

Antitest-antigén kölcsönhatások vizsgálata optikai módszerekkel

CRP immobilizálás glutáraldehiddel és PEI-vel kezelt felületeken

Juhász Krisztina, Biofizikus MSc
Orgován Norbert, Biofizikus MSc

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar

Témavezetők:

Dr. Horváth Róbert
Dr. Kurunczi Sándor MTA TTK Műszaki Fizikai és
Anyagtudományi Intézet

Tudományos Diákköri Dolgozat
Budapest, 2012.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Antitest antigén kölcsönhatás	5
2.1. Immunrendszer	5
2.1.1. Az immunoglobulinok	5
2.1.2. Az ellenanyag szerkezete	6
2.2. Az antigén-antitest kapcsolódása	7
2.3. Az általam használt antigén - C-reaktív fehérje	8
3. OWLS	9
3.1. A módszer fizikája - hullámvezető módusok	9
3.1.1. A hullámvezető módusok négy réteg esetén	12
3.1.2. Anizotróp réteg kezelése	13
3.1.3. A kitapadt tömeg becslése	15
3.2. A mérőműszer felépítése és működése	16
4. Mérések menete	18
4.1. A mérésekhez használt felületkémia kiválasztása	18
4.2. Előkészítési munkálatok	19
4.3. Glutáraldehydes immobilizáció	20
4.4. Immobilizáció PEI réteggel	21
4.5. A mérés menete	22
5. Eredmények	24
5.1. Glutáraldehydes immobilizáció	24
5.2. Immobilizáció PEI réteggel	27
5.3. Marhaszérum oldatok vizsgáltai	31

6. Konklúzió	34
Köszönetnyilvánítás	36
Irodalomjegyzék	37

1. fejezet

Bevezetés

A P3SENS Európai Unió multidiszciplináris együttműködés célja egy olyan többcsatornás polimer alapú fotonikus kristály bioszenzor tervezése, és gyártása, mely oldatokban rendkívül kis koncentrációban ($< 1 \text{ ng/ml}$) jelenlévő molekulák koncentrációváltozásának jelölésmentes monitorozására alkalmas, emellett olcsó és hordozható. Egy ilyen bioszenzor lehetővé tenné különböző betegségmarkerek kimutatását kis mennyiségű vérből. A többcsatorna több szempontból is előnyös lehet, egyik előnye az egy betegségre jellemző különböző markerek kimutatása, másik a több különböző betegség szimultán felismerése. A projekt fő célja agyi betegségek korai felismerése, olyan egyszerű szűrővizsgálat kifejlesztése, mely nem igényel speciális infrastruktúrát.

Az általunk használt OWLS technika jelölésmentes, valós idejű, molekuláris interakciók detektálásra alkalmas módszer. A chip a vékony filmréteg technikát alkalmazva, egy hordozóból és a rajta kialakított vékony ($\sim 170 \text{ nm}$), nagy törésmutatójú filmrétegből áll, mely optikai hullámvezetőként működik. A fény ebben a hullámvezető rétegben csak meghatározott módusokban terjedhet, a módusok érzékenyek a felületi viszonyokra. A határfelületek törésmutató viszonyainak megváltozásából következtethetünk a chip felületére adszorbeálódott tömegre.

A projekten belül feladatunk a CRP antigének kimutatása az őket érzékelő antitestek minél jobb immobilizálása által. Az általunk használt OWLS filmrétegre megfelelő kémiai előkészítés után rögzítjük a CRP antitesteket, amelynek felületkémiaja meg egyezik a kifejlesztés alatt álló fotonikus kristály bioszenzor felszínével. A receptor (antitest) immobilizálás első lépéseként különböző felületkémiaát alkalmazva megvizsgáljuk a módosított felületek és az antitestek kölcsönhatását, majd az antigének kötődését az antitestekhez. A klasszikus glutáraldehydes technikát összehasonlítottuk

a polietilén-iminnel (PEI-vel) aktivált felületekkel. Választásunk azért esett a PEI-s előkészítésre, mert viszonylag egyszerű módszer és a PEI nagy sűrűségben tartalmaz szabad amino-csoportokat, amely előnyösnek tűnik más, hagyományos kémiai protokollokhoz viszonyítva, de ezt kísérletileg még senki nem vizsgálta korábban. A glutár-aldehides kezelést hagyományosan amino-szilanizált felületen alkalmazzák, amelynek során magas hőmérsékleten történő beégetést alkalmaznak; a szililezés paraméterei esetenként megakadályozzák az alkalmazását.

Valódi diagnosztikai eszköz készítéséhez nem elég az antitest-antigén kölcsönhatásokkal foglalkoznunk, mivel a vizsgálandó molekuláink komplex oldatban, pl. vérben (szérumban, vérplazmában, stb.) találhatók, ezért vizsgálatainkban marhaszérumos modell kísérletek is szerepeltek.

2. fejezet

Antitest antigén kölcsönhatás

2.1. Immunrendszer

Az immunrendszer alapfunkciója, hogy különbséget tud tenni a saját és nem saját struktúrák között, és azokra eltérő módon reagál. Az immunrendszer felismerő, információkat továbbító és effektor (végrehajtó, pusztító) funkciókat ellátó rendszer.

Antigénnek nevezik azokat a struktúrákat, melyeket a funkcionálisan érett adaptív immunrendszer felismer. A sajátként felismert struktúrákra az immunrendszer toleranciával válaszol, a nem-sajátként felismert struktúrák immunválaszt váltanak ki, ami az azt előidéző antigén semlegesítéséhez, fajlagos elpusztításához vezet. A környezetből a szervezetbe kerülő struktúrák jelentős része fertőzést okozó patogén. Valamennyi patogén egyben antigén is.

A patogének azért nem képesek minden esetben érvényesíteni a kórokozó hatásukat, mert a természetes immunrendszer sejtjei már néhány perccel a fertőzés után aktiválódnak. Ha ezt a védelmi vonalat áttörik, akkor adaptív immunválaszt váltanak ki. Tehát minden patogén antigén, mert immunválaszt vált ki, de nem minden antigén patogén. [2]

2.1.1. Az immunoglobulinok

Az immunglobulinok olyan glikoproteinek az immunglobulin szupercsaládban, amelyek ellenanyagként funkcionálnak. Az ellenanyag és immunglobulin elnevezéseket gyakran egymás helyettesítésére használják. Előfordulnak a vérben és a szöveti folyadéokban, csakúgy mint számos váladékban. Szerkezetüket tekintve globulinok. Az ellenanyagokat az immunrendszer B-sejtjeiből származó plazmasejtek termelik és vá-

lasztják ki. A folyamat során a B-sejtek a nekik megfelelő antigént megkötik, aktiválódnak és plazmasejtté, vagy memóriasejtté differenciálódnak. Az aktiválódáshoz rendszerint a T-sejtek támogatása is szükséges.

2.1.2. Az ellenanyag szerkezete

Az immunglobulinok nagy molekulaméretű plazmafehérjék, melyekhez gyakran cukorláncok kapcsolódnak az N-terminális részén.

Az ellenanyagok alapváza egy monomer, de az ellenanyag lehetnek monomer, dimer, trimer, tetramer, pentamer stb. A monomer egy „Y”-alakú molekula, amely két egyforma nehézláncból és két egyforma könnyű láncból áll. Az egyes láncokat egymással diszulfid-híd köti össze. A nehézláncok 450-550 aminosavból állnak. A nehézláncoknak egy konstans régiója van, amelyik azonos az adott osztályba tartozó immunglobulinok esetén, és egy variábilis régiója, amely eltérő az egyes B-sejtek immunglobulinja esetén, de azonos az adott B-sejt által termelt immunglobulinok vonatkozásában. A különböző régiók doménekből állnak melyek hossza kb. 110 aminosav. Minden könnyűlánc két doménből áll, egy konstans és egy variábilis domén alkotja. A könnyűláncok hozzávetőlegesen 211-217 aminosavból állnak.

Az „Y”-alakú monomer két nehéz- és két könnyű láncból áll. Ez összesen hatnyolc konstans domént és négy variábilis domént jelent. Az „Y” ágainak végeit Fab fragmensnek hívják, ami a nehéz- és a könnyű-lánc egy-egy variábilis és konstans doménjéből áll és együttesen alkotja az antigén kötő helyet a monomer N-terminális végén. A két variábilis domén a nekik megfelelő antigént köti.

A szervezetben található immunglobulinok az antigének rendkívül széles körét tudják megkötni, ezt a diverzitás a szomatikus rekombináció hozza létre.

Az Fc fragmens, ami az „Y” alapját adja, két nehézláncból áll, és két, ill. három doménből áll (attól függően, hogy milyen izotípusról van szó). Az Fc rész a különböző sejtek receptoraihoz és a komplement proteinekhez kapcsolódik. A kapcsolódás következtében az ellenanyag különböző hatásokat vált ki, mint például opszonizáció, sejtlyzisz, degranuláció és egyéb folyamatokat.

Az IgG molekula szerkezete

Az IgG egy olyan monomer immunglobulin, amely két nehéz- és két könnyű-láncból áll. Minden molekula két antigént képes megkötni. Ez a legnagyobb mennyiségben előforduló immunglobulin, amely mintegy felerészben a vérben, illetve a szövetek közti

folyadékban található. Az immunglobulinok közül csak ez az izotípus képes a magzatba jutni.

Az IgG számos patogénhez kapcsolódik, így vírusokat, baktériumokat és gombákat köt, és velük szemben megvédi a szervezetet egyrészt a komplement rendszer aktiválásával (klasszikus út), másrészt a kórokozók opszonizációját (fagocitózis) és toxinjaik semlegesítését okozza.

2.2. Az antigén-antitest kapcsolódása

Az antigén és ellenanyag kapcsolódásának feltétele, hogy megfelelő közelségbe (0,1-0,2 nm) kerüljenek egymással és kialakulhassanak az immunkomplexet összetartó nem kovalens kölcsönhatások. Ilyenek a Coulomb-erők, H-kötések és van der Waals-erők. Az antigén-antitest kapcsolódás legegyszerűbb formája, amikor univalens ligandum (haptén) reverzibilisen kapcsolódik az Ig antigénkötő helyéhez.

Az antigénkötő hely és a monovalens ligandum kapcsolódása reverzibilis, a kölcsönhatás során az antigén koncentrációjától és a kapcsolódás erősségétől függő dinamikus egyensúlyi állapot alakul ki. A kapcsolódás erősségének mértéke az ellenanyag affinitása, amelyet azzal az antigén-koncentrációval jellemezhetünk, mely a rendszerben lévő antigénkötő helyek felének telítéséhez szükséges. Az antigénnek ez a mólból kifejezett koncentrációja a disszociációs konstans (K_d). A kisebb K_d -érték nagyobb affinitást jelent. A K_d -érték az antigénre specifikus ellenanyagok esetében $10^{-7} - 10^{-11}$ M/l között változhat.

Az antigének általában multivalensek, azaz több szerkezetileg különböző epitóppal rendelkeznek. Az antigén és ellenanyag-molekula kölcsönhatása mindenekelőtt az antigénkötőhely és a megfelelő epitóp kapcsolódásán alapul. Az univalens haptén is kapcsolódik az antitesthez, ez a kölcsönhatás azonban általában nem befolyásolja az ellenanyag fizikai állapotát. Bivalens ellenanyag és bivalens antigén esetén már képződhetnek az oldatból kiváló komplexek, hosszú láncok vagy gyűrűs szerkezetek. Multivalens antigén az ellenanyag-molekulákkal általában az oldatból kiváló komplexek képződését eredményezi. [2]

Az elsődleges antigén-ellenanyag kapcsolódáson alapuló eljárások affinitás alapú elválasztási módszerek. Az eljárás során az egyik komponenst szilárd hordozóhoz kapcsoljuk, a másik komponenst oldatban alkalmazzuk. A kölcsönhatás eredményeként a hordozóhoz kötött komponenshez kapcsolódó ligandum az elegy többi összetevőjétől

elválasztható.

A legtöbb analitikai eljárás során a az ellenanyaghoz vagy az antigénhez kovalensen valamilyen jelző molekulát kapcsolnak, aminek segítségével az oldatból a szilárd fázishoz kötődő komponens jelenléte kimutatható. A jelző reagens típusától (radioaktív izotóp, enzim, fluorogén, luminogén anyag) függően a következő módszereket használják: radio-immunassay(RIA), enzime-linked immunoassay (ELISA), fluoreszcens immunesszé. [1] A későbbiekben ismertetem az általunk használt módszert, melynek nagy előnye, hogy jelölésmentes technika.

2.3. Az általam használt antigén - C-reaktív fehérje

A CRP a pentraxinok családjába tartozik. A C-terminálison található a pentraxinokra jellemző 200 aminosavból álló domén, melynek jellegzetes építőköve a 8 aminosavból álló konzervatív pentraxin szakasz. A pentraxinok akut fázis fehérjék, gyulladást, traumát vagy fertőzést követően szérumszintjük többszörösére emelkedik. Két nagy családot különböztetünk meg: a hosszú és a rövid pentraxinokat. Az előbbiek jellegzetessége az aminoterminális doménen található 174 aminosav hosszúságú szakasz. Utóbbiak 5 vagy 10 azonos alegységből felépülő sugaras, pentamer fehérjék.

A CRP 5 azonos 23 kDa tömegű alegységből épül fel. Az alegységek nemkovalens kötésekkel egy központi pórus körül szimmetrikusan kapcsolódnak össze. Az alegységek két kalciumion jelenlétében ligand megkötésére képesek. Ligandjai a kromatin, a hisztonok, kis ribonukleoproteinek, glikánok és foszfolipidek. A C1q globuláris doménjén keresztül képes a ligandasszociált vagy aggregálódott CRP-t megkötni és ez által a klasszikus komplement kaszkádot aktiválni.

A CRP szintéziséért döntően a májsejtek felelősek, bár lokálisan, kisebb mértékben limfociták, monociták, simaizomsejtek, endotélsejtek és makrofágok is termelhetik. [3]

3. fejezet

OWLS

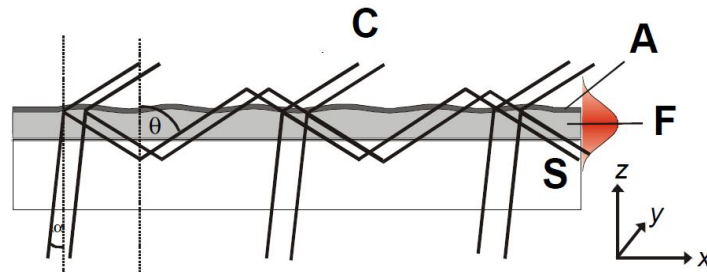
3.1. A módszer fizikája - hullámvezető módusok

Két dielektrikum határfelületére θ_F szögben beeső koherens fénysugár megtörik, és a Snellius-Descartes törvénynek megfelelően $\theta_{C,S}$ szögben halad tovább. Az egyes fizikai mennyiségek indexei a 3.1 ábrán jelölt közegekre utalnak.

Ha csupán 3 rétegre egyszerűsítjük a modellt (elhagyjuk az adlayer-t), akkor:

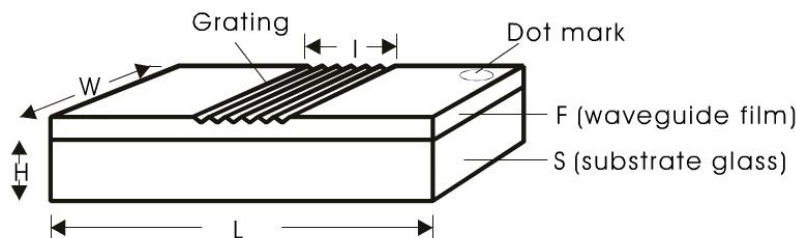
$$n_F \sin \theta_F = n_{C,S} \sin \theta_{C,S}. \quad (3.1)$$

Ha $n_F > n_{C,S}$, akkor teljes visszaverődés történik az adott határfelületen. Ha a filmréteg egy vékony, nagy törésmutatójú dielektrikum, akkor benne a teljes visszaverődések sorozatából irányított fényterjedés, hullámvezetés jöhet létre. Ilyenkor a



3.1. ábra. A négyrétegű hullámvezető sugároptikai szemléltetése. A legalsó S réteg, a hordozó közeg, melyen az F filmréteg található. Felette található az A(dlayer), adszorbeálódott anyag. A legfelső C-vel jelölt réteg az angol cover (fedő) szóból származik, magyarul fedőréteg.[6]

fény a hullámvezetőben terjed, de közben minden egyes visszaverődéskor behatol a hullámvezetővel érintkező közegbe, az evanescens hullámmal.



3.2. ábra. A chip felépítése, az optikai ráccsal.[13]

A hullámvezető chipek esetén ezeket a fizikai jelenségeket használjuk. Az optikai chip egy üveghordozóra felvitt kb. 170 nm vastag nagy törésmutatójú dielektrikum, filmréteg, melyben a fény diszkrét módusokban terjed. A film felületén található egy optikai rács (3.2 ábra), ami által diffraktált fény indul el a hullámvezetőben, és a sorozatos visszaverődésekkor önmagával interferál. Csak abban az esetben történik hullámvezetés, amikor a becsatolt fény önmagával fázisban van, azaz egy „cikk-cakk” során $2\pi m$ ($m=0,1,\dots$) fázistolást szenved.

Ha a módusokat a Maxwell-egyenletekből vezetjük le, akkor homogén dielektrikumra kell felírni az egyenleteket. Ha áram- és töltésmentességet tételezünk fel, akkor két független csoportra bonthatóak az egyenletek: transzverz elektromos (TE) esetben a TE hullámok elektromos térerősség vektora párhuzamos a felülettel ($E = E_y$), transzverz mágneses esetben (TM) a TM hullámok mágneses térerősségvektora párhuzamos a felülettel ($H = H_y$).

A Maxwell-egyenletek megoldásaként monokromatikus síkhullámot feltételezve megkaphatjuk a vezetett módusok téreloszlását.

TE módusra:

$$E_{y,F}(z) = Ae^{-ik_{z,F}z} + Be^{-ik_{z,F}z}, \text{ ha } -d_F/2 \leq z \leq d_F/2 \quad (3.2)$$

$$E_{y,C}(z) = Ce^{-|k_{z,C}|(z-d_F/2)}, \text{ ha } z \geq d_F/2 \quad (3.3)$$

$$E_{y,C}(z) = De^{|k_{z,C}|(z+d_F/2)}, \text{ ha } z \leq -d_F/2 \quad (3.4)$$

Ez a megoldása a hullámfüggvénynek a hullámvezető filmen kívül exponenciálisan lecsengő teret tételez fel. A határfeltételek szerint az elektromos és a mágneses térerősségek tangenciális komponense a határfelületeken folytonosan megy át, ezt kihasználva azt kapjuk, hogy a z irányú terjedési állandó (β) minden térrészen megegyezik.

$$k_{z,J}^2 + \beta^2 = k^2 n_J^2 \quad J = S, F, C \quad (3.5)$$

Ezek felhasználásával a hullámvezető módus jellemzésére bevezetjük az effektív törésmutatót (N), mely a hullámvezetőtől és az evaneszcens tér által érzékelt törésmutatótól függ. A effektív törésmutató határozza meg a hullámszámvektor z komponensének nagyságát.

$$N = \frac{\beta}{k} \quad (3.6)$$

A határfeltételek felhasználásával megoldhatjuk a fenti egyenletrendszert, mely eredménye a háromrétegű síkhullámvezető egyenlete.

$$d_f k \sqrt{n_F^2 - N^2} - \arctan \frac{n_F^{2\rho} \sqrt{N^2 - n_C^2}}{n_C \sqrt{n_F^2 - N^2}} - \arctan \frac{n_F^{2\rho} \sqrt{N^2 - n_S^2}}{n_S \sqrt{n_F^2 - N^2}} = \pi m, \quad (3.7)$$

ahol a módusszám: $m=0,1,2,\dots$ és $\rho = 0$ TE módus esetén, $\rho = 1$ TM módus esetén.

Sugároptikával is a fenti megoldáshoz juthatunk, ha a filmrétegen belül két síkhullám szuperpozícióját feltételezzük, melyek θ szögben ferdén felfelé, illetve lefelé haladnak. Két síkhullám közti fázistolás a határfelületeken történő teljes visszaverődéskor és a terjedésből adódó fázisváltozás során jöhet létre. A visszaverődés miatti fázisváltozás tárgyalható úgy is, mintha a fénysugár behatolna a szubsztrátba illetve a fedőrétegbe (az evaneszcens tér mintájára), majd onnan visszafordulva ismét a hullámvezetőben terjedne. Ebben az esetben a fázistolás visszavezethető az optikai úthossz változására.

A hullámszám vektorok a filmen belül:

$$k_{F,fe} = (k_{F,f}, 0, \beta) \text{ és } k_{F,le} = (-k_{x,F}, 0, \beta) \quad (3.8)$$

A hullámvezetéshez nem elegendő a teljes visszaverődés, a fénynek két teljes visszaverődés után fázisban kell maradnia önmagával (konstruktív interferencia). Ez a következő feltétel teljesülése esetén igaz:

$$2d_F k \sqrt{n_F^2 - N^2} + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,C} = 2\pi m. \quad (3.9)$$

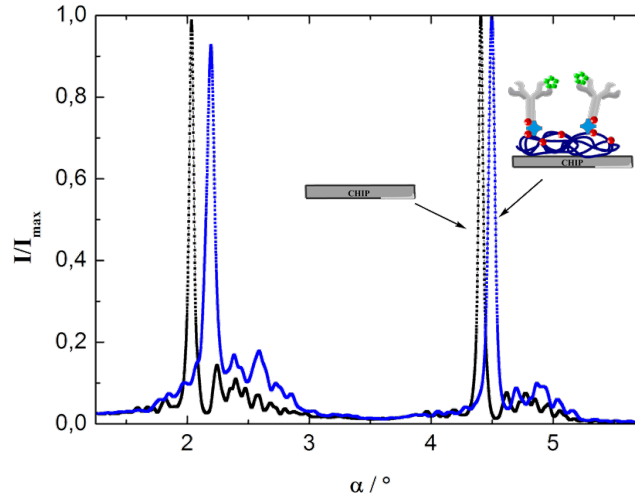
A 3.9 egyenletben Φ az egyes határfelületeken történő fázisugrást jelenti [6], amit megkaphatunk a Fresnel-féle reflexiók együtthatóiból:

$$\Phi_{F,J} = 2 \arctan \left(\frac{n_F}{n_J} \right)^{2\rho} \frac{k_{z,J}}{k_{z,F}} \text{ ahol } J = S, C \text{ és } \rho = \begin{cases} 0 & \text{ha TE} \\ 1 & \text{ha TM} \end{cases} \quad (3.10)$$

A fenti két egyenletet (3.9,3.10) összevonva megkaphatjuk a korábban már bemutatott három réteges síkhullámvezető egyenletét.

3.1.1. A hullámvezető módusok négy réteg esetén

A becsatolási szöget a chip széleinél található fotodiódák segítségével mérjük. A megvilágítási szög - fényintenzitás függvényben éles maximumok jelzik a becsatolási szögeket mindkét irányban, ezen maximumok eltolódása jelzi a felületre tapadt molekulákat.



3.3. ábra. A különböző módusok becsatolási szögei (fekete vonal) és eltolódása (kék vonal). Bal oldalon TE módus, jobb oldalon TM módus.

A becsatolás feltétele abban az esetben, ha optikai ráccsal történik a becsatolás:

$$N = n_0 \sin \alpha + \frac{l\lambda}{\Lambda}, \quad (3.11)$$

melyben λ a megvilágító lézer hullámhossza vákuumban, n_0 jelöli a levegő törésmutatóját, l a diffrakció rendjét, Λ pedig a rácsállandót.

A módusok effektív törésmutatóihoz (N_{TE} és N_{TM}) a becsatolási szögek mérésével, és azok behelyettesítésével a 3.11 egyenletbe juthatunk el. Ha egy folyadékfázisból történő adszorpciós folyamatot elemzünk, akkor a négyrétegű síkhullámvezető elméletet kell használnunk. A 3.9 egyenlet vékony ($d_A \ll \lambda$) adszorbeálódott réteg esetén, azt feltételezve, hogy a törésmutató csak z irányban változik, a Fresnel-féle reflexiókoefficiensek felhasználásával a következő alakra hozható:

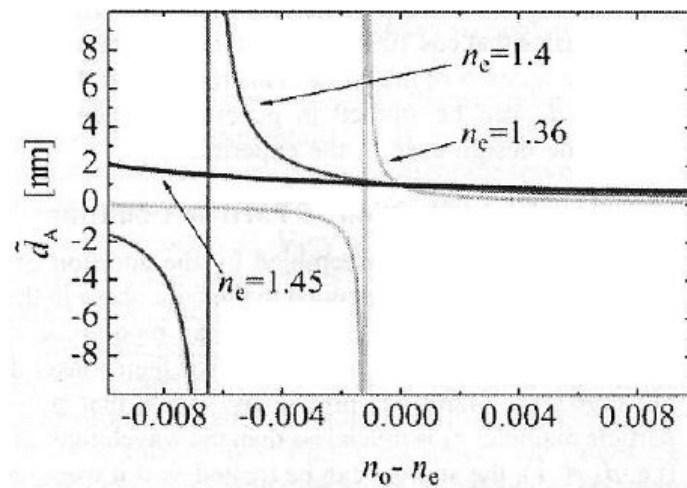
$$\begin{aligned} \pi m = & k\sqrt{n_F^2 - N^2} \left(d_F + \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \left[\frac{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_A}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1} \right]^\rho d_A \right) \\ & - \arctan \left[\left(\frac{n_F}{n_C}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{N^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}} \right] - \arctan \left[\left(\frac{n_F}{n_S}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{N^2 - n_S^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}} \right]. \quad (3.12) \end{aligned}$$

A 3.12 egyenletben szereplő n_F , n_C , n_S törésmutatók és a hullámvezető d_F vastagsága ismert, mérhető mennyiségek, n_A és d_A pedig a hullámvezetőre adszorbeálódott réteg törésmutatója illetve vastagsága, amikre kíváncsiak vagyunk. A transzverz elektromos módusra $\rho = 0$, a transzverz mágneses módusra $\rho = 1$ értéket kell használni. Ha a két különböző módusra megmérjük az N effektív törésmutatót, akkor az így kapott két egyenletből n_A és d_A kiszámítható.[5]

3.1.2. Anizotróp réteg kezelése

Anizotróp közeget nem lehet egyetlen törésmutatóval helyesen jellemezni. Egytenegyű kettőstörő közegek esetén szükség van ordinárius (n_o) és extraordinárius (n_e) törésmutató bevezetésére a korábban használt adlayer törésmutató helyett (n_a). Azonban ezt nem használhatjuk fel közvetlenül a modellalkotásban, hiszen a mérések csak két független értéket szolgáltatnak, amelyek nem elegendőek a három független optogeometria jellemző (n_o , n_e , d_a) meghatározására. Megoldást jelenthet viszont, hogy ha az izotróp modellt alkalmazzuk a mérési eredmények kiértékelésére, és azt vizsgáljuk, hogy milyen eltérést okozhat az, ha anizotróp réteget kezelünk izotrópként.

Belátható, hogy a felületi tömegsűrűségre gyakorolt hatása az anizotrópia jelenlétének elhanyagolható. Ez azt jelenti, hogy az izotróp modellel kapott M értékek akkor is helyesnek tekinthetők, ha a kitapadt réteget egytengelyű kettőstörés jellemzi. Ez azonban nem állapítható meg sem a törésmutató (n_a), sem a vastagság (d_a) értékekről, mert azok torzulnak a helytelen modell alkalmazása miatt. Ezt a torzulást pedig felhasználhatjuk arra, hogy a réteg kettőstörését jellemezzük. Az adlayer törésmutatójára kapott érték elemzéséből megállapítható, hogy a kettőstörés negatív vagy pozitív. Abban az esetben, ha a kapott érték a helyesnek vélt valós értéknél nagyobb, a kitapadt réteg negatív kettőstörő, ami utalhat arra például, hogy a felületen réteges rendeződés alakult ki két eltérő törésmutatójú anyag rétegződéséből. A törésmutató alulbecslése ezzel szemben pozitív kettőstörést jelent, ami oszlopos rétegződés kialakulására utalhat.[10]



3.4. ábra. Izotróp modell alkalmazásával kapott vastagság értékek 1 nm-es anizotróp rétegre

Az adlayer vastagságának alakulása bonyolultabb a törésmutatóéhoz képest. Adott vastagságú, különböző mértékű kettőstörő réteget feltételezve, és alkalmazva rá az izotróp modellt, a kapott vastagság értékekben egy ponton szingularitás jelenik meg (??). A szingularitás helyét befolyásolja, a puffer törésmutatója és az ordinárius és extraordinárius törésmutatók nagysága. Ez azt jelenti, hogy ha a réteg kettőstörése a szinguláris pontnak a környékén van, akkor a számolt vastagságértékek nagymértékben szórni fognak, és akár előjelet is válthatnak.[16]

3.1.3. A kitapadt tömeg becslése

Homogén adszorbeálódott anyagot és konstans vastagságot feltételezve a mért effektív törésmutató segítségével a módusegyenletekből meghatározható az adlayer vastagsága és törésmutatója. Ezen paraméterek segítségével megbecsülhető a felületre adszorbeálódott tömeg(M).

Az egységnyi felületre kitapadt tömeg (M) megadható a következő formában:

$$M = \int_0^{\infty} (c_C(z) - c_{oldat}) dz. \quad (3.13)$$

A

$$c_C = \begin{cases} c_A & \text{ha } z \leq d_A \\ 0 & \text{ha } z > d_A \end{cases} \quad (3.14)$$

közelítés használva

$$M = (c_A - c_{oldat}) \cdot d_A. \quad (3.15)$$

A fenti egyenletekben c_{oldat} az oldat koncentrációja, z a filmrétegtől vett távolság, c_A átlagos koncentráció és d_A átlagos vastagság.

Feltételezve, hogy $c_A \gg c_{oldat}$ azt kapjuk, hogy

$$M = c_A d_A. \quad (3.16)$$

Ekkor a kitapadt réteg törésmutatója az alábbi képlettel definiálható:

$$n_A = n_C + c_A \frac{dn}{dc}, \quad (3.17)$$

ahol n_C a puffertörésmutatója, melyben a molekulákat feloldottuk.[7]

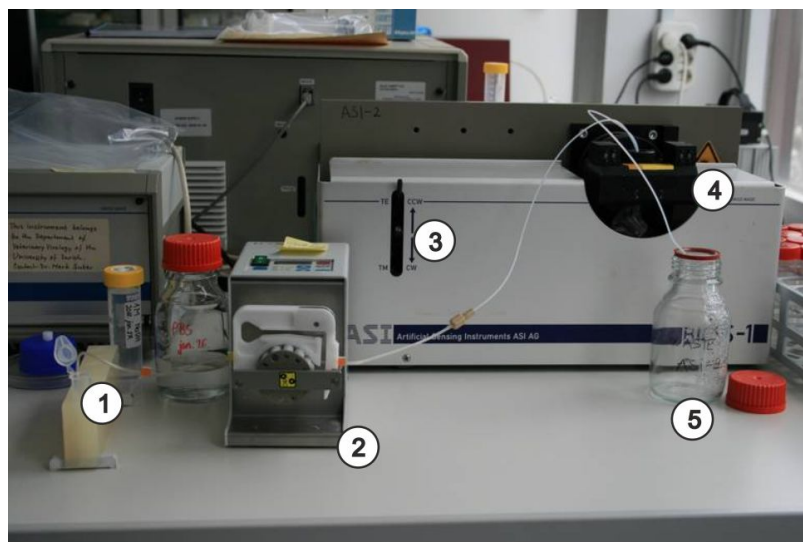
A dn/dc arány a molekulák polarizálhatóságától függ, melynek kváziuniverzális értéke $0.182 \text{ cm}^3/g$ a legtöbb fehérjére. Ha a 3.17 képletből kifejezzük c_A -t, és behelyettesítjük a 3.16 egyenletbe, akkor az egységnyi felületre kitapadt tömeg így írható fel:

$$M = d_A \frac{n_A - n_C}{dn/dc} \quad (3.18)$$

A mérések elemzésekor a 3.18 egyenletet használja a kiértékelő program.

3.2. A mérőműszer felépítése és működése

Méréseinkhez az ASI BIOS-1 berendezést használtuk, melynek felépítését a 3.5 ábrán láthatjuk.



3.5. ábra. A mérőberendezés - ASI BIOS-1. – 1. Áramoltatott oldat, 2. perisztaltikus pumpa, 3. polarizátor, 4. küvetatartó, 5. a cellából távozó folyadék [13]

A műszer lézerrel működik, mely a chipen elhelyezett optikai rács segítségével becsatolódhat a hullámvezető filmrétegbe. A becsatolási szögek megtalálása egy goniométerrel és a chip két végén elhelyezett fotodiódával történik. A stabil lézernyalábhoz képest a goniométer elfordítja a chipet az óra járásával megegyező és azzal ellentétes irányba, miközben a fotodiódák detektálják a fényintenzitását, és a számítógép rögzíti az adatokat a forgatási szög függvényében.

A működéséhez szükséges küvetán két nyílás található, egyik a feltöltésre szolgál (bemenet), másikon távozhat a felesleges folyadék (kimenet). Méréseinkhez szükségünk van a cella időnkénti átöblítésére, ez egyszerűen kivitelezhető perisztaltikus pumpával. Azonban kisebb mennyiségben szükséges oldatokat nem áramoltathatunk több centiméteres fluidikán, ezeket az oldatokat Hamilton-fecskendővel juttatjuk a cellába. A rugalmas cserék érdekében a projekt előző fázisában kifejlesztésre került a szeptumos injektáló rendszer, melyen a bemenet könnyen cserélhető.[12]



3.6. ábra. Az előzőtesen kifejlesztett szeptumos injektor rendszer

A berendezés néhány paramétere táblázatba foglalva:

Chip	Hullámvezető típusa	OW 2400 (Mikrovákuum Kft.)
	Mérete	$l = 48 \text{ mm}$, $h = 0.6 \text{ mm}$, $w = 16 \text{ mm}$
	Film anyaga	$\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$
	Film törésmutatója	$n_F > 1.7$
	Film vastagsága	$d_F = 150 - 200 \text{ nm}$
	Optikai rács	2400 vonal/mm
Fényforrás	Lézer típusa	He-Ne
	Lézer hullámhossza	$\lambda = 632.8 \text{ nm}$
Effektív törésmutató pontossága		$\pm 10^{-6}$
Pumpálási lehetőségek		perisztaltikus/fecskendő
Szoftver		Asi2.exe

3.1. táblázat. A mérőberendezés adatai

4. fejezet

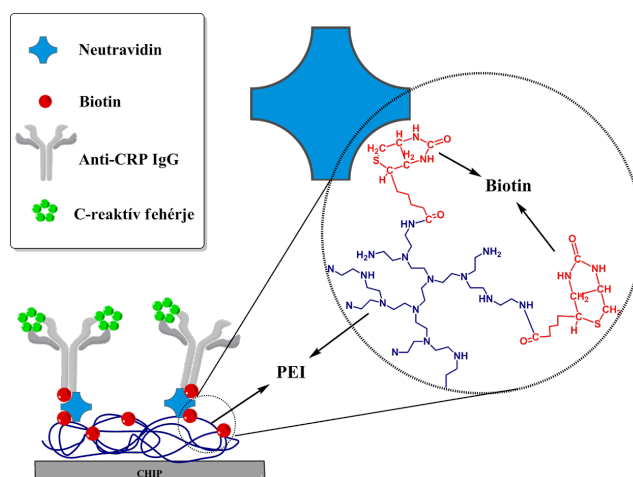
Mérések menete

4.1. A mérésekhez használt felületkémia kiválasztása

Ha fehérjéket (antitesteket) immobilizálunk figyelembe kell vennünk, hogy a molekulák erősen kölcsönhatnak a szilárd felületekkel, képesek akár letekeredni a maximális kontaktusért. Így az optimális immobilizálás minimalizálja az antitest és a felület között fellépő kölcsönhatásokat. Erre alkalmas hidrofil réteg a polietilén-glikol (PEG), poli-vinil-alkohol (PVA) és a dextrán. Az antitestek orientációja is fontos szempont, specifikus orientáció elérhető nemkovalens kötésekkel, például az antitest specifikus protein A vagy G segítségével. Kovalens kötődés az Fc-régió szénhidrát részén lehetséges, vagy a tiol csoportok felszabadításával (láncközi diszulfid-hidak csökkentésével).[14, 15]

Az általunk választott megoldás a felületet neutravidines (N.Av.) bevonása, majd ehhez rögzítjük a biotinált antitesteket. A neutravidin előnye a nagy affinitás, selektivitás biotinra, és megfelelő irányú kötődést biztosít, ha a biotin az Fc-régióon található.

A polietilén-imin (PEI) használatára esett a választás (keresztkötvé glutáraldehid-del) a fenti okok miatt, mely egy „ragadós” polielektrolit, ismert, hogy nagy affinitással köt szerves és szervetlen felületekre. Az ötletet a [9] publikáció ihlette, a PEI szabad amino csoportjai és az antitestek között kémiai keresztkötések létrehozása, avidin-biotin kapcsolaton keresztül (lásd 4.1 ábrán).



4.1. ábra. Sematikus ábra a PEI-s immobilizálásról.

4.2. Előkészítési munkálatok

A méréshez szükséges oldatok előállítása, összetétele

Méréseinkben biotinált anti-hCRP antitesteket és rekombináns CRP antigéneket használtunk.

PBS 1db PBS tabletta 200 ml Milli-Q vízben való feloldásával foszfát pufferelte sóoldathoz jutunk. A PBS izotóniás oldat: ozmolaritása és ionösszetétele nagyban hasonlít az emberi szervezetben jelenlévő oldatokéra. pH-ja 7.4, összetétele 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 . Oldataink oldószere, pH stabilizátor.

T-PBS Méréseinkben mosáskor 0.05%-os Tween 20-at alkalmaztunk PBS-ben, mely egy erőteljesebb „mosószer”.

Milli-Q rendszer Ultratiszta vizet előállító víztisztító berendezés. A laborban a víz a leggyakoribb oldószere. Az OWLS rendkívül érzékeny bioszenzor, a vízben oldott ionok, szerves anyagok, egyéb szennyeződések - például baktériumok, és a belőlük származó melléktermékek - befolyásolnák a kísérletek kimenetelét, meghamisítanák a mérési eredményeket. Ezt elkerülendő, a csapból érkező vizet használat előtt meg kell szűrni. A Millipore által gyártott Milli-Q berendezés gazdaságos módon állít elő kiváló tisztaságú, csíramentes vizet (MQ víz). Ezt használjuk nem csak a mérésekhez, hanem a mérőberendezés elemeinek öblítéséhez, mosásához is.

Chip tisztítás

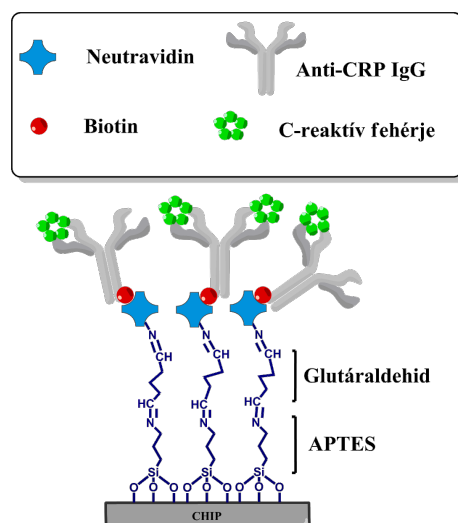
A tisztítandó chipeket egy teflontartóban helyezük párhuzamosan (4.2 ábra), majd rögzítjük. A chiptartót egy teflonedénybe helyezzük, majd krómkénsavval addig töltjük, míg a chipeket elfedi a sav. Így állni hagyjuk 2-3 percig, majd tiszta vízzel lemosuk a chipeket, 1 M-os KOH oldatba helyezzük a chipeket, itt semlegesítjük a savat. A következő lépésben MQ vízben áztatjuk a chipeket, 10 percenként cseréljük a vizet tízszer a chip felett. Felhasználásig szárazon (vagy pufferben) tároljuk.



4.2. ábra. A chip tisztítása.

4.3. Glutáraldehydes immobilizáció

A glutáraldehydes immobilizáció egy jól ismert eljárás, melyet különböző szerves felületeken alkalmaznak sikerrel. A mi eljárásunkban aminopropil-trietoxi-szilán (APTES) 2%-os vizes oldatát használtuk szilanizálásra. Ezt követően a chipet leöblítettük, majd 120 °C-on kiégettük. Ebben a lépésben az aminocsoportok kovalensen kötődnek a szerves (Si/TiO₂) felülethez. Az aminocsoportokat tartalmazó felület 2.5%-os glutáraldehyd (GA) oldattal kezeljük, ennek eredménye egy molekulárisan aktív réteg, melyhez jól kötődik a neutravidin molekula (4.3 ábra). Az APTES+GA felület egy klasszikus kovalens kötés szerves felületekhez, széles körben elterjedt például a mikroszkópiában is.



4.3. ábra. A glutáraldehydes immobilizáció sematikus ábrája, mutatva a kialakuló kémiai kötéseket.

4.4. Immobilizáció PEI réteggel

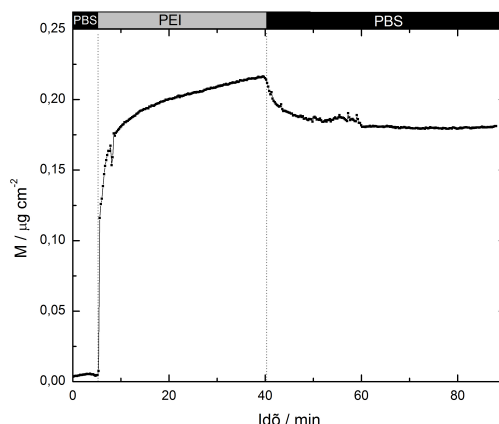
A PEI réteg tulajdonságai, tervezése

Méréseinkhez a Sigma-Aldrich cég által forgalmazott elágazó PEI-t használtuk, melynek molekulásúlya 750 kDa. Jól ismert, hogy a PEI nagyon gyorsan adszorbeálódik különböző szerves és polimer alapú felületekre. Méréseinkhez minél nagyobb aktív felületet akartunk létrehozni, ezért az oldatot pH 9.5-re állítottuk be. Irodalomból ismert, ha a pH-t csökkentjük a molekula globális konformációja laposodik. A vastagabb, elágazó struktúra több aktív helyet biztosít a későbbi felületi kapcsolatokhoz. A réteg glutáraldehydes keresztkötésének célja a deszorpció megakadályozása a felszínről, valamint a pH változás következtében a laposodás elkerülése.

A kontrollmérések után (4.4 ábra) a PEI réteg immobilizálását és biotinálását nem a mérőberendezésben végeztük, hanem az előkészítési munkálatok részeként.

Rétegek felvitele a chipre, inkubálás

- A tisztított chipet, az inkubálás előtti nap PBS-be tesszük, az inkubálás előtt lemossuk vízzel, majd nyitott küvetába helyezzük. 500 μ l 0.5%-os PEI oldatot (pH 9.5, borát pufferben) pipetázunk rá, majd 20 percig inkubáljuk.
- Leöntjük róla a PEI oldatot, majd 500 μ l borátpufferrel öblítjük a küvetát.



4.4. ábra. A PEI réteg mérése, a PEI réteg adszorpciója

A következő lépésben keresztkötéseket hozunk létre a PEI rétegben 2.5%-os glutáraldehid (500 μ l) segítségével. Inkubálási idő: 2 óra.

- Leöntjük róla a GA oldatot, majd öblítjük foszfát pufferrel (20 mM-os „A” oldat, pH = 8)
- Biotináljuk a PEI réteget 500 μ l, 1 mg/ml biotin N-hidroxiszukcinimid észterrel (NHS-biotin).
- Leöblítjük a chipet foszfát pufferrel, majd ebben tároljuk a mérés kezdetéig.

4.5. A mérés menete

A Falcon csőből kivesszük a chipet, lemossuk MQ vízzel, szárítjuk nitrogénnel, majd a küvettatartóba rakjuk, ráhelyezzük a küvettát, mellyel rögzítjük a chipet is. Ellenőrizzük a rendszer zártóságát. Méréseinkben 10-20 μ l cellatérfogatú küvettát használtunk.

Hamilton fecskendővel, vagy perisztaltikus pumpával feltöltjük a cellát, ellenőrizzük a buborékmentességet. Ha buborék került a rendszerbe, gyors fecskendő injekcióval, vagy a pumpával, nagy áramlási sebességgel eltávolítjuk.

A küvettatartót a mérőberendezésbe helyezzük (esetünkben ASI BIOS-1 OWLS setup), majd számítógépen elindítjuk a kiértékelő programot. A puffert pumpával áramoltatjuk a chip felett 1 μ l/s-os sebességgel, majd elindítjuk az adatrögzítést. Méréseink során kb. 10-15 perc hosszan várakozunk, ekkorra stabilizálódik az alaponalunk, ezt a program által kiírt adatokból (N(TE), N(TM)) ellenőrizhetjük.

A következő lépéshez leállítjuk a pumpát, és a PBS-es Eppendorf csőből a neutraavidinesbe helyezzük a cső végét. Az általunk használt csövön kb. 180 s alatt éri el a folyadék a cső végétől a cellát, ekkor élesen megváltozik a jel, addig áramoltatjuk a neutraavidint, míg egyensúly áll be az asszociáció és disszociáció között, ezt a program által kirajzolt görbéről olvashatjuk le.

Ismét leállítjuk a pumpát és a PBS-es Eppendorfból újra puffert áramoltatunk a rendszeren, lemosva az reverzibilisen kötött molekulákat. Az újabb egyensúly beálltával megállítjuk a mérést, kihúzzuk a pumpa csövéhez tartozó tűt a szeptumból, majd adott térfogatú és koncentrációjú CRP antitest (CRP-Ab) injektálunk 50 μ l-es Hamilton fecskendővel a cellába, folytatjuk az adatok rögzítését. Az egyensúly beállta után újabb egyensúlyig ismét puffert áramoltatunk át a cellán. Leállítjuk a mérést kihúzzuk a pumpa tűjét és Hamilton fecskendővel adott térfogatú és koncentrációjú antigént (CRP-Ag) injektálunk a cellába. Az egyensúly beálltat követően mosás következik, előbb PBS-sel, majd T-PBS-sel mossuk ki a cellát.

Mérésink során a leggyakoribb hiba, hamis jel forrása a cellába kerülő levegő buborék, ez driftet okozhat, rosszabb esetben az alapvonal eltolódását eredményezheti. A buborék leggyorsabb eltávolítása a perisztaltikus pumpa sebességének hirtelen megemelésével lehetséges, ha a buborék keletkezésekor éppen ezen áramoltattuk a folyadékot. Ha fecskendővel injektáláskor került a rendszerbe, akkor megoldás lehet a Hamilton fecskendővel újabb injektálás, nagy sebességgel. Ez azonban nem mindig vezet eredményre, valamint az adott oldatból nem mindig áll rendelkezésünkre nagyobb mennyiség, így a mérés újakezdése a legcélszerűbb.

5. fejezet

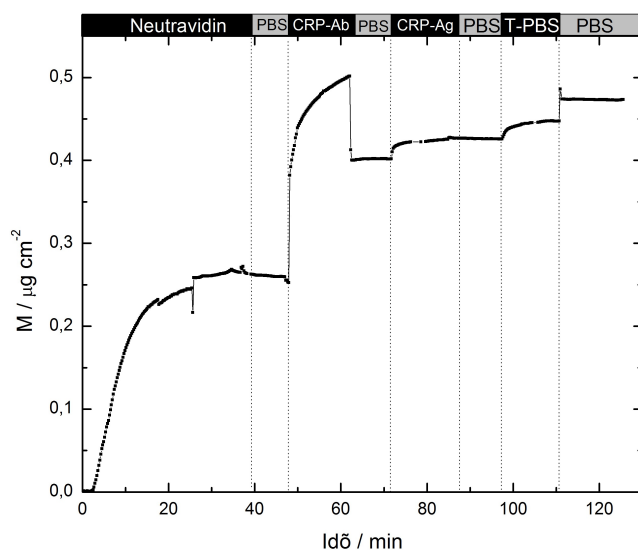
Eredmények

5.1. Glutáraldehydes immobilizáció

A következő két ábrán (5.1,5.2) a glutáraldehydes immobilizáció eredményeit mutatjuk be. Az 5.1 ábrán látható az $50\ \mu\text{l}$, $10\ \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú antigénes mérés, míg az 5.2 ábrán szintén $50\ \mu\text{l}$ térfogatú, de $20\ \mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú antigén injektálás történt. Az alacsonyabb koncentrációt mutató ábrán (5.1) 3 buborék is megfigyelhető 20, 30 és 120 perc környékén. A 3. buborék az alapvonalat is látványosan eltolta, így onnantól nem elemezhetjük a grafikon.

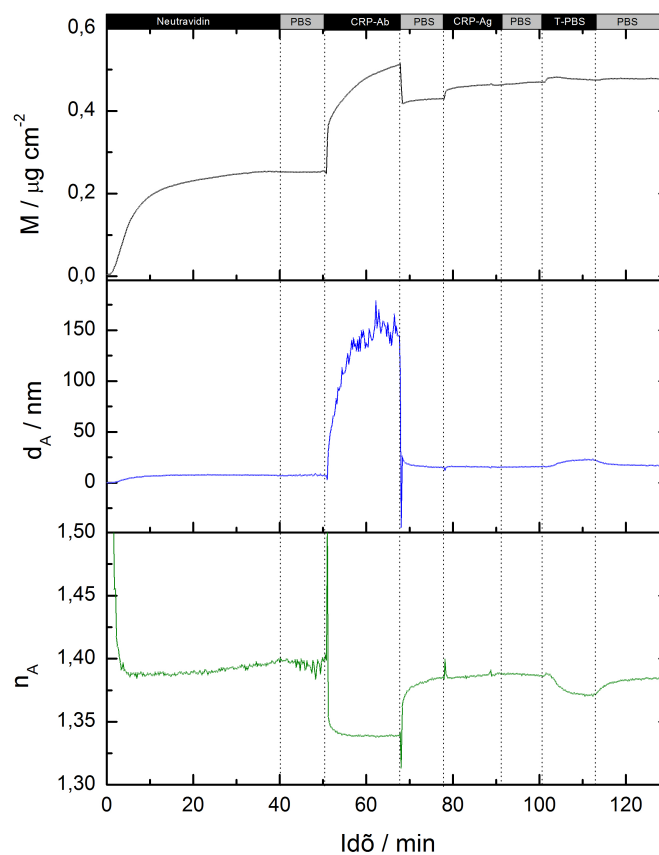
Az ábrák tetején látható szürke-fekete sávban jelezzük, hogy milyen oldatot injektáltunk vagy áramoltattunk a cellában. A pontozott vonal a szem vezetésére szolgál.

Mindkét esetben látható, hogy nő a tömeg és mosás hatására sincs nagy lemosódás, a különböző rétegek immobilizálása sikerült. $1\ \text{cm}^2$ -re körülbelül $0.25\ \mu\text{g}$ neutravidin tapadt ki. Az antitest mindkét esetben $50\ \mu\text{l}$ térfogatú és $10\ \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú volt (a további kísérletekben is ezt a koncentrációt és térfogatot alkalmazzuk az antitestekre). Az antigén koncentráció duplája volt a második esetben és a görbékről is leolvasható, hogy a nagyobb koncentrációjú oldatnál nagyobb tömeg tapadt egységnyi felületre.



5.1. ábra. Kitapadt tömeg a $10 \mu\text{g/ml}$ antitest koncentrációjú mérés esetén, GA-del előkészített felületen.

A méréseinkhez rendelkezésre álló kiértékelőprogram segítségével kiszámolhatjuk az adszorbeálódott réteg vastagságát (d_A) és törésmutatóját (n_A) is, ami látható 5.2 ábrán. Az ábrákon látható adszorbeálódott rétegre vonatkozó törésmutató és vastagság értékek homogén, izotróp réteget feltételezve kerültek kiszