta seoksen 2 standardikuvaajan hajonnat olivat pienempiä ja virran arvot hieman suurempia kuin seoksen 17 kuvaajassa. Molempien seosten kuvaajissa esiintyy suuri poikkeama standardin 5 (1 millimolaarisen maltoosin) kohdalla, mikä selittyisi vain sillä, että kahtena päivänä olisi tehty sama virhe standardiliuoksia tehtäessä, mikä on epätodennäköistä. Samantyyppistä notkahdusta ei havaita muissa seoksen 2 standardikuvaajissa, kuten voidaan nähdä kuvasta 9. BSA:n käyttäminen kantajaproteiininä ovalbumiinin sijasta pienensi hajontaa ja antoi hiukan suurempia virran arvoja.



KUVA 8. Seoksien 2 ja 17 vertailulla haluttiin selvittää BSA:n ja ovalbumiinin vaikutusta standardikuvaajiin

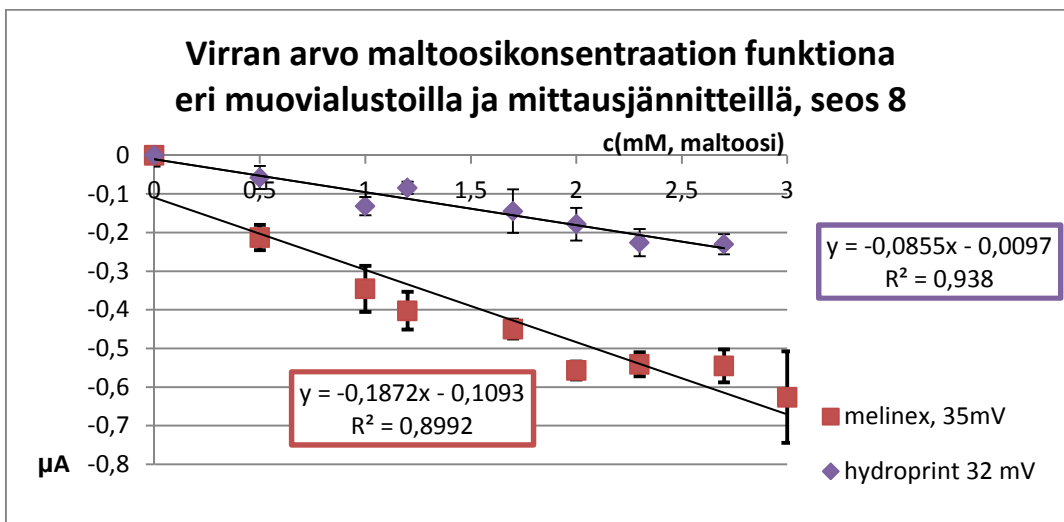
Kuvasta 9 nähdään, että seoksen 2 mittaustulosten arvot vaihtelevat vain hieman riippuen sensorin muovialustasta, jolla näyttäisi kuitenkin olevan suuri vaikutus rinnakkaisten mittausten hajontaan.



KUVA 9. Mittauksella haluttiin selvittää miten entsyymiseos 2 käyttäytyisi eri muovialustoille painetuilla sensoreilla.

4.3.2 Entsyymiseos nro 8

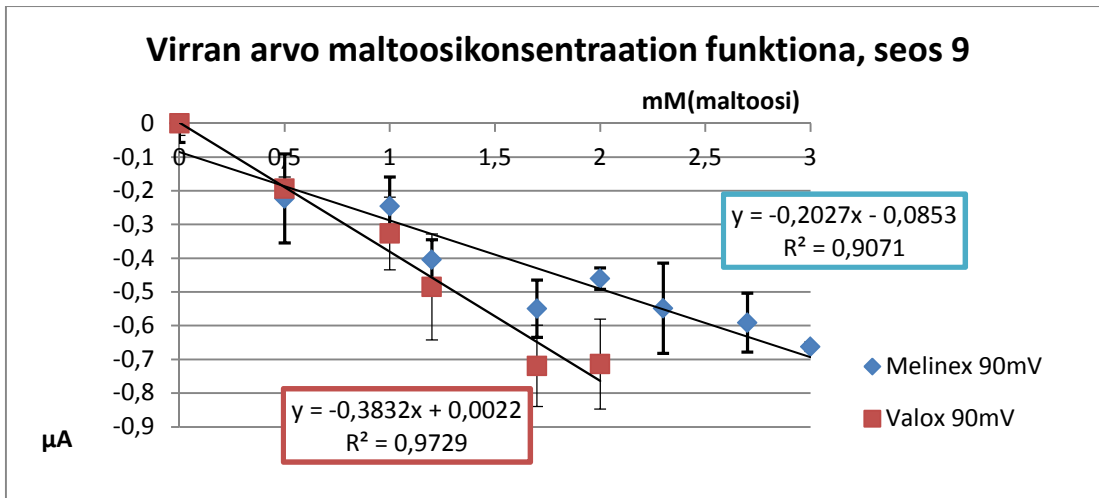
Tässä entsyymiseoksessa on puolitoistakertainen määrä α -glukosidaasia verrattuna perusseoksena käytettyyn seos 2:een. Mittaustulokset näyttävät vaihtelevan paljon sensorin muovialustasta riippuen (kuva 10). Mittaustulosten keskihajonnat seoksella 8 olivat melinex-alustalla pienempiä ja suoran kulmakerroin oli itseisarvoltaan suurempi kuin hydroprint-alustalla, jolla suoran lineaarisuus oli hieman parempi.



