



**KAPILLAARIELEKTROFOREESI – TOIMINTAPERIAATE JA
KÄYTTÖ DNA-ANALYTIKASSA**

Janne Mörttinen
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun Yliopisto

2021

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	1
2. KAPILLAARIELEKTROFOREESI (CE)	2
2.1. Kapillaarielektroforeesilaitteisto ja pääkomponentit	3
2.1.1. Kapillaari.....	5
2.1.2. Detektorit	5
2.2. Elektroforeettinen liike	9
2.3. Elektro-osmoottinen virtaus	10
2.4. Lämpötilan vaikutus analyysiin	14
2.5. Näytteensyöttö	16
2.6. Kapillaarielektroforeesin luokittelu	17
3. CE JA DNA:N ANALYSOIMINEN	21
3.1. CE ja syöpätutkimus	22
3.1.1. DNA:n hapettumisen tekemät vauriot.....	22
3.1.2. Pistemutaatiot	25
4. YHTEENVETO	27
5. KIRJALLISUUSVIITTEET	29

1. JOHDANTO

Kapillaarielektroforeesi eli lyhennettynä CE (Capillary Electrophoresis), on sähkökemian perustuva analyysimenetelmä, jota käytetään epäorgaanisten sekä orgaanisten yhdisteiden erottamisessa ja analysoimisessa. Sen avulla voidaan suorittaa kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia analyysejä tutkittaville näytteille. Menetelmä on kohtuullisen uusi ja se on saanut maailmanlaajuisia suosioita sen erotustehokkuudesta, nopeudesta sekä alhaisista käyttökustannuksistaan.

Kapillaarielektroforeesin avulla voidaan erottaa lukuisia molekyyliä, kuten epäorgaanisia anioneja/kationeja, aminohappoja, proteiineja sekä oligopeptidejä. Kapillaarielektroforeesi on hyvinkin monipuolinen erotusmenetelmä, ja sen sanotaan olevan jopa kilpaileva menetelmä HPLC:lle (*High Performance Liquid Chromatography*). Perinteisestä CE menetelmästä on kehitetty erilaisia versioita, jotka mahdollistavat erilaisten molekyylien erottamisen, joita ei perinteisellä menetelmällä pystyisi toteuttamaan.

Kapillaarielektroforeesia käytetään paljon erilaisilla osa-alueilla kuten vesianalytiikassa, rikostekniikassa, elintarviketeollisuudessa sekä lääketieteessä. Kapillaarielektroforeesiin liittyvä suosio sekä tutkimus on lisääntynyt, joten uusien käyttökohteiden etsiminen on kasvanut suuresti lähivuosina. Yksi merkittävimmistä tutkimuskohteista, jossa kapillaarielektroforeesia käytetään, on lääketiede ja etenkin DNA-analytiikka. CE menetelmän avulla voidaan tutkia muun muassa pistemutaatioita, kromosomaalisia poikkeavuuksia sekä hapettunutta DNA:ta, joka voi johtaa sairauksiin kuten Alzheimerin- tai Parkinsonin tauti.

Erotustehokkuudesta ja käytännöllisyydestä huolimatta, kapillaarielektroforeesilla on joitakin instrumentaalisia haasteita. Haasteita ovat muun muassa menetelmän analyysiherkkyys, alhainen resoluutio sekä lämpötilan muuttuminen kapillaarissa.

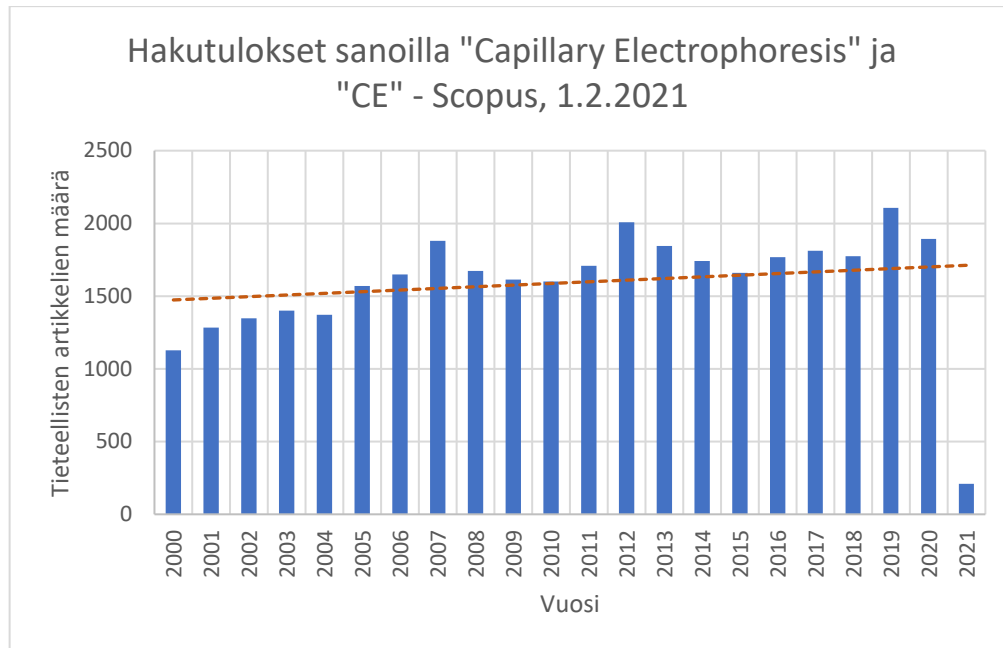
Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena on tutustua kapillaarielektroforeesin toimintaan teoreettisesta näkökulmasta, sekä tuoda esiin joitakin toiminnallisia haasteita. Tämän lisäksi lukijalle tuodaan tutuksi kapillaarielektroforeesin käyttöä lääketieteellisissä sovelluksissa, joista keskitytään lähinnä DNA-analytiikkaan sekä syöpätutkimuksiin.

2. KAPILLAARIELEKTROFOREESI (CE)

Molekyylit voivat esiintyä liuksissa varattuina komponentteina, ioneina. Ne voivat olla positiivisesti varautuneita kationeja tai negatiivisesti varautuneita anioneja. Kationit ja anionit pyrkivät kulkemaan vastakkaista varausta olevaa elektrodia kohti, mikäli ne asetetaan sähköisesti varattuun ympäristöön.¹ Ilmiössä on kyse yksinkertaisesta elektroforeettisesta liikkumisesta.^{1,2} Yhdistämällä tähän erilaisia ioneja, jotka eroavat toisistaan liikkumisnopeuksillaan vallitsevassa sähkökentässä, saadaan elektroforeettinen erotusmenetelmä, joista yleisimpänä tunnetaan levygeeli elektroforeesi (*slab-gel electrophoresis*).³

Liikkuvien ionien nopeudet ovat suoraan verrannollisia ulkoisen sähkökentän suuruuteen. Tätä verrannollisuuskerronta kutsutaan elektroforeettiseksi liikkumiseksi (*electrophoretic mobility*). Jokaisella molekyyllä on erisuuriset liikkumisnopeudet, sillä niiden liikkeeseen elektrolyyttiliuksessa eli puskuriliuksessa vaikuttaa niiden varaus/koko -suhde, sekä kapillaarissa käytetyn nesteen viskositeetti. Kapillaarielektroforeesin toiminta perustuu ionien erottamiseen niiden liikkumisnopeuksien avulla.^{1,4}

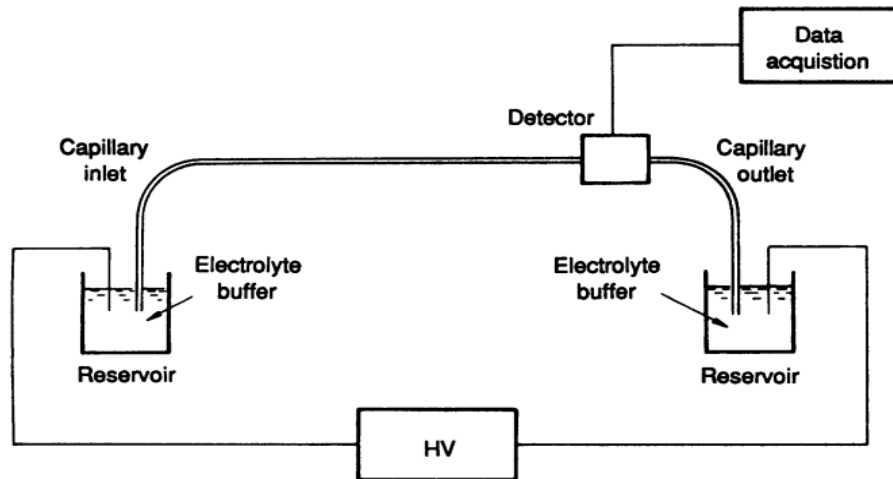
Perinteinen elektroforeettinen analyysimenetelmä (*free-zone electrophoresis*) on tyypillisesti erittäin hidas, työläs sekä haastava automatisoida. Se ei myöskään mahdollista kovinkaan luotettavia kvantitatiivisia tuloksia. Vuonna 1980 tutkittiin mahdollisuutta käyttää kapillaariputkia tutkittavien komponenttien erottamiseen sähkövirran avulla.⁵ Vuosien 1980–1990 aikana kapillaarielektroforeesi pääsi varsinaisesti käyttöön uutena analyysimenetelmänä.^{4,5} Lähivuosina CE menetelmän on todettu olevan jopa vaihtoehtoinen ja kilpaileva analyysimenetelmä tavanomaisesti käytetylle HPLC menetelmälle.⁶ Kapillaarielektroforeesi mahdollistaa nopeat analyysiajat, alhaiset analyysikustannukset, korkean resoluution sekä pienet näytteiden käyttömäärät.^{3,5} Kapillaarielektroforeesia käsittelevien tutkimusartikkelien määrä on ollut kasvussa 2000-luvun aikana. Alla olevasta kuvaajasta [Kuva 1] nähdään tieteellisten julkaisujen määrä avainsanoilla ”Capillary Electrophoresis” ja ”CE” vuosien 2000–2021 aikana. Haku suoritettiin Scopuksessa 1.2.2021, ja haku keskitettiin artikkelien otsikoihin. Kuvaajasta voidaan nähdä, että kapillaarielektroforeesiin liittyvien tieteellisten julkaisujen määrä on selvässä kasvussa (oranssi trendiviiva).



Kuva 1. Kapillaarielektroforeesia käsittelevien tieteellisten julkaisujen määrä, kun haku tehtiin avainsanoilla "Capillary Electrophoresis" ja "CE". Haku keskitettiin artikkelien otsikkoon. Haku suoritettiin Scopusksessa 1.2.2021.

2.1. Kapillaarielektroforeesilaitteisto ja pääkomponentit

CE menetelmän toiminta perustuu elektroforeesiin. Ainoana erona on se, että menetelmässä varatut ionit pääsevät liikkumaan vastakkaista sähkövarausta kohti kapillaaria pitkin ulkoisen sähkövirran avulla. Kapillaarin ansiosta elektrolyyttiliuos saa mekaanisen tukirangan, jota pitkin tutkittavat ionit pääsevät liikkumaan. Kapillaarin toiseen päähän voidaan asentaa detektori, jonka avulla voidaan tutkia näyteliuoksen sisältämien komponenttien ominaisuuksia.² Seuraavassa kuvassa [Kuva 2] on esitelty tyypillinen kapillaarielektroforeesilaitteisto.



Kuva 2. Kapillaarin päät (*capillary inlet ja capillary outlet*) asetetaan elektrolyyttiliuosastioihin (*reservoir*), jotka kytketään jännitelähteeseen (*HV = High Voltage*). Detektorin (*detector*) avulla saadaan tietoa näytteestä.¹ (julkaistu Elsevierin luvalla).

Tavanomainen kapillaarielektroforeesilaitteisto on kokonaisuudessaan siis melko yksinkertainen. Se koostuu kolmesta tärkeästä komponentista, jotka mahdollistavat laitteen toiminnan. Nämä ovat virtalähde, kapillaari ja detektori. Virtalähde mahdollistaa korkean sähkövirran, joka saa aikaiseksi molekyylien erottumisen kapillaarissa. Käytetty virtalähde muodostaa korkeita jännitteitä, jotka voivat vaihdella -30 kV ja $+30\text{ kV}$ välillä. Systemin polaarisuutta on voitava siis vaihtaa riippuen siitä, mitä varauksia näyteliuos sisältää. Taulukkoon [Taulukko 1] on koottu erilaisia jännitelukemia riippuen analysoitavasta näytteestä.¹⁻³

Taulukko 1. Erisuuruisia jännitteitä eri analyysille kapillaarielektroforeesissa.⁷⁻⁹

Jännitteen suuruus	Analyysi
1–10 kV	ssDNA (<i>single stranded DNA</i>) ja dsDNA (<i>double stranded DNA</i>)
Näytteen injektio: 15 kV Erotus: 20 kV	CE-LIF analyysi tutkittaessa vaurioitunutta nukleotidia
Näytteen injektio: 167 V/cm Erotus: 250 V/cm	Valkosoluista ja luuytimestä erotetun ihmisen DNA, geenin p53 pistemutaatio

2.1.1. Kapillaari

Kapillaarielektroforeesin tärkein komponentti on ehdottomasti kapillaari. Kapillaareina käytetään yleisesti kvarstilasista valmistettua kapillaaria (*fused silica capillary*). Kapillaareja on myös tehty muista materiaaleista, kuten teflonista ja borosilikaattilasista.¹⁰ Kapillaarin sisäpinta koostuu silanolimolekyyleistä, *SiOH*. Kvartsilasikapillaarin yleistynyt käyttö CE:ssä juontuu sen hyödyllisistä ominaisuuksista, kuten sen mahdollisuudesta saada aikaan elektro-osmoottinen virtaus (*electro-osmotic flow*) silanolimolekyylien ansiosta. Kvartsilasia on myös helppo työstää. Siitä voi esimerkiksi valmistaa kapillaareja, joiden halkaisija on vain muutamia mikrometrejä.^{3,10} Kapillaarin sisähalkaisija vaihtelee 10–200 μm välillä ja pituus 10–100 *cm* välillä. Kapillaari voi olla tarvittaessa myös yli 100 *cm* pitkä.^{1,2}

Kapillaarit voidaan jakaa useampaan kategoriaan, riippuen siitä mikä niiden käyttötarkoitus on. Mikäli käytetään kapillaaria, jossa silanolimolekyylejä ei peitetä, puhutaan pinnoittamattomasta kapillaarista. Pinnoittamatonta kapillaaria käytetään silloin, kun elektro-osmoottisen virtauksen halutaan tapahtuvan voimakkaammin. Pinnoittamattomia kapillaareja käytetään, kun analysoidaan epäorgaanisia ja kevyitä orgaanisia molekyylejä kuten anioneja, kationeja tai orgaanisia happoja. Tämän lisäksi voidaan analysoida joitain pienempiä aminohappoja, peptideitä sekä joitain proteiineja.²

Peittämällä tai pinnoittamalla kapillaari, voidaan elektro-osmoottista virtausta vaimentaa. Tämä on hyödyllistä analysoitaessa isompia molekyylejä, kuten pitkäketjuisia proteiineja, sillä niiden ei haluta vuorovaikuttavan kapillaarin seinämällä olevien silanolimolekyylien kanssa.²

2.1.2. Detektorit

Monet kapillaarielektroforeesissa käytetyt detektorit ovat saman kaltaisia toiminnaltaan kuin HPLC:ssä.³ Kapillaarielektroforeesissa näytemäärät ovat hyvinkin pieniä (0,1–10 *nl*), joten haasteena on löytää oikeanlainen detektorit, joka kykenee havaitsemaan yksittäisiä näytekomponentteja mahdollisimman hyvällä

resoluutiolla eli erotuskyvyllä.¹ Alle taulukkoon [Taulukko 2] on listattu erilaisia detektointimenetelmiä, joita voidaan kapillaarielektroforeesissa käyttää.

Taulukko 2. Detektointimenetelmät CE:lle.^{1,3,11}

Detektointimenetelmät	
<u>Spektrometriaa soveltavat detektointimenetelmät</u>	<u>Sähkökemialla soveltavat detektointimenetelmät</u>
<i>Fluoresenssi</i>	<i>Potentiometria</i>
<i>Absorbanssi</i>	<i>Amperometria</i>
<i>Raman</i>	<i>Konduktivisuus</i>
<i>Kemiluminesenssi</i>	-
<i>Massaspektrometria</i>	-

Absorptio- ja fluoresenssimenetelmiä käytetään kapillaarielektroforeesissa eniten, absorptiomenetelmien ollessa yleisimpiä.^{3,12} Tässä kappaleessa tutustutaan molempiin, ja perehdytään niiden toiminnan haasteisiin.

UV/VIS detektorit. Absorptiota mittaavia detektoreita käytetään, kun tarkastellaan mikrotasolla tapahtuvaa erottumista. Monet orgaaniset komponentit voidaan havaita 195–210 nm aallonpituuden alueella. Monilla orgaanisilla komponenteilla on kuitenkin melko hyvä kyky absorboida UV valoa 160–180 nm alueella, sillä niiden molaariset absorptiokertoimet ovat melko alhaiset. Toisaalta on todettu, että komponentit, joissa ei ole π -sidosta, aiheuttaa keskimäärin heikkoa signaali-kohinasuhdetta aallonpituusalueella >190 nm. Vaikka näkyvän valon UV-absorptio on menetelmänä hyvin soveltuva monille eri näytteille, niin sen antamat tulokset ja niiden tarkkuudet eivät ole aina yhtä universaaleja.¹¹ Tästä huolimatta, absorptiota mittaavat detektorit ovat yleisimpiä CE analyyseissä. Detektointimenetelmä sisältää paljon etuja, mutta sen alhainen herkkyys on tuonut paljon haasteita, jotka ovat rajoittaneet sen käyttöä analyyseissä.^{12,13}

Näkyvää UV absorptiota käytetään, kun erotetaan DNA-peptidi kompleksista sitomattomia tetrapeptideitä (*oligopeptidi*). Tetrapeptidien absorbanssi signaaleita käytetään muodostamaan "Scatchard"-kuvaaja. Kuvaajan perusteella voidaan määrittää DNA-peptidin sitoutumisvakion suuruus (*binding constant*), jolla

tarkoitetaan sen sidoksen voimakkuutta, jolla DNA-peptidit ovat kiinni toisissaan. Sidoksen voimakkuuden on havaittu olevan suuruusluokkaa 10^2 – 10^6 M^{-1} .¹¹

Hu, T. et al.¹¹ tutkivat CE menetelmällä aminohappojohdannaista, eforniitiinia (2,5-diamino-2-(difluorimetyyli)pentaanihappo, $C_6H_{12}F_2N_2O_2$), joka tunnetaan myös lyhenteellä DFMO.¹¹ Eforniitiinin kykyä toimia inhibiittorina on tutkittu pitkään. Se toimii eräänlaisena syöpälääkkeenä, sillä se kykenee heikentämään paksusuolen karsinoomasolujen toimintaa. Paksusuolen karsinoomasolut – tunnetaan myös nimellä ODC – ovat entsyymejä, joiden on havaittu aiheuttavan solujen kasvamista sekä mutaatiota.¹⁴ Tutkimuksessa analysoitiin DFMO:ta plasman mikrodialyysinäytteistä, käyttäen kapillaarielektroforeesia sekä absorbanssia detektoimiseen. Ei-UV-aktiivinen DFMO muutetaan UV-aktiiviseksi (*N-substituted 1-cyanobenz[f]isoindole [CBI]*), kun se reagoi NDA-CN kanssa (*naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-cyanide*) 10 pH arvoisessa boraatti puskuriliuoksessa. Käyttämällä UV aallonpituutta 254 nm, havaittiin DFMO:ta onnistuneesti.¹¹

Kapillaarissa matka näytteen ja detektorin välillä on erittäin lyhyt, sillä kapillaarin sisähalkaisijan on niin pieni. Tämä johtaa siihen, että näytteitä, joilla on alhainen absorptiviteetti, on erittäin vaikea havaita detektorilla.¹¹ On pyritty löytämään erilaisia keinoja, joiden avulla voitaisiin kasvattaa mittausmatkaa näytteen ja detektorin välillä. Yksi näistä keinoista, on käyttää niin sanottua "Z-muotoista" detektorisolua (Z-solu). Ideana on taivuttaa kapillaari Z-muotoon, joka johtaa mittausmatkaan, joka on lähes kymmenen kertaa suurempi kuin kapillaarin halkaisija. Mittausmatkan pidentäminen voi johtaa osaltaan vasteiden tehokkuuden (*peak efficiency*) alenemiseen, ja siten myös resoluution heikkenemiseen. Parantaakseen tehokkuutta Z-soluissa, voidaan näytelähteen ja Z-solun, sekä Z-solun ja detektorin väliin asentaa pallolinssejä. Linssin ansiosta absorptiomenetelmän herkkyyttä voidaan kasvattaa, sillä se keskittää UV-valon Z-soluun ja suoraan detektorille. Voidaan myös muodostaa "kupla" lähelle kapillaarin loppuosaa. Esimerkiksi kapillaari, jonka halkaisija on 50 μm , voidaan muodostaa kupla, jonka halkaisija on 150 μm , jolloin mittausmatka jopa kolminkertaistuu.³

Tähän mennessä lupaavin tapa kasvattaa mittausmatkaa absorptiomenetelmässä, on pinnoittaa kapillaarin sisäpinta heijastavalla hopealla.¹¹ Kaksi ikkunaa sijoitetaan vastakkaisille puolille kapillaaria, 1,5 mm välille toisistaan.

Ensimmäisen ikkunan taakse sijoitetaan UV-valonlähde, ja toiselle detektori.¹¹ Peittämällä valonlähteen ja detektorin välinen matka hopealla, voidaan kasvattaa mittaamatkaa, sillä valo heijastuu hopean kautta monta kertaa mittauksen aikana.³ Menetelmällä on havaittu olevan jopa 40 kertaa paremmat tulokset absorption toteamisrajoissa (LOD, *Limit of Detection*), verrattuna kvartsilasikapillaariin.¹¹ Tämän tekniikan geometria tosin johtaa suurempaan näytetilavuuteen (6,6 *nl* tai muutama millimetri kapillaarista), joka taas tarkoittaa heikentyneitä erotustehokkuutta.

Yhdessä melko epätavallisessa, mutta mielenkiintoisessa absorbanssia mittaavassa menetelmässä, käytettiin pietsosähköistä muuntajaa (*piezoelectric transducer*).¹² Sen avulla mitattiin kapillaarin mekaanista värähtelyä, joka saatiin aikaiseksi sähkömagneettisella säteilyllä. Tämän menetelmän avulla havaittiin niinkin pieniä absorbanssin vaihteluja kuin $8,5 \cdot 10^{-7}$.¹²

Kaiken kaikkiaan absorbanssia mittaavia detektoreita rajoittaa Beerin ja Lambertin laki, sillä kapillaarielektroforeesissa mitataan hyvin pieniä näytemääriä, hyvinkin suurella taustalla. Johtuen tästä, absorbanssia mittaavissa menetelmissä on keskimäärin melko alhainen konsentraation toteamisrajoissa, luokkaa $10^{-6} M$.¹¹

Fluoresenssiin perustuva detektointi. Fluoresenssidetektorit ovat yleisesti paljon herkempiä verrattuna UV-absorptioon. Verratessa menetelmien herkkyyttä, on fluoresenssilla saavutettu jopa 100–1000-kertainen parannus. Tämä johtuneen siitä, että taustasäteily on mittauksen aikana hyvin alhainen.¹ Fluoresenssidetektorit perustuvat myös UV-valon toimintaan. Menetelmää voidaan käyttää UV-lasereiden avulla (*laserindusoitu fluoresenssi, LIF*) sekä UV-lampuilla. LIF on nykypäivänä yksi herkimmistä analyttisistä detektointimenetelmistä. Sen avulla voidaan havaita erittäin pieniä pitoisuuksia. Parhaiden LIF-systeemien toteamisraja on reilusti alle $10^{-13} M$.^{11,12}

Fluoresenssiin perustuvissa detektoreissa yleisenä rajoittavana tekijänä on se, että keskimäärin melko pieni osa molekyyleistä kykenee fluoresoimaan. Tätä korjataan sillä, että ei-fluoresoivat molekyylit ”merkataan” fluoresoivilla molekyyliillä.^{1,11,12} Vaihtoehtoinen menetelmä ei-fluoresoivien molekyylien havaitsemiseen, on käyttää epäsuoraa fluoresoivaa menetelmää. Tässä menetelmässä fluoresoivaa molekyyliä laitetaan kapillaariin elektrolyyttiliuokseen,

jolloin ei-fluoresoivat molekyylit havaitaan fluoresoivassa molekyylissä tapahtuvien varauksien muutosten avulla.¹

*Novotny et al.*¹¹ tutkivat LIF menetelmän käyttöä havaitsemaan aminohappoja molekyylitasolla. Menetelmässä käytettiin valonlähteenä HeCd-laseria (helium-kadmium), joka sädetettiin ja fokusoitiin suoraan kapillaaria kohti. Fluoresenssisignaali kuljetettiin 90°:ssa valokuidun avulla valomonistinputkeen (*photomultiplier tube*, PMT), joka oli yhteydessä taustahäiriötä peittävään "lock-in" vahvistimeen (lock-in amplifier). Ennen erottamista kapillaarissa, näytteisiin lisättiin molekyyli, $C_{18}H_{11}NO_4$ (*3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde*), mikä kykeni fluoresoimaan.¹¹

Fluoresoivien molekyylien liittäminen näytteisiin on mahdollista, mutta se on usein melko monimutkaista kemiaa, ja lisäksi koko prosessi on aikaa vievää.^{3,12} Jotkin molekyylit kykenevät fluoresoimaan luonnostaan hyvin pieniä määriä, jota on vaikea havaita fluoresenssidetektorilla. Mitatakseen tätä fluoresoivaa säteilyä, voidaan näytteet virittää näkyvällä UV-valolla. Tämän lisäksi käytetään laservalona Ar-ioni laseria (*frequency-doubled Ar-ion laser*), 257 nm aallonpituudella. Kananmunan valkuaisen glykoproteiinia, konalbumiinia, onnistuttiin havaitsemaan tätä laseria käyttäen, toteamisrajan arvolla $1,4 \cdot 10^{-8} M$.¹¹

Mahdollisuus mitata molekyylien luonnollista fluoresenssia johtaa siihen, ettei molekyylijä tarvitse "leimata" fluoresoivilla molekyyleillä, jolloin analyysit ovat yksinkertaisempia ja analyysiajat ovat lyhyempiä. Esimerkiksi peptidit, joissa on lähteitä tryptofaanista, fluoresoivat $\lambda_{ex} < 220 \text{ nm}$. Haittapuolena monilla molekyyleillä on, että luonnollinen fluoresenssi on niin heikkoa, että se usein peittyi taustasignaalin alle.¹¹

2.2. Elektroforeettinen liike

Elektroforeesi määritellään ionien siirtymisenä (*migration*) ulkoisen sähkökentän vaikutuksesta jossakin valitussa ympäristössä. Sähkökenttä aiheuttaa voiman ($F_E = qE$), joka on suoraan verrannollinen teholliseen varaukseen q , sekä sähkökentän voimakkuuteen E . Kentässä olevan ionin liikettä vastustaa voima ($F_f = f v_{ioni}$), joka on suoraan verrannollinen kitkaa aiheuttavaan kitkavakioon f , sekä ionin

liikkumisnopeuteen v_{ioni} . Sähkökentän voimakkuus F_E aiheuttaa ioniin vetovoiman. Ioniin vaikuttava kitkavoima F_f on vastakkaissuuntainen sähkökentän voimakkuuteen nähden. Lopulta voimat saavuttavat samansuuruiset arvot, ja ioni saavuttaa vakionopeuden v_e . Tällöin vastavoimat ovat yhtä suuret, ja voidaan kirjoittaa yhtälö (1):¹⁰

$$qE = fv_e. \quad (1)$$

Ratkaisemalla yhtälöstä (1) ionin nopeus, saadaan yhtälö muotoon (2):

$$v_e = \frac{q}{f}E = \mu_e E. \quad (2)$$

Huomataan, että $\mu_e = \frac{q}{f}$. Tässä μ_e ($cm^2V^{-1}s^{-1}$) kuvaa ionin elektroforeettisen liikkeen suuruutta. Se on suoraan verrannollinen ionin varaukseen q , sekä kääntäen verrannollinen kitkavakioon f .¹⁰ Kitkavakion suuruuteen vaikuttavat tarkasteltavan ionin suuruus ja muoto, eli sen hydrodynaaminen säde, r , sekä käytetyn elektrolyyttiliuoksen viskositeettisuus, η .^{2,10} Kitkavakio voidaan määrittää yhtälöllä (3):¹⁰

$$f = 6\pi\eta r. \quad (3)$$

Yhtälöistä (2) ja (3) seuraa, että suurempi ioni johtaa pienempään elektroforeettisen liikkeen suuruuteen.

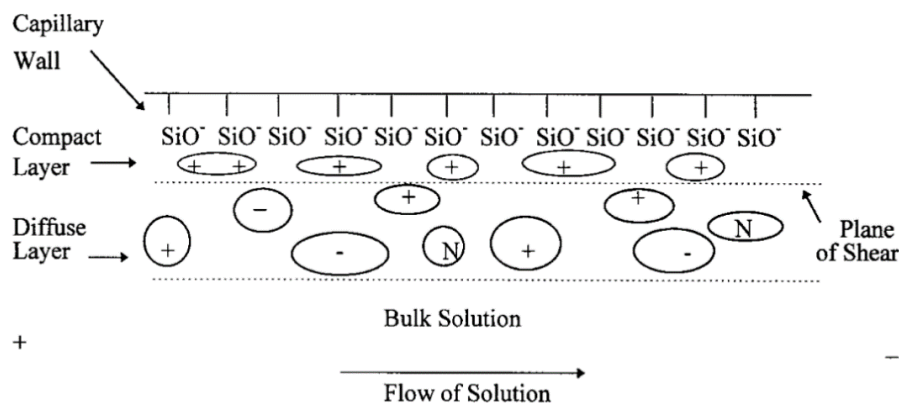
2.3. Elektro-osmoottinen virtaus

Elektro-osmoottisella virtauksella (*Electroosmotic Flow, EOF*) tarkoitetaan nesteen liikettä ulkoisen sähkökentän vaikutuksesta.² Kuvitellaan ruisku, jonka sisällä on nestettä. Ruiskun mäntää painamalla, neste liikkuu ruiskun päästä toiseen. Elektro-osmoottisessa virtauksessa idea on käytännössä sama. Siinä mäntään kohdistuvana puristava voimana, toimii sähkökentän synnyttämä voima ja ruiskuna kvartsilasikapillaari.

Elektro-osmoottinen virtauksen saa aikaiseksi kapillaarin sisäpinnalla sijaitsevien silanoli -molekyyliden ($SiOH$) ionisoituminen.^{3,10} Kapillaarin pinnassa olevat silanoli -ryhmät ionisoituvat, kun $pH > 2$.^{2,10} Ionisoituminen tapahtuu reaktion (4) mukaan:



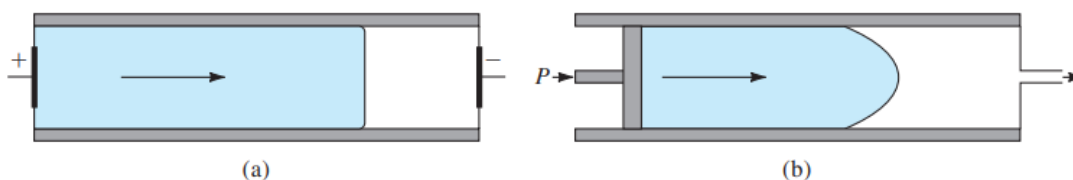
Ionisoituneiden silanoli -molekyyliden negatiiviset varaukset tasapainottuvat, kun osa positiivisesti varatuista elektrolyyttiliuoksen kationeista suuntaavat kapillaarin suuntaisesti SiO^{-} -ryhmiä kohti. Tällöin muodostuu niin sanottu ”electric double layer”, jossa negatiivisesti varattuun kapillaariin suunnanneet kationit muodostavat kompaktin kerroksen ja kapillaarin keskellä olevat kationit muodostavat diffuusiokerroksen.¹⁰ Ulkoisen sähkökentän vaikutuksesta, diffuusiokerroksessa löyhemmin sijaitsevat kationit kykenevät liikkumaan katodia kohti, jolloin siihen liuenneisiin ioneihin kohdistuu saman suuntainen vetovoima.^{3,10} Tätä liikettä kutsutaan elektro-osmoottiseksi liikkeeksi [**Kuva 3**].



Kuva 3. Kapillaarissa tapahtuvaa elektro-osmoottista virtausta, joka johtuu silanoli -molekyyliden ionisoitumisesta elektrolyyttiliuoksen läsnäollessa. Elektrolyyttiliuos muodostaa kapillaarin seinämälle sähköisesti varatun kerroksen. Löyhemmin sitoutuneet diffuusiokerroksen (Diffuse Layer) kationit kykenevät liikkumaan kapillaarissa sähkökentän vaikutuksesta.² (julkaistu Elsevierin luvalla).

Kapillaarissa elektro-osmoottinen virtaus vaimenee, mikäli vallitseva pH-arvo laskee. Alhaisissa pH-arvoissa negatiivisesti varautuneet SiO^{-} -molekyylit protonoituvat takaisin $SiOH$ -molekyyleiksi, reaktion (4) mukaan. Elektro-osmoottista virtausta voidaan myös tarvittaessa vaimentaa, peittämällä/pinnoittamalla kapillaari materiaalilla mikä vähentää silanoli -molekyyliden ionisoitumista. Tällainen materiaali on esimerkiksi *polyakryyliamidi* tai *metyyliselluloosa*.¹⁰

Ajettaessa paksua ja kasaan puristamatonta nestettä sylinterimäistä putkea pitkin paineen avulla, päädytään kuvan [Kuva 4. (b)] mukaiseen tilanteeseen. Nesteellä on tässä tilanteessa *parabolinen virtaus*. Nesteen nopeus hidastuu sylinterin seinämällä, mutta jopa nelinkertaistuu sylinterin keskellä, muodostaen nesteelle luotimaisen kärjen. Elektro-osmoottisen virtauksen virtausprofiili nähdään kuvassa [Kuva 4. (a)]. Nesteen kärki on lähes täysin tasainen, jolloin puhutaan *tulppavirtauksesta (plug-flow)*. Virtausprofiili on tasainen, koska varausepätasapaino on suurinta kapillaarin sisäseinämien lähellä, missä silanolimolekyylit sekä elektrolyyttiliuos kohtaavat. ¹ Elektro-osmoottinen virtaus ei siis merkittävästi vaikuta piikkien levenemiseen (*band broadening*) virtausprofiilin tasaisuuden vuoksi.³



Kuva 4. (a) elektro-osmoosin aiheuttama tulppavirtaus, (b) paineen aiheuttama parabolinen virtaus.³ (julkaistu CENGAGE:n luvalla).

Elektro-osmoottinen virtauksen suuruus on tavanomaisesti suurempi kuin elektroforeettisen liikkeen aiheuttama yksittäisen ionin nopeuden suuruus.³ Siispä elektro-osmoottinen virtaus on erittäin tärkeä parametri, kun halutaan optimoida CE:n erotustehokkuutta.¹² Vaikka näytteet liikkuvat kapillaarissa riippuen niiden varauksista, elektro-osmoottisen virtauksen ansiosta voidaan kaikkia kationeja, anioneja sekä neutraaleja molekyylejä liikuttaa kapillaarin samaan päähän detektorille.³

Elektro-osmoottinen virtaus antaa ionille nopeuden samalla periaatteella, kuin elektroforeettinen liike yhtälössä (2). Elektro-osmoottisen virtauksen aiheuttama ionin nopeus on muotoa (5):

$$v_{eo} = \mu_{eo}E. \quad (5)$$

jossa μ_{eo} kuvaa elektro-osmoottisen virtauksen suuruutta ($cm^2V^{-1}s^{-1}$).

Elektro-osmoottisen virtauksen läsnä ollessa, yksittäisen ionin saavuttama vakionopeus kapillaarissa on elektroforeettisen liikkeen sekä elektro-osmoottisen virtauksen summa (6):

$$v_{eo} = (\mu_e + \mu_{eo})E. \quad (6)$$

Elektro-osmoottisen virtauksen suuruuteen vaikuttaa zetapotentialiaali ξ . Zetapotentialiaali on kompaktin kerroksen sekä diffuusiokerroksen välisien tilojen elektrostaattisten vuorovaikutuksien suuruus, joka riippuu käytetyn elektrolyyttiliuoksen viskositeettisuudesta η , sekä sen dielektrisestä vakiosta ε (suhteellinen permittiivisyys), yhtälön (7) mukaan: ^{2,10}

$$\xi = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\varepsilon}. \quad (7)$$

Ratkaisemalla edellä olevasta yhtälöstä μ_{eo} , saadaan yhtälö muotoon (8):

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon\xi}{4\pi\eta}. \quad (8)$$

Elektro-osmoottisen virtauksen aiheuttama ionin nopeuden suuruuteen vaikuttaa μ_{eo} , sekä yhtäläillä sähkökentän potentiaalinen suuruus, E . Voidaan ratkaista elektro-osmoosin aiheuttama ionin nopeus yhtälöllä (9): ^{2,3,10}

$$v_{eo} = \mu_{eo}E = \frac{\varepsilon\xi}{4\pi\eta}E. \quad (9)$$

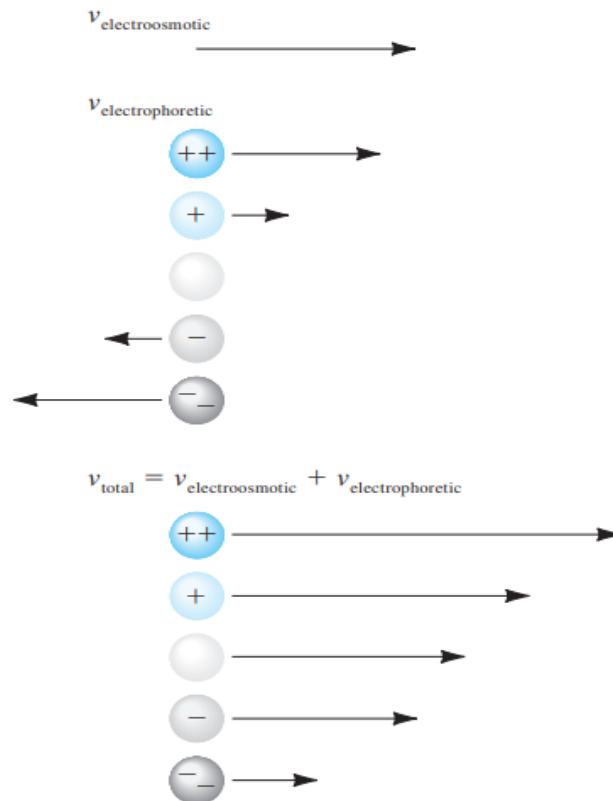
Mikäli kapillaarissa tapahtuu elektroforeettisen liikkeen lisäksi elektro-osmoottista virtausta, saadaan nesteen virtaukselle vektorisumma (*apparent mobility*) yhtälön (10) mukaan: ^{3,10}

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}. \quad (10)$$

Ionin nopeus voidaan nyt määrittää nesteen virtauksen vektorisumman, μ_{app} , avulla yhtälöllä (11):

$$v_{app} = \mu_{app}E. \quad (11)$$

Ionien eluotumisjärjestys riippuu nyt ionin koosta, varauksesta, nesteen viskositeetista sekä elektro-osmoottisesta virtauksesta. On järkevää siis ajatella, että ioni, jolla on suurempi tehollinen varaus, q , sekä pienempi hydrodynaaminen säde, r , liikkuu nopeammin kuin sellainen ioni, jolla on heikko varaus ja joka on suuri kokoinen. Kuva [Kuva 5] havainnollistaa erilaisten ionien eluotumisjärjestystä kapillaarissa.



Kuva 5. Erilaisten eluotuvien ionien vektorinopeudet elektro-osmoottisen virtauksen läsnäollessa. ³ (julkaistu CENGAGE:n luvalla).

2.4. Lämpötilan vaikutus analyysiin

Yksi rajoittavista tekijöistä kapillaarielektroforeesin toiminnassa, on lämpötilan radikaali muuttuminen kapillaarissa. CE menetelmässä esiintyy yleisesti termi "joule heating" eli joulelämpeneminen. Joulelämpeneminen on riippuvainen kentän sähkövirrasta sekä kapillaarin suuruudesta. Lämpötilan kasvu johtuu sähkövirran aikaan saamasta konduktiosta, kun näyteionit sekä elektrolyyttiliuoksen ionit törmäilevät toisiinsa korkeissa sähkövirroissa. Mitä pienempi kapillaarin

sisähalkaisija, sitä suurempi lämpöhäviö.^{2,15} Joulelämpenemisen tiedetään vaikuttavan elektro-osmoottiseen virtaukseen (EOF), näytteiden diffuusioon sekä kaiken kaikkiaan erotustehokkuuteen sekä analyysin toistettavuuteen.¹⁶ Ilman lämpöhäviötä, esimerkiksi jäähdytetyn kapillaarin ansiosta, lämpötilan kasvu liian korkeaksi voi johtaa näytteen hajoamiseen, kuten biomolekyyli-rakenteiden dissosioitumiseen.¹⁵ On siis syytä tutkia lämpötilan vaikutusta kapillaarielektroforeesissa, mikäli halutaan luotettavia tuloksia.

Kapillaaria jäähdytetään ainoastaan ulkopuolelta, joten lämpötilaero näyteliuksen keskellä ja kapillaarin sisäseinällä voi olla merkittävä. Tämä johtaa siihen, että viskositeettisuus näyteliuksen keskellä on alhaisempi, verrattuna kapillaarin reunoilla olevaan liuokseen. Viskositeettisuuden on havaittu laskevat jopa 2,7 % yhtä celsiusastetta kohden. *Lukacs et al.*² tutkivat kapillaarin erotustehokkuuden riippuvuutta kapillaarin halkaisijasta ja pituudesta jatkuvavirtaisella (15 kV) Pyrex kapillaarilla. He huomasivat, että mitä ohuempi kapillaari on, sitä parempi sen erotustehokkuus on. Erotustehokkuuden kasvu oli merkittävintä, kun kapillaarin halkaisijaa pienennettiin alle 80 μm . He totesivat, että näillä halkaisijan arvoilla saavutetaan alhaisin lämpögradientti. *Lukacs et al.*² myös raportoivat, että erotustehokkuus paranee, kun kapillaarin pituutta kasvatetaan maksimissaan 90 cm pitkäksi. He päättelivät, että tällä kapillaarin pituudella sähkökentän voimakkuus oli sen verran alhainen, että kapillaari kykeni jäähtymään tarpeeksi tehokkaasti.²

Lämpötilan haittavaikutuksista huolimatta, sen avulla voidaan saada tarvittavaakin tietoa näytteistä. *Gelfi, Cremonesi et al.*¹⁷ tutkivat kromosomaalisen DNA:n pistemutaatioita, käyttämällä kapillaarigeielektroforeesin (cGE) sovellutusta [tutustutaan luvussa 2.6] TGGE:ta (*temperature gradient gel electrophoresis*). TGGE:n avulla voidaan määrittää sulamispisteitä erilaisille mutatoituneille, tai PCR:n (*polymeraasiketjureaktio*) avulla monistetuille DNA fragmenteille. Menetelmässä DNA fragmentit injektoidaan kapillaariin. Fragmenttien lämpötilaa on ylläpidetty hieman alle oletettuja sulamispistearvoja T_m . Lämpötilan kasvuväli on melko alhainen (1–1,5 °C), ja sen kasvunopeus on myös hidas (noin 0,05 °C/min). Lämpötilaa ei nosteta ulkoisesti, vaan se suoritetaan kapillaarin sisällä hyödyntäen edellä mainittua joule lämpenemistä. Sulamispisteiden avulla saadaan tietoa pistemutaatioista. Sulamispisteet vaihtelevat 45–70 °C välillä.¹⁷

2.5. Näytteensyöttö

Tutkittava näyte on ensin syötettävä kapillaariin, ennen kuin voidaan suorittaa minkäänlaista analyysiä. Jotta voidaan saavuttaa korkeita resoluutioita, syötetyn näytteen tilavuuden on oltava erittäin pieni verrattuna käytetyn kapillaarin tilavuuteen. Esimerkiksi 1 m pituinen kapillaari, jonka sisähalkaisija on 75 μm , on tilavuudeltaan 5 μl . Joten tähän verrattuna, syötetyn näytteen tilavuuden on oltava luokkaa 5–50 nl .¹ Mikäli syötetään liian suuri näytetilavuus, saattaa lopputuloksena olla kuvaaja, jossa näytepiikit ovat liian suuria, epäselviä tai vääristyneitä.

Näytteensyöttö suoritetaan tavanomaisesti kahdella menetelmällä: *elektrokineettinen injektio* tai *hydrostaattinen injektio*. Elektrokineettisellä injektioilla tarkoitetaan näytteen ”pumppaamista” kapillaariin elektro-osmoosin avulla. Menetelmä perustuu siihen, että toinen kapillaarin päistä poistetaan elektrolyyttiastiasta, ja se laitetaan toiseen astiaan, jossa on näytettä. Seuraavaksi muodostetaan sähkövirta kapillaarin molempiin päihin valituksi ajaksi, jonka seurauksena oikea määrä näytettä siirtyy kapillaariin elektro-osmoottisen virran ansiosta. Näytteen syötön jälkeen, kapillaarin pää asetetaan takaisin elektrolyyttiliuosta sisältävään astiaan ja analyysi voidaan suorittaa. Tämä menetelmä on yleisesti käytetyin, sillä se on melko yksinkertainen ja helppo toteuttaa.^{1,3}

Elektrokineettisen injektion haittapuolena on se, että kapillaariin siirtyy enemmän niitä molekyyliä, joiden nopeuden ovat suurimmat.¹ Tämä tarkoittaa sitä, että niitä molekyyliä pääsee kapillaariin enemmän, joiden hydrodynaaminen säde on pieni ja varaus suuri. Molekyylien korkeampi määrä kapillaarissa voi johtaa vääristyneisiin tuloksiin, sillä näytteen pitoisuus detektorilla ei ehkä vastaa sitä, mikä näytteessä oikeasti on.

Hydrostaattinen injektio eli paineen avulla syöttäminen, tarkoittaa että kapillaarin molempiin päihin aiheutetaan paine-ero, jonka avulla näytettä ajetaan oikea määrä kapillaariin. Samalla tavalla kuten elektrokineettisessä injektiossa, hydrostaattisessa injektiossa kapillaarin toinen pää laitetaan astiaan, jossa on näytettä. Tällä kertaa astiassa ja kapillaarin sisällä on paine-ero. Paine-ero voidaan saada aikaiseksi siten, että asetetaan kapillaarin detektoripäähän vakuumpumppu,

tai nostamalla sitä kapillaarin päätä ylemmäs, josta näyte syötetään sisälle (*hydrodynaaminen injektio*).^{1,3}

Näytteen syöttäminen kapillaariin paineen avulla voi johtaa asymmetrisiin piikkeihin detektorilla, johtuen paineen aiheuttamasta parabolisesta virtausprofiilista [Kuva 4. (b)]. Piikkien asymmetrian korjaamiseksi on ehdotettu menetelmää, jossa näytteen injektioimisen jälkeen, suoritetaan ylimääräinen paineen syöttö ajettavan näytteen etu- ja takaosaan. Tällä tavalla havaitaan symmetrisempiä piikkejä.¹⁸

Mikroinjektiopäät (*microinjection tips*) ovat kapillaareista rakennettuja kappaleita, joiden halkaisija on niin pieni, että niiden ansiosta kyetään injektioimaan kapillaariin näytteitä ympäristöistä, joiden tilavuus on pikolitran (*pl*) luokkaa. Näiden kappaleiden avulla voidaan ottaa näytteitä yksittäisistä soluista tai solujen sisällä olevien rakenteiden sisältä. Mikroinjektiopäitä on käytetty esimerkiksi tutkittaessa aminohappoja tai jopa aivojen välittäjäaineita.³

2.6. Kapillaarielektroforeesin luokittelu

Kapillaarielektroforeesi voidaan luokitella useampaan ryhmään sen toiminnan mukaan. Luokittelu perustuu siihen, kuinka elektro-osmoottinen virtaus käyttäytyy kapillaarissa.² Alla olevaan taulukkoon [Taulukko 3] on koottu kapillaarielektroforeesin eri luokitteluryhmien mukaiset nimet.

Taulukko 3. Kapillaarielektroforeesin luokittelu elektro-osmoosin mukaan.^{2,19-21}

Elektro-osmoottinen virtaus	Vastakkaissuuntainen elektro-osmoosittinen virtaus	Ei elektro-osmoottista virtausta
<p>CZE (<i>Capillary zone electrophoresis</i>)</p> <p>MECC tai MEKC (<i>Micellar electrokinetic capillary chromatography</i>)</p> <p>CEC (<i>Capillary electrochromatography</i>)</p>	<p>CZE (<i>Capillary zone electrophoresis</i>)</p>	<p>CZE (<i>Capillary zone electrophoresis</i>)</p> <p>cIEF (<i>Capillary isoelectric focusing</i>)</p> <p>cGE (<i>Capillary gel electrophoresis</i>)</p>

Tavanomaista kapillaarielektroforeesia kutsutaan myös nimellä "capillary zone electrophoresis" eli CZE.¹ Taulukosta havaitaan, että CZE esiintyy jokaisessa taulukon kohdassa. Menetelmä on siis kaikista yleisin käytetty. Kuvattaessa kapillaarielektroforeesin laitteistoa ja toimintaa, kuvataan yleensä juuri CZE:tä.

Alhainen resoluutio tuottaa haasteita tavanomaisessa CZE menetelmässä. *Li, X. et al.*¹⁸ raportoivat käyttäneensä uudenlaista menetelmää kapillaarielektroforeesista, jonka avulla saadaan erotettua kiraalisia yhdisteitä paljon korkeammalla resoluutiolla. Tätä uutta menetelmää kutsutaan VG:ksi (*velocity gap*). VG:ssä kaksi peräkkäistä sähkökenttää asetetaan kuljettamaan näytteitä kahden yhdistetyn kapillaarin kautta. Kapillaarien väliin asetetaan sähkömittari. Jokaisen näytteennettonopeudenmuutokset saadaan mitattua, seuraamalla molemmissa kapillaareissa kulkevien näytteiden keskinäisiä nopeuksia. Vertaamalla tavalliseen CZE menetelmään, VG:llä onnistuttiin saavuttamaan parempia resoluutioita enantiomeerisia molekyylipareja analysoitaessa.¹⁸

MECC/MEKC (*Micellar electrokinetic capillary*). Analysoitava näyte voi sisältää neutraaleja molekyyliä, jotka tuovat haasteita kapillaarielektroforeesiin, sillä sähkövirta ei vaikuta neutraaleihin molekyyliin. Lopputuloksena on se, että neutraalit molekyylit siirtyvät kapillaarin toiseen päähän yhtenä "mökkynä". Tämä aiheuttaa paljon haasteita esimerkiksi lääketieteellisissä analyyseissä, sillä monet lääkeaineet esiintyvät neutraaleina molekyyleinä.⁶ MECC (tai MEKC) on johdannainen CE menetelmästä. MECC eroaa CE:stä siinä, että tavanomaisen suoloja sisältävän elektrolyyttiliuoksen sijaan hyödynnetään ionisia misellejä sisältävää liuosta (*ionic micellar solution*). Misellit ovat ioneista koostuvia pyöreitä kappaleita, jotka muodostuvat kapillaariin, kun elektrolyyttiliuokseen lisätään riittävä määrä valittua tensidiä. Misellejä alkaa muodostua, kun lisättyjen tensidien konsentraatio ylittää niin sanotun kriittisen miselli konsentraation eli CMC-ajan (*Critical Micellar Concentration*). Yleisesti käytetty tensidi on natriumlauryylisulfaatti, SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$). Misellien käyttäminen mahdollistaa varattujen molekyylien erottamisen lisäksi neutraalien molekyylien erottamisen.^{3,6}

CEC eli kapillaarielektrokromatografia on hybridi analyysimenetelmä. Se perustuu HPLC:n korkean selektiivisyyden sekä CE menetelmän korkean tehokkuuden yhdistämiseen toisiinsa.^{21,22} Sen toiminta perustuu liikkuvan ja

stationäärifaasin välisiin vuorovaikutuksiin. Menetelmässä liikkuva faasi ajetaan stationäärifaasin lävitse electro-osmoottisen virtauksen (EOF) avulla.¹⁹ Verrattuna HPLC:ssä tavanomaiseen paineella saavutettuun paraboliseen virtaukseen, CEC:ssä EOF:n ansiosta saavutetaan tulppamainen virtausprofiili, joka johtaa parempaan analyysitehokkuuteen. Verrattuna tavanomaiseen kapillaarielektroforeesiin, stationäärifaasilla saavutetaan CEC:ssä parempi näytteiden erottuminen etenkin neutraaleille komponenteille. CEC menetelmällä voidaan erottaa lukuisia molekyyliä kuten PAH-yhdisteitä (polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä), aminohappoja, enantiomeerejä, proteiineja sekä nukleiinihappoja.^{20,21} Menetelmää hyödynnetään esimerkiksi biokemiallisissa- ja lääketieteellisissä analyyseissa.²⁰

On olemassa kaksi yleisintä CEC analyysimenetelmää. Nämä ovat pakattukolonne CEC (*Packed-column CEC*) sekä avoinputkimainen elektrokromatografia (*Open-tubular electrochromatography*, OT-CEC). Näistä kahdesta käytetyin on pakattukolonne CEC,²⁰ joka perustuu kolonnin (sisähalkaisija 50–100 μm) täyttämiseen stationäärifaasipartikkeleilla. OT-CEC perustuu stationäärifaasin kiinnittämiseen kapillaarin sisäseinämiin. On todettu, että stationäärifaasin kiinnittäminen kapillaariin voi johtaa parempaan erotustehokkuuteen verrattuna pakattuun kolonniin.²⁰

cIEF (capillary isoelectric focusing) menetelmää käytetään amfoteeristen yhdisteiden erottamiseen, kuten proteiinien, peptidien, aminohappojen sekä lääkaineita polymeerimatriiseissa.^{2,3,10} cIEF menetelmässä erottuminen ei perustu komponenttien nopeuksien erojen tutkimiseen, vaan niiden isoelektristen pisteiden (*isoelectric point*) välisiin eroihin. Menetelmässä käytetään sarja kahtaisioneja (amfolyyttejä), joiden avulla saadaan aikaiseksi pH gradientti kapillaarin sisällä. Positiivisesti varatut amfolyytit suuntaavat kohti katodia, kun taas negatiivisesti varatut suuntaavat kohti anodia. pH-arvo kasvaa kapillaarin katodipäässä ja laskee anodipäässä. Amfolyytti menettää varauksen saavuttaessa oman isoelektrisen pisteen. Tällöin se ei enää liiku kapillaarissa, ja lopputuloksena saavutetaan stabiili pH gradientti.¹⁰

cIEF:ssä on olennaista minimoida elektro-osmoottisen virtauksen eli EOF:n vaikutus. Mikäli EOF on liian tehokasta, saattaa se kuljettaa kaikki näytteet

detektorin ohitse ennen kuin erottumista on edes vielä tapahtunut. Tästä syystä on olennaista minimoida EOF:n vaikutusta esimerkiksi peittämällä kapillaari polyakryyliamidilla tai metyyliiselluloosalla.^{2,10} EOF voi siis olla cIEF:ssä läsnä, kunhan se ei ylitä näytekomponenttien elektroforeettisten liikkeiden suuruuksia.¹⁰

cGE eli (capillary gel electrophoresis) menetelmä on sovitus tavanomaisesta levygeeli elektroforeesista (*slab gel electrophoresis*). cGE perustuu CZE menetelmään, joka suoritetaan polymeerisessä geeliväliaineessa. cGE:n erottumiskyky perustuu molekyylien kokoon. Väliaine voi koostua esimerkiksi lineaarisista polymeereista kuten polymeeriakryyliamidista, polyetyyliklykolista tai selluloosan johdannaisista. Tämän lisäksi voidaan käyttää ristikkäin sitoutuneita (*crosslinked*) polymeereja tai geelejä kuten polyakryyliamidia tai agar-agaria.¹⁰ Yleisimmin käytetty geeli elektroforeesissa, on polyakryyliamidin polymeeri ($CH_2=CH-CO-NH_2$).³

cGE menetelmässä erottaminen perustuu molekyylien siivilöimiseen. Kapillaarissa käytetty polymeeri tai geeli toimii eräänlaisena suodatinpussina, josta pienet molekyylit pääsevät helpommin sekä nopeammin läpi, verrattuna isompiin molekyyliin. Tästä syystä sitä käytetään paljon esimerkiksi isojen biomolekyylien (makromolekyylien) - kuten proteiinien DNA:n sekä oligonukleotidien erottamiseen. Polymeeriverkko vähentää myös nesteen diffuusionopeutta heikentämällä elektroosmoottisen virtauksen voimakkuutta. Se myös vähentää nesteen mahdollisuutta absorboitua kapillaarin seinämiin.^{3,10}

3. CE JA DNA:N ANALYSOIMINEN

DNA sekvensoinnilla määritetään neljän nukleinihapon (adeniini [A], sytosiini [C], guaniini [G] sekä tymiini [T]) järjestys. Nukleinihappojen järjestys määrittää jokaisen yksilön geneettisen koodin, niin ihmisellä kuin eläimillä. DNA tutkimuksien lisääntymisen myötä, on tullut tarvetta uusille analyyttisille menetelmille. Merkittävänä analyyttisenä menetelmänä niistä on kapillaarielektroforeesi.³

DNA-fragmentteja on tavanomaisesti erotettu levy-geeli elektroforeesilla. Käytetyt geelimatriisit ovat yleensä joko polyakryyliamidia tai agar-agar, ja erottaminen tapahtuu dissosiointiaineiden läsnä ollessa tai ilman niitä. Dissosiointiaineita ovat esimerkiksi urea tai formamidi. Menetelmällä voidaan analysoida useita näytteitä kerralla alhaisilla kustannuksilla. Haittana on se, että analyysi voi kestää useita tunteja.⁷ DNA on merkattava, jotta sen liikettä geelissä voidaan havainnoida. DNA:n merkkäminen interkalaatiolla voi merkitä myrkyllisten aineiden kuten etidiumbromidin tai radioaktiivisten yhdisteiden käyttöä. Tämän lisäksi menetelmässä voi aiheutua inhimillisiä virheitä, sillä geelit luetaan manuaalisesti.²³

DNA-analyysi perustuu isojen biomolekyylien erottamiseen niiden koon perusteella. Yleisimpiä kapillaarielektroforeesin muotoja DNA-analyseissa ovat CZE (*capillary zone electrophoresis*) sekä cGE (*capillary gel electrophoresis*). Perinteisen CZE menetelmän haittana DNA erottamisessa on se, että eripituisten fragmenttien varaus/koko -suhteet ovat lähes identtisiä. Tämä ongelma saadaan korjattua käyttämällä kapillaarissa geeliä tai polymeeriä. Geeli tai polymeeri toimii haavina, jolloin isoimmat fragmentit jäävät geeliin kiinni.²⁴ Kapillaarielektroforeesin ansiosta voidaan erottaa esimerkiksi oligonukleotideja, PCR-fragmentteja tai suorittaa DNA:n sekvensointia.²³ DNA:n havainnoinnissa käytetään joko näkyvää UV-absorptiota tai fluoresenssia. Molempien ansiosta voidaan unohtaa etidiumbromidin sekä radioaktiivisten yhdisteiden käyttö.⁷

3.1. CE ja syöpätutkimus

Syöpä on vakava sairaus, jota sairastavien kuolleisuusluvut ovat suuret. Olemassa olevilla hoitomenetelmillä on rajalliset tehokkuudet, tai diagnoosi syövästä saadaan usein liian myöhään. Tavanomaiset kliiniset diagnoosimenetelmät tarvitsevat toimiakseen, että kasvain kehittyy siihen vaiheeseen, ettei sitä voida enää parantaa. Tavanomaisia kliinisiä diagnoosimenetelmiä ovat esimerkiksi radiologiset menetelmät, kuten tietokonetomografia ja magneettikuvaus. Syövän tehokkaan ja onnistuneen hoidon avain on siis aikainen diagnoosi. Kapillaarielektroforeesin avulla diagnoosia voidaan aikaistaa, koska näytemäärän ei tarvitse olla suuri, jotta mutatoitunut solu voidaan havaita.²³

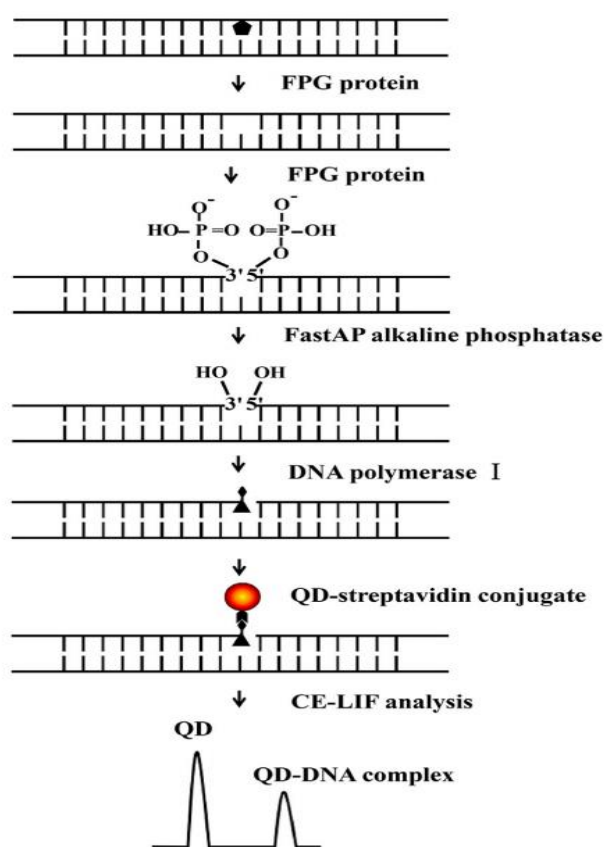
Mutatoituneiden solujen havaitseminen on tärkeää, kun halutaan tietää mutaation etenemisestä ja laadusta, sekä vaadittavista hoitokeinoista. Syöpä on geneettinen sairaus, joka vaatii useita mutaatioita. Jokainen mutaatio aiheuttaa solujen moninkertaistumista, joka johtaa kasvaimen suurenemiseen. Mutaatioita voi olla useita. Genomissa tapahtuvat mutaatiot voivat olla pistemutaatioita, kromosomaalisia poikkeavuuksia kuten siirtymisiä, poistumisia, inversioita tai vahvistumia. CE:n avulla voidaan tutkia esimerkiksi DNA/RNA pistemutaatioita, proteiinien poikkeavuuksia, hapettuneita nukleinihappoja sekä metaboliittien eli aineenvaihduntatuotteiden poikkeavuuksia.^{23,25} Seuraavissa kappaleissa tutustutaan tutkimusmenetelmiin, joissa käytetään kapillaarielektroforeesia tutkittaessa hapettunutta DNA:ta ja pistemutaatioita.

3.1.1. DNA:n hapettumisen tekemät vauriot

Hapettumisen aiheuttamaa DNA-vahinkoa pidetään yhtenä merkittävänä tekijänä syöpään. Tämän lisäksi sen on havaittu olevan osasyynä ikääntymiseen ja ikään liittyviin sairauksiin, kuten Alzheimerin tautiin, Parkinsonin tautiin sekä ALS:sään (amyotrofinen lateraaliskleroosi).⁹

Hapettuneet kohdat DNA:ssa voivat johtua monista eri endogeenisistä (sisäisistä) metabolisista vaiheista, tai sitten eksogeenisistä (ulkoisista) lähteistä kuten ionisoiva säteily, UV-säteily, karsinogeeniset lähteet tai hapettavat lääkeaineet

(engl. "redox-cycling drugs"). *Cuiping Li* ja *Hailing*⁹ artikkelissa käsiteltiin kapillaarielektroforeesin käyttöä tutkittaessa hapettunutta DNA:ta. Kapillaarielektroforeesin ja LIF (*laserindusoitu fluoresenssi*) detektorin avulla voidaan tutkia hapettumisen tekemiä vaurioita mitokondriaalisessa (*mtDNA*) sekä genomisessa DNA:ssa. Hapettuneet DNA-osat tunnistettiin LIF:n avulla, merkkaamalla DNA kvanttipisteellä (*quantum dot, QD*) [Kuva 6]. QD:llä on ainutlaatuisia optisia ominaisuuksia, joiden ansiosta sitä voidaan käyttää etenkin herkkien näytteiden optisessa merkitsemisessä.⁹



Kuva 6. Hapettuneen DNA:n analysoiminen käyttäen QD-DNA kompleksia.⁹ (*julkaistu Elsevierin luvalla*).

Hapettuneiden DNA-ketjujen tutkimiseen käytettiin apuna selektiivistä entsyymistä solun jakautumista (*selective enzymatic cleavage*). Menetelmässä käytettiin pinnoittamatonta kvartsilasikapillaaria, jonka sisähalkaisija oli 50 μm ja ulkohalkaisija 365 μm , ja sen pituus 26 *cm*. Vaurioituneiden DNA-ketjujen

selektiivinen entsyyminen solun jakautuminen saatiin aikaiseksi käyttämällä entsyymejä, glykosylaatteja, jotka kykenevät tunnistamaan ja poistamaan hapettuneita nukleiinihappoja, puriineita (C₅H₄N₄). Tutkimuksessa käytettiin glykosylaattina FPG:tä (*formamidopyrimidine glycosylase*). Kyseistä entsyymiä on käytetty mm. tunnistettaessa hapettumisen tekemiä vaurioita puriineissa, kuten 8-oxoguaaniini tai 8-oxoadeniini. FPG N-glykosylaasina tunnistaa hapettuneet emäkset, ja poistaa ne kaksisäikeisestä DNA:sta, jolloin muodostuu tyhjiä nukleotidirakoja. FPG entsyymi poistaa hapettuneen puriinin siten, että kahden vierekkäisten nukleiinihappojen 3'- ja 5'-fosfaattiryhmät ovat vapaina. Jotta tyhjä nukleotidirako voidaan täyttää DNA-polymeraasireaktiolla, 3'-fosfaattiryhmä on paikattava 3'-hydroksyyliiryhmällä. Alkalisen fosfataasin (FastAP) katalysoimana, voidaan poistaa 3'- ja 5'-fosfaattiryhmät DNA:sta, muodostaakseen 3'- ja 5'-hydroksyyliiryhmät. DNA-polymeraasi I kautta biotiinivitaamiinilla varustettu ddNTP (dideoksinukleotidi) liittyy poistetun puriinin paikalle. Lopuksi käytetään QD:llä varustettua streptomykeeteistä eristettyä kvaternääristä proteiinia (QD-streptavidin), joka sitoutuu voimakkaasti kiinni biotiinivitaamiiniin. Näyte syötettiin kapillaariin elektrokineettisellä injeksiolla, käyttämällä 15 kV jännitettä 5 sekunnin ajan. Erotuksen aikana käytettiin 20 kV jännitettä. CE-LIF analyysillä voidaan lopuksi erottaa QD-streptavidin-biotiini-DNA-kompleksi vapaista QD:sta. Puskuriliuoksena käytettiin TG-puskuria (*tris-glycine*). QD-merkatun DNA:n fluoresenssin intensiteetin on arvioitu olevan suoraan verrannollinen hapettuneiden emästen määrään.⁹

Cuiping Li ja *Hailing*⁹ tutkimalla CE/LIF menetelmällä on alhainen LOD ($1,1 \times 10^{-19} M$ ja $2,9 pM$). Verrattuna HPLC-ECD (*high performance liquid chromatography-electrochemical detection*) menetelmän LOD on alhaisempi, eikä se vaadi aikaa vievää DNA:n pilkkomista analyysiä varten. Menetelmää voidaan käyttää Fenton reaktion tai UV-säteilyn aikaansaamaan DNA:n hapettumisen tutkimiseen. Fenton reaktio tarkoittaa metalli-ionien (rauta(II) ja kupari(II)) reagoimista vetyperoksidin kanssa, muodostaen reaktiivisia hydroksyyliiradikaaleja. Tätä reaktiota kutsutaan Fenton reaktioksi, mikä voi saada aikaan DNA-ketjujen katkeamisia ja hapettumisia.⁹

3.1.2. Pistemutaatiot

Pistemutaatiosta puhutaan, kun DNA:n jokin nukleotidin emäsosa, (adeniini, sytosiini, guaniini tai tymiini vaihtuu joksikin toiseksi emäkseksi. Tämä emäsosan muuttuminen aiheuttaa häiriötä geenin toiminnassa, jonka seurauksena voi syntyä geneettisesti periytyviä sairauksia.^{8,17}

*Kuypers et al.*⁸ tutkivat, voivatko he havaita kapillaarielektroforeesin avulla pistemutaatioita p53 geenistä, joka sijaitsee kromosomi 17 lyhyemmällä ”kädellä”. Kyseisen geenin tunnetaan mutatoituvan *maligneina*, niin sanottuina pahanlaatuisina syöpäsoluina. Tästä syystä kyseistä geeniä voidaan käyttää molekulaarisena ”merkinä” sellaisille syöpäsoluille, jotka eivät ole vielä kehittyneet pahanlaatuisiksi. DNA:ta eristettiin kahdesta kohderyhmästä. Toisessa ryhmässä DNA eristettiin normaaleista veren valkosoluista (leukosyyteistä), joissa tiedettiin olevan p53 geenissä pistemutaatiota. Kaksi muuta näytettä saatiin myeloomaa eli plasmakaryosyyttien sairastavien potilaiden luuydinnäytteistä, joilla tiedettiin myös olevan p53 geenissä pistemutaatiota.⁸

Tutkimuksessa sovellettiin CE:n kanssa yhdistettynä SSCP (*singlestrand conformation polymorphism*) tekniikkaan. SSCP on analyttinen detektointimenetelmä, jonka avulla voidaan havaita nukleotideissa tapahtuvia substituutioita. Pistemutaatiot saavat aikaan konformaation muutoksia yksisäikeisillä DNA-fragmenteilla, joka johtaa fragmenttien liikkumiskyvyn muutokseen polyakryyliamidi geelissä. SSCP on käytännöllinen ja tehokas menetelmä pistemutaatioiden havaitsemiseen.⁸

PCR:n eli polymeerasiketjureaktion avulla monistetut DNA-näytteet saostettiin ja huuhdeltiin 70 %:lla etanolilla, näytteiden suolapitoisuuden alentamiseksi. Näytesakka liuotettiin TBE:hen (Tris-boraattia + EDTA:ta) ja kuumennettiin 90 °C:ksi 3 minuutin ajan. Näyte jäähdytettiin jäävesiastiassa 10 minuuttia, jotta kaksisäikeinen DNA-molekyyli hajoaa yksisäikeiseksi ennen elektrokineettistä injektiota kapillaariin. Kvartsilasikapillaari, jonka koko oli 310 mm ja 750 µm, pinnoitettiin 3-methacryloylpropylmethoxysilaanilla. Lisäpinnoite saatiin aikaiseksi huuhtelemalla kapillaari 5 minuutin ajan 4 %:lla akryyliamidiliuoksella. Akryyliamidiliuos jätettiin kapillaariin polymerisoitumaan yhden tunnin ajaksi,

käyttäen 10 %:sta TEMED:ia (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) ja 10 %:sta APS:aa (*ammonium persulfate*). Kapillaarin sisälle polymeroitunut polyakryyliamidiverkko sisälsi TAE-puskuria (*tris-asetatti-EDTA*). Näyte syötettiin kapillaariin elektrokineettisesti vastakkais-polaarisesti, käyttäen jännitettä 167 V/cm 10–20 sekunnin ajan. Erottaminen suoritettiin kapillaarissa myös vastakkais-polaarisesti jatkuvasyötteisellä virralla (250 V/cm). Kapillaarin lämpötila pidettiin 25 °C:ssa. SSCP analyysi suoritettiin käyttämällä UV-absorptiota detektorina, ja aallonpituutena 260 nm.⁸

Tulokset osoittivat, että CE:n yhdistäminen SSCP-tekniikkaan mahdollistaa kahden yhtä pitkän yksisäikeisen DNA fragmentin erottamisen toisistaan, mikäli ne eroavat vain yhdellä nukleotidilla. Verrattuna perinteiseen levy-geeli elektroforeesiin, SSCP-CE onnistuu pistemutaatioiden detektoimisessa paljon tehokkaammin. Se vaatii vähemmän työtä, sillä yksittäiseen näytteeseen vaadittu aika on paljon lyhyempi; 30 min vs. useampi tunti. Lisäksi SSCP-CE:llä detektoiminen ei sisällä radioaktiivisten yhdisteiden käyttämistä ja kaupallisesti saatavilla olevat laitteet ovat automatisoituja.⁸

4. YHTEENVETO

Kapillaarielektroforeesi eli CE, on hyvin monipuolinen analyttinen erotusmenetelmä, joka on tunnettu sen erotustehokkuudesta, lyhyistä analyysiajoista sekä alhaisista käyttökustannuksista. Menetelmän monipuolisuuden ansiosta, sen käyttö on lisääntynyt monilla eri osa-alueilla, kuten lääketieteessä, vesianalytiikassa sekä elintarviketeollisuudessa. CE menetelmää voidaan käyttää lukuisten eri detektorien kanssa. Yleisimpiä detektoreita ovat absorptioon perustuvat detektorit kuten näkyvä UV-absorptio, sekä fluoresenssiin perustuvat menetelmät, joista yleisin on laserindusoitu fluoresenssi, LIF.

Kapillaarielektroforeesissa on useita erilaisia instrumentaalisia haasteita. Merkittävimpänä haasteena on menetelmän suuri herkkyys. kapillaariin syötettävät näytemäärät on pidettävä erittäin pieninä (0,1–10 nl), ettei analyysin resoluutio kärsi. Lämpötila vaikuttaa myös analyysin onnistumiseen. Kapillaaria on jäähdytettävä onnistuneesti, jotta lämpötila ei pääse kasvamaan liian suureksi kapillaarin sisällä, johtaen virheellisiin tuloksiin tai jopa näytteiden hajoamiseen. Haasteita tuovat myös detektorit ja niiden onnistunut soveltaminen. Esimerkkinä tästä on näkyvässä UV-absorptiossa lyhyen mittausmatkan optimoiminen.

Kapillaarielektroforeesia käytetään nykyään rutiinomaisessa DNA-analytiikassa. Sen avulla voidaan toteuttaa DNA:n sekvensointia, ja näin toteuttaa geenitutkimuksia. Syöpätutkimus on osa-alue, joka vaatii lisää tutkimusta ja uusia tehokkaampia analyttisiä menetelmiä. CE menetelmä takaa nopeamman ja tehokkaamman diagnostiikan syöpätutkimuksissa, verrattuna radiologisiin menetelmiin. CE menetelmän nopeuden, tarkkuuden sekä alhaisten näytemäärien ansiosta, se voisi korvata tavanomaisen levy-geeli elektroforeesin, jolloin säästettäisiin aikaa, rahaa ja saataisiin mahdollisesti jopa parempia analyysituloksia.

Kapillaarielektroforeesin tulevaisuus vaikuttaa erittäin lupaavalta. Menetelmä on edelleen varsin uusi, sen tehokkuutta ja instrumentiikkaa tutkitaan ja kehitetään edelleen, joten tieteellisten julkaisujen määrä on kovassa nousussa. CE menetelmän monipuolisuuden, käyttötehokkuuden, yksinkertaisuuden sekä

soveltuvuuden ansiosta voi olettaa, että siitä tulee vielä yksi maailman merkittävimmistä analyysimenetelmistä.

5. KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Gordon MJ, Huang X, Pentoney SL, Zare RN., Capillary electrophoresis, *Science*, 1988, 242(4876), 224-228.
2. Weston A, Brown PR., *High performance liquid chromatography & capillary electrophoresis : Principles and practices*, San Diego, Academic Press, 1997
3. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR., *Principles of instrumental analysis* 7th edition, 2018.
4. Lindeberg J., Capillary electrophoresis in food analysis, *Food Chem*, 1995, 55(1), 73-94.
5. Altria KD., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*, 1999, 856(1), 443-463.
6. Hancu G., Simon B., Rusu A., Mircia E., Gyéresi Á., Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2013, 3(1), 1.
7. Smith A., Nelson RJ., Capillary electrophoresis of DNA, *Curr Protoc Mol Biol*, 2004, Chapter 2.
8. Kuypers, A. W. H. M., Willems PMW., van der Schans, M. J., et al., Detection of point mutations in DNA using capillary electrophoresis in a polymer network, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1993, 621(2), 149-156
9. Li C., Wang H., Selective enzymatic cleavage and labeling for sensitive capillary electrophoresis laser-induced fluorescence analysis of oxidized DNA bases, *J Chromatogr A*, 2015, 1406, 324-330
10. Xu Y., Tutorial: Capillary electrophoresis, *The chemical educator*, 1996, 1(2), 1-14.
11. Swinney K., Bornhop DJ., Detection in capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 2000, 21(7), 1239-1250.
12. Monnig CA., Kennedy RT., Capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 1994, 66(12), 280R.
13. Beale SC., Capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 1998, 70(12), 279-300.
14. Selamnia M., Mayeur C., Robert V., Blachier F., A-difluoromethylornithine (DFMO) as a potent arginase activity inhibitor in human colon carcinoma cells, *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(8), 1241-1245.

15. Nowak PM., Śpiewak K., Woźniakiewicz M., Kościelniak P., Minimizing the impact of joule heating as a prerequisite for the reliable analysis of metal-protein complexes by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 2017, 1495, 83-87.
16. Rathore AS., Joule heating and determination of temperature in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography columns, *J Chromatogr A*, 2004, 1037(1-2), 431-443.
17. Gelfi C., Cremonesi L., Ferrari M., Righetti PG., Temperature-programmed capillary electrophoresis for detection of DNA point mutations, *BioTechniques*, 1996, 21(5), 926-932.
18. Harstad RK., Johnson AC., Weisenberger MM., Bowser MT., Capillary electrophoresis, *Anal Chem (Washington, DC, U S)*, 2016, 88(1), 299-319.
19. Cikaló MG., Bartle KD., Robson MM., Myers P., Euerby MR., Capillary electrochromatography, tutorial review, *Analyst*, 1998, 123(7), 87R-102R.
20. Eeltink S., Rozing GP., Kok WT., Recent applications in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 2003, 24(22-23), 3935-3961.
21. Zhang K., Gao R., Capillary electrochromatography, *Analytical Separation Science*, 2015, 653-675.
22. Bartle KD., Myers P., Theory of capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 2001, 916(1-2), 3-23.
23. Yang Z., Sweedler JV., Application of capillary electrophoresis for the early diagnosis of cancer, *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(17), 4013-4031.
24. Durney BC., Crihfield CL., Holland LA., Capillary electrophoresis applied to DNA: Determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009-2014), *Anal Bioanal Chem*, 2017, 407(23), 6923-6938.
25. Le H., Fung D., Trent RJ., Applications of capillary electrophoresis in DNA mutation analysis of genetic disorders, *J CLIN PATHOL MOL PATHOL*, 1997, 50(5), 261-265.