KUVA 10. Entsyymiseoksen 8 standardikuvaajat käyttäytyivät hyvin eri tavoin, sen mukaan kummalle muovialustalle sensori oli painettu.

4.3.3 Entsyymiseos nro 9

Entsyymiseos 9 sisältää puolitoistakertaisen määrän mutarotaasia perusseokseen 2 verrattuna (kuva 11). Myös tällä entsyymiseoksella saatiin erilaisia tuloksia erilaisilla sensorin alustoilla.



KUVA 11. Sensorin muovialusta vaikutti hyvin paljon seoksen 9 standardikuvaujiin.

4.4 Neljän eri entsyymiseoksen yhteenveto

Taulukossa 3 on esitelty yhteenveto neljän esitellyn entsyymiseoksen käyttäytymisiä erilaisilla sensorin muovialustoilla. Taulukosta voidaan huomata, että erilaiset entsyymiseokset käyttäytyvät erilaisilla alustoilla eri tavoin. Entsyymiseoksen optimointiin vaikuttaa myös käytetyn sensorin alusta.

TAULUKKO 3. Entsyymiseokset käyttäytyvät eri tavoin riippuen sensorin alustasta.

entsyymiseos	muovialusta	trendiviivan yhtälö	korrelaatiokerroin
nro 2	Valox	$y = -0,1915x - 0,0033$	$R^2 = 0,8716$
	Hydroprint	$y = -0,1661x + 0,0052$	$R^2 = 0,9111$
	Melinex	$y = -0,1621x - 0,0454$	$R^2 = 0,9599$
	Melinex	$y = -0,1924x - 0,042$	$R^2 = 0,9691$
nro 8	Valox	$y = -0,3101x - 0,0578$	$R^2 = 0,9368$
	Melinex	$y = -0,1872x - 0,1093$	$R^2 = 0,8992$
	Melinex	$y = -0,2332x - 0,035$	$R^2 = 0,9366$
	Hydroprint	$y = -0,0855x - 0,0097$	$R^2 = 0,938$
nro 9	Melinex	$y = -0,2027x - 0,0853$	$R^2 = 0,9071$
	Valox	$y = -0,3832x + 0,0022$	$R^2 = 0,9729$
nro 17	hydroprint	$y = -0,1722x - 0,0276$	$R^2 = 0,8874$

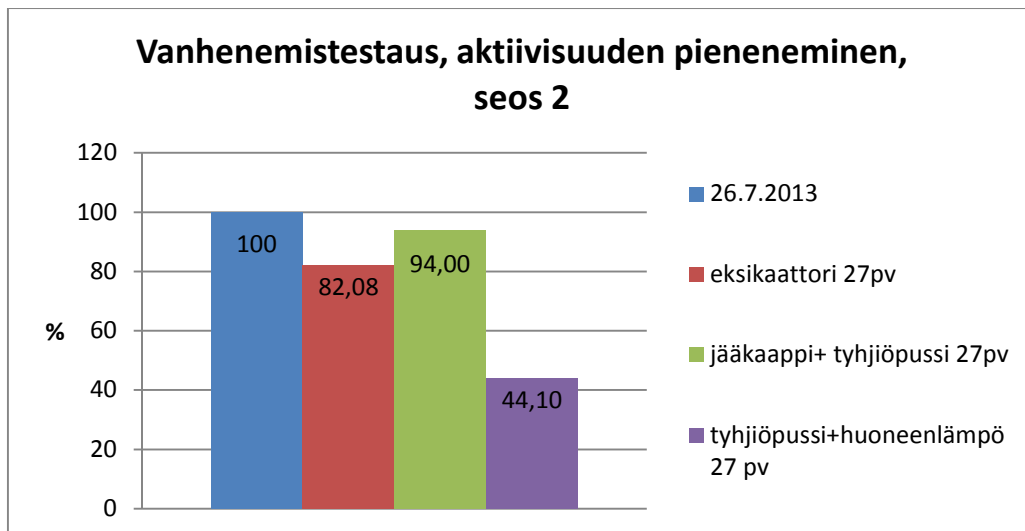
4.5 Vanhenemistestaukset

Vanhenemistestauksia tehtiin kahdenlaisia. Ensimmäisessä vanhenemistestauksessa tutkittiin säilytysolosuhteiden vaikutusta entsyymillisten sensoreiden aktiivisuuteen ja toisessa eri entsyymiseosten aktiivisuutta säilytyksen jälkeen.

4.5.1 Olosuhteiden vaikutus sensoreiden säilyvyyteen

Entsyymiseoksellisia sensoreita säilytettiin kolmessa erilaisessa olosuhteessa: vakuumissa huoneen lämmössä, vakuumissa jääkaapissa ja eksikaattorissa huoneenlämmössä. Kussakin olosuhteessa oli vanhenemassa neljä rinnakkaisista sensoria, jotka mitattiin potentiostaatilla käyttäen standardina 1 millimolaarista maltoosiliuosta ja samaa mittausprotokollaa kuin aikaisemmin. Tuloksia verrattiin samalta arkilta heti valmistuksen jälkeen mitattujen sensoreiden tuloksiin ja ne ilmoitettiin suhteellisina prosentiosuuksina tuoreiden sensoreiden arvoihin nähden.

Säilytys pienensi rinnakkaisten sensoreiden välistä hajontaa kaikissa säilytysmuodoissa. Säilytysolosuhteiden vaikutukset sensoreiden entsyymiseoksen säilymiseen nähtiin selvästi. Jääkaapissa tyhjiöpussissa ja eksikaattorissa huoneen lämmössä säilytetyt sensorit näyttävät säilyneen parhaiten. Säilytystä tyhjiöpussissa huoneen lämmössä ei voi suositella, sillä entsyymien aktiivisuudet olivat näissä sensoreissa pienentyneen alle puoleen alkuperäisestä (kuva 12).



KUVA 12. Vanhenevuustestauksessa havaittiin tyhjiöpussissa huoneenlämmössä säilytettyjen sensorien aktiivisuuden pienentyneen alle puoleen alkuperäisestä. Jääkaapissa tyhjiöpussissa säilytetyt sensorit säilyttivät aktiivisuutensa parhaiten.

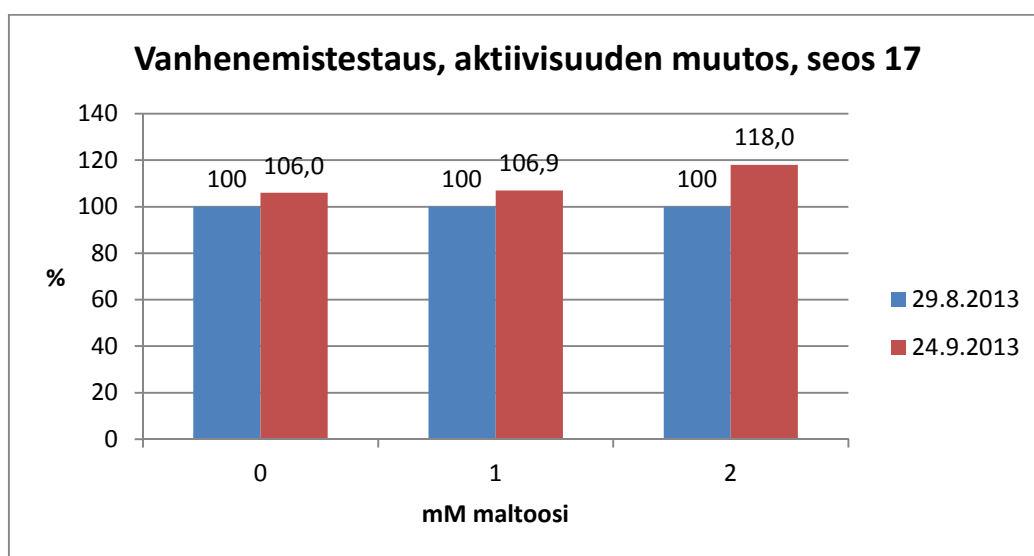
Taulukosta 4 voidaan nähdä, että rinnakkaisten sensorien välinen hajonta oli pienempi vanhemmilla sensoreilla kuin vastavalmisteluilla. Säilytys näyttäisi pienentävän rinnakkaisten sensorien välistä hajontaa.

TAULUKKO 4. Säilytyksen havaitaan pienentävän CV-%:a kaikissa säilytysmuodoissa.

	Alussa	Säilytyksen jälkeen		
		eksikaattori	jääkaappi+ tyhjiöpussi	Tyhjiöpussi +huoneenlämpö
Keskiarvo	-0,77851	-0,63898	-0,73179	-0,34336
Keskihajonta	0,033359	0,013058	0,025593	0,012912
CV -%	4,3	2,0	3,5	3,8

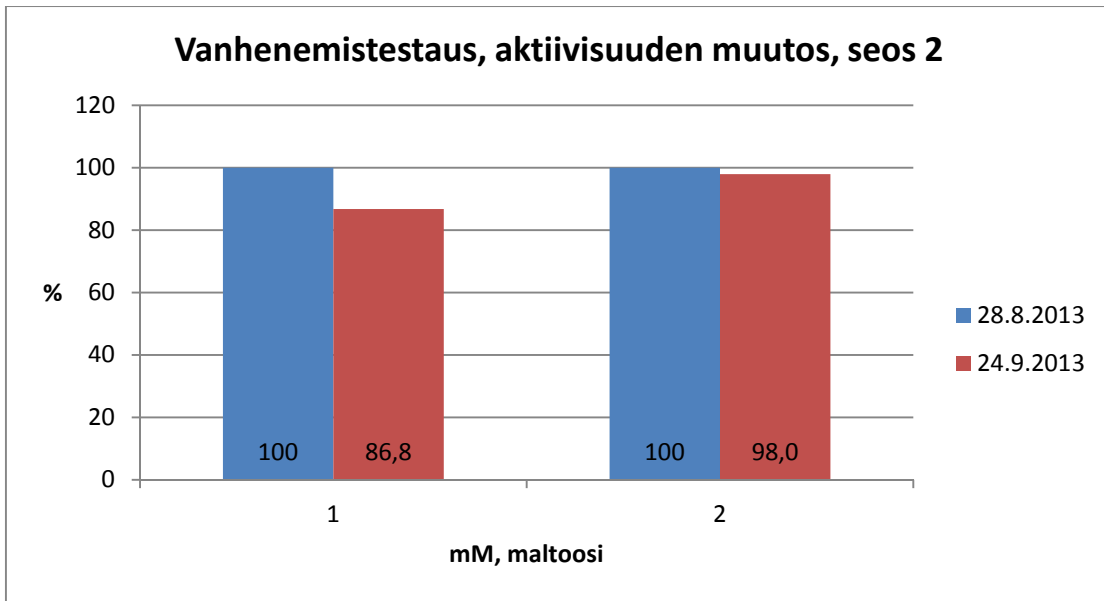
4.5.2 Entsyymiseoksen vaikutus säilyvyyteen

Tässä tutkittiin kolmen eri entsyymiseoksen (2, 8 ja 17) vanhenemista kolmella eri standardipitoisuudella. Rinnakkaisia sensoreita oli mittauksissa neljä ja ne oli painettu hydroprint-alustalle. Jääkaapissa tyhjiöpussissa vanhentumassa olleet sensorit mitattiin eri potentiostaatilla kuin tuoreet sensorit, mikä on saattanut vaikuttaa hieman tuloksiin. Säilytys näytti jostain syystä parantavan ovalbumiinia sisältävän entsyymiseoksen aktiivisuutta (kuva 13.)

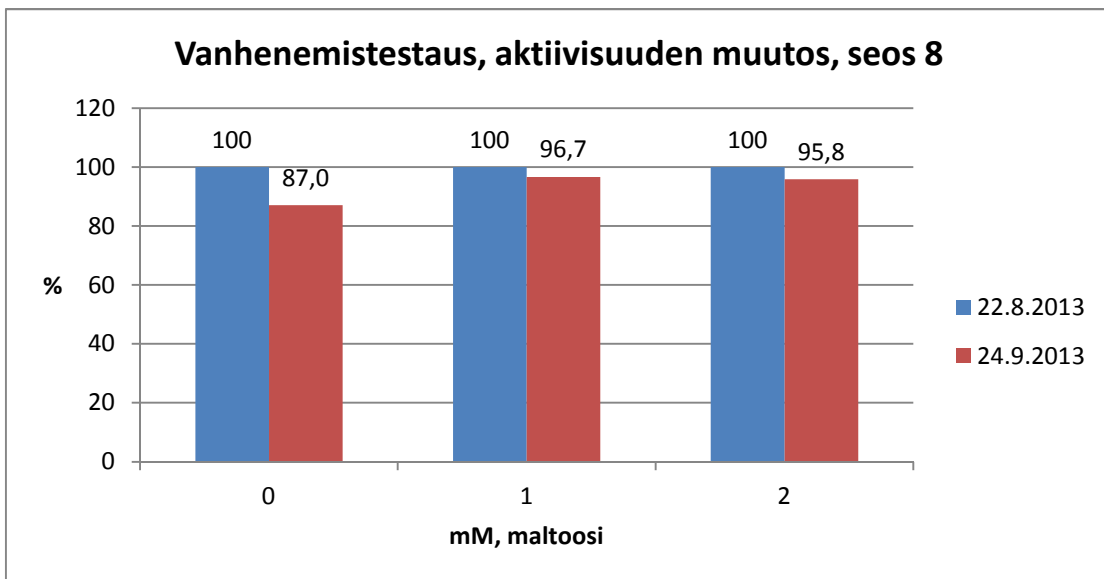


KUVA 13. Ovalbumiini näyttäisi hieman parantavan entsyymiseoksen säilyvyyttä.

Entsyymiseosten 2 ja 8 vanhenevuustestauksen tulokset olivat samankaltaiset kuin aikaisemmassa mittauksessa jääkaapissa vakuumpussissa säilytettyjen entsyymiseosta 2 sisältävien sensoreiden säilyvyyttulokset. (Kuvat 14 ja 15).



KUVA 14. Säilytys hieman laskee entsyymiseos 2:n aktiivisuutta.

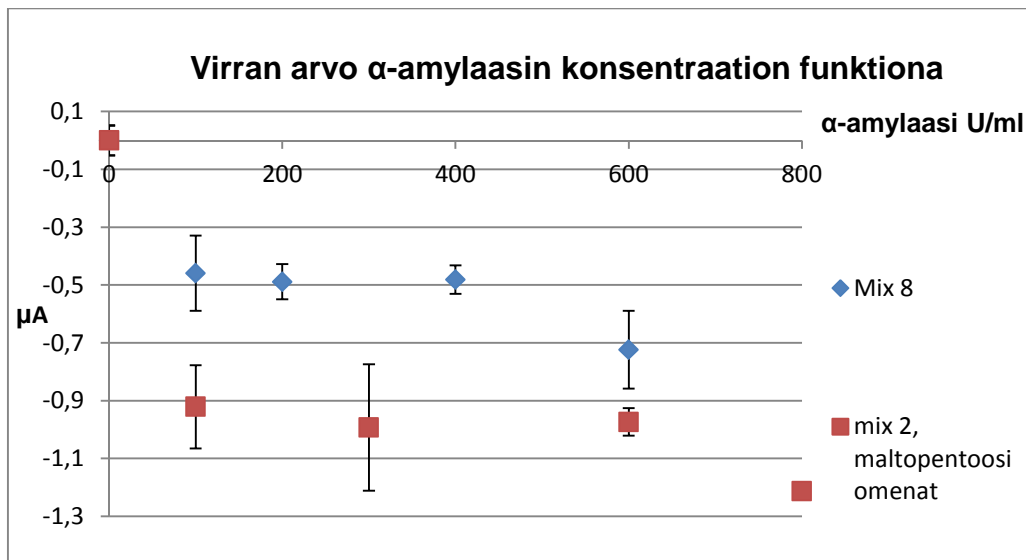


KUVA 15. Säilytys laskee hieman entsyymiseoksen nro 8 aktiivisuutta, joka vaihtelee hieman standardikohtaisesti.

4.6 Alfa-amylaasistandardit

Sensoreiden toimintaa testattiin α -amylaasistandardien avulla kahdella eri entsyymiseoksella. Toisessa kokeessa käytettiin suodatinpaperille kuivattua maltopentoosia (merkitty kuvaan 16 maltopentoosiomenat) ja toisessa maltopentoosiliuos lisättiin suoraan standardiliuoksiin.

Suodatinpaperille sidottua maltopentoosia käytettäessä saatiin suurempia virran arvoja. Tosin maltopentoosin määrä suodatinpaperilla oli huomattavasti suurempi kuin suoraan standardiliuokseen lisätty, joten tulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia keskenään. Suodatinpaperia käytettäessä rinnakkaisten mittausten hajonta oli paikoittain melko suurta. Maltopentoosin ollessa standardiliuoksessa hajonta oli huomattavasti pienempi, kuten kuvasta 16 nähdään.



KUVA 16. Amylaasisensorien testauksessa suodatinpaperille kuivatulla maltopentoosilla tulosten hajonta oli suurempi kuin maltopentoosiliuoksella, joka lisättiin suoraan standardiliuoksiin.

5 MITTAUSTULOSTEN ANALYSOINTIA

5.1 Inkubaatioajan optimointi

Inkubaatioajan optimoinnilla haluttiin selvittää, mikä olisi optimaalisin lyhyistä inkubaatioajoista. Kovin isoa eroa virran arvoihin inkubaatioaikojen pituuksilla ei havaittu. Ero oli hieman isompi lyhyemmällä mittausajo-ajoilla, mutta tasoittui loppua kohden. 30 sekunnin inkubaatioajalla saatiin suurimmat virran arvot, joten se otettiin käyttöön kaikissa mittauksissa.

5.2 Entsyymiseosten vertailu

Kuvaajiin piirrettyjen suorien korrelaatiokertoimia vertailtaessa huomattiin, ettei seosten 2 ja 8 (1,5 x α -GD) välillä ollut juuri eroa keskiarvoa tarkkailtaessa. Seoksen 9 (1,5 x MUT) korrelaatioiden keskiarvo on suurin. Standardipisteiden hajontaa oli myös hankala vertailla, koska seoksia oli mitattu eri muovialustoille painetuilla sensoreilla, mikä näytti vaikuttavan hajontaan.

Entsyymiseoksessa 17 testattiin, miten ovalbumiinin käyttö BSA:n tilalla vaikuttaisi mittaustuloksiin. Tulokset olivat hyvin samankaltaisia kuin BSA:ta käytettäessä, mutta mittausten väliset hajonnat olivat hieman suurempia kaikilla standardeilla mitattaessa.

Erilaisten muovialustojen ja biomusteiden käytöstä johtuen tuloksista ei voitu tehdä paljon tilastollisia vertailuja tai johtopäätöksiä. Mittaustulokset eri seosten välillä ja sisällä olisivat paljon vertailukelpoisempia, jos kaikki mittaukset olisi voitu suorittaa samalle muoville painetuille sensoreille. Näin ei tehty, koska samalle muovialustalle painettuja sensoreita ei sillä hetkellä ollut käytettävissä tarpeellista määrää. Näytteen pipetoiminen, leviäminen ja levittäminen sensorin mittausalueen pinnalle vaihtelivat suuresti muovialustasta riippuen. Hydroprint-muoviarkille painettujen sensorien pinnalle näytteen pipetoiminen ja levittäminen onnistui kaikkein helpoiten ja nopeimmin.

5.3 Vanhenemistestaukset

Vanhenemistestauksilla haluttiin selvittää, millainen säilytystapa olisi paras ja mikä käytetyistä entsyymiseoksista säilyisi parhaiten. Tyhjiöpussissa jääkaapissa säilytetyt sensorit säilyttivät aktiivisuutensa parhaiten, joten eri entsyymiseosten säilyvyyttä testattiin tällä säilytysmenetelmällä. Eri entsyymiseosten vanhenemistestaus vahvisti, että tyhjiöpussissa jääkaapissa säilytetyt sensorit säilyttivät aktiivisuutensa hyvin.

Kolmen erilaisen entsyymiseoksen säilymistä testattiin. Kaikki entsyymiseokset olivat säilyneet hyvin. Entsyymiseosta 17 sisältäneiden sensoreiden aktiivisuudet näyttivät kuitenkin kohonneen keskimäärin noin 10 prosenttia, mikä ei vastannut odotuksia. Tuloksiin saattoi vaikuttaa se, että mittaukset ennen ja jälkeen säilytyksen tehtiin eri potentiostaateilla, tai se että maltoosistandardien teossa olisi sattunut jokin virhe. Syy saattoi myös olla se, että tuoreissa sensoreissa ovalbumiini jollain tapaa deaktivoi entsyymien toimintaa. Seoksia 2 ja 8 sisältäneet sensorit käyttäytyivät odotetun kaltaisesti, ja ne mitattiin samana päivänä kuin seosta 17 sisältäneet sensorit.

5.4 A-amylaasistandardi mittaukset

Standardikuvaajasta 15 nähdään, ettei mitattujen standardien arvoilla saavutettu laskevan käyrän lineaarisuutta. Standardit näyttävät olevan liian suuria tai maltopentoosin määrä liian pieni, koska reaktio näyttää saavuttaneen tasapainotilan näillä standardeilla. Lineaarisuutta kannattaisi tutkia pienemmillä α -amylaasistandardin arvoilla välillä 100–400 U/ml, mikä vastaisi paremmin myös syljen amylaasientsyymien pitoisuutta.

6 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli optimoida biosensoreiden valmistuksessa käytettävien biomusteiden koostumusta maltoosi-, glukoosi- ja α -amylaasistandardikuvaajien avulla sekä selvittää biosensoreiden toimivuutta ja vanhenemista eri biomusteilla ja eri säilytysolosuhteissa.

Sensorit näyttivät toimivan maltoosistandardeilla kaikilla tutkituilla entsyymiseoksilla, tosin mittaustulokset vaihtelivat saman entsyymiseoksen sisällä riippuen mittausjännitteestä ja siitä, mille muovipinnalle sensori oli painettu. Eri muovipinnoille painettujen sensorien käytettävyydessä oli huomattavia eroja niin entsyymiseosten pipetoinnissa sensorille kuin standardinäytteiden mittaamisesakin. Millään tutkitulla seoksella ei saatu maltoosistandardikuvaajan suoran kulmakertoimelle kovin suurta arvoa eikä lineaarisuusalueissa ja hajonnoissa ollut kovin suuria eroavaisuuksia. Suurin kulmakertoimen itseisarvo ja paras lineaarisuus saatiin Valox-alustalle painetuilla sensoreilla, jotka oli käsitelty entsyymiseoksella 9 ($y = -0,3832x + 0,0022$, $R^2 = 0,9729$).

Maltoosistandardimittausten perusteella voidaan sanoa, että kolmen entsyymiseokset toimivat sensoreiden pinnalla toivotulla tavalla. Eri muovialustoille painettujen sensorien ja biomusteiden yhteensovittaminen vaatii vielä hieman optimointia.

Alfa-amylaasistandardien mittauksissa tutkittavat amylaasipitoisuuden olivat luultavasti liian suuria. Biosensorit toimivat, mutta maltopentoosi kului loppuun reaktioseoksesta ja reaktiot menivät loppuun eikä kuvaajasta voinut tehdä suurempia päätelmiä. Biosensorien toiminnasta voitaisiin ehkä saada enemmän tietoa pienemmillä α -amylaasistandardien arvoilla. Amylaasisensori vaatii vielä paljon tutkimusta, jotta saadaan α -amylaasientsyymi toimimaan sensorin pinnalla halutulla tavalla. Sensorin pitäisi toimia lineaarisesti pitoisuus välillä 100–350 U/ml α -amylaasia. Syljen α -amylaasi pitoisuus vaihtelee välillä 125–300 U/ml.

Rinnakkaisten mittausten välistä hajontaa oli jonkin verran kaikissa mittauksissa ja kaikilla standardeilla, koska entsyymiseokset pipetoitiin käsin sensorin pinnalle. Uskoisin hajonnan pienenevän biomusteen koneellisen dispensoinnin avulla huomattavasti.

LÄHTEET

1. Ronkainen, Niina J. – Halsall, H. Brian – Heineman, William R. 2010. Electrochemical biosensors. Chemical Society Reviews vol 39, s. 1747–1763.
2. Kotiranta, Olli 2012. Amperometrisen välittäjäaineanturin karakterisointilaitteiston suunnittelu ja toteutus. Diplomityö. Espoo: Aalto yliopisto, Elektroniikan laitos.
3. Harvey, David 2009. Analytical Chemistry 2.0. Saatavissa: http://acad.depauw.edu/harvey_web/eText%20Project/pdf%20file/AnalChem2.0.pdf. Hakupäivä 23.9.2014.
4. Turner, Anthony P. F. 2013. Biosensors: sense and sensibility. Chemical Society Reviews vol 42, s. 3175–3196.
5. Nissinen, Maria 2014. Printed electrochemical biosensor principles and applications. PRINSE´14 - seminaari 25. -26.2.2014.
6. Compendium of Chemical Terminology Gold Book, version 2.3.3, 2014-02-24. 2014. International Union of Pure and Applied Chemistry. Saatavissa: <http://goldbook.iupac.org/B00663.html>. Hakupäivä 23.9.2014
7. Mahosenaho, Mika – Caprio, Felice – Micheli, Laura – Sesay, Adama M. – Palleschi, Guisepppe – Virtanen, Vesa. 2010. A disposable biosensors for determination of alpha – amylase in human saliva. Springer-Verlag, Microchim Acta vol 170, s. 243–249.
8. Zou, Chao-Shi – Zhou, Mi – Xie, Gou-Ming – Lou, Peng – Xiong, Xing-Liang – Xu, Hua-Jian – Zheng, Jun 2008. Preparation of Disposable Saliva α – Amylase Biosensor. Chinese Journal of Analytical Chemistry vol 36, s. 1217–1220.

9. Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas 2002. Bioprosessitekniikka. 1.painos. Porvoo: WSOY.
10. Raba, Julio – Mottola, Horacio A. 1995. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol 25, Issue 1, s. 1–42.
11. Välimäki, Ilkka 2010. T440203 Laboratorion laatutoiminta, 3 op. Opintojakson luentomateriaali 2013. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö
12. Rohleder, Nicolas – Nater, Urs M. 2008. Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology* (2009), vol 34, s. 469–485.
13. Kivelä, Jyrki 1999. Human salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. Väitöskirja. Oulu: Oulun yliopisto, anatomian ja solubiologian laitos.

KÄYTETYT REAGENSSIT

Reagenssi	Tuote nro	Valmistaja
Maltose, maltopentaose (DP5)	47876 100mg	Sigma-Aldrich GmbH
Nafion 5 %	70160-25ML	Sigma-Aldrich GmbH
Bovine serum albumine, BSA	05482-25G	Sigma-Aldrich GmbH
glucose oxidase (Gox) from <i>Aspergillus niger</i> , type VII S (195 U/mg; EC 1.1.3.4)	G2133-50KU	Sigma-Aldrich GmbH
alpha-glucosidase (GD) from <i>Saccharomyces</i> sp., (133 U/mg; EC 3.2.1.20)	G0660-750UN	Sigma-Aldrich GmbH
alpha-amylase from human saliva (α -1,4-D-glucan 4- glucanohydrolase; EC 3.2.1.1; type IX-A)	A0521-500UN tai 2.5 KU	Sigma-Aldrich GmbH
mutarotase from porcine kidney (>1,500 U/mg, EC 5.1.3.3)	232-872-5	BBI Enzymes Ltd, Gwent UK,
Kaliumkloridi, KCl	26764.260	VWR
PBS, phosphate buffered saline	4417-100tabl	Sigma-Aldrich GmbH

LIUOSTEN VALMISTAMINEN

PBS pH 7.0 liuoksen valmistaminen

Yksi PBS-tabletti liuotettiin vajaaseen 200 ml:aan ultrapuhdasta vettä magneettisekoittajan avulla. Valmiin liuoksen pH säädettiin kalibroidun pH- mittarin ja 1 molaarisen suolahappoliuoksen avulla 7,0:aan. Liuoksen tilavuus säädettiin 200 ml:aan 200 ml mittapullon ja ultrapuhtaan veden avulla. Valmis liuos autoklavoitiin saman päivän aikana.

5 % BSA- ja ovalbumiini liuokset

5 % BSA-liuosta valmistettiin vain pieniä määriä kerrallaan. BSA-jauhetta punnittiin tarkasti ja punnitustuloksen avulla laskettiin mihin tilavuuteen PBS pH 7,0 -liuosta se tulisi liuottaa (50 mg/ml). Ovalbumiini liuos valmistettiin samalla tavoin PBS pH 7,0 -liuokseen.

Entsyymi-liuokset

Entsyymit oli liuotettu valmiiksi käyttöliuoksiksi 2–50 µl eriin 0,5 ml:n mikrosentrifuugiputkiin. Ne säilytettiin pakasteessa -18 °C:ssa. Entsyymien käyttöliuosvahvuudet olivat: mutarotaasi 6 U/µl, α-glukosidaasi 1 U/µl, glukoosioksidaasi 2 U/µl ja α-amylaasi 2 U/µl.

2,5 % Tween20 -liuos

Tween20 on hyvin viskoosista nestettä. 2,5 % Tween20 käyttöliuos tehtiin ultrapuhtaaseen autoklavoituun veteen (250 µl/10 ml vettä) ja sitä säilytettiin folioon käärityssä falcon – putkessa jääkaapissa.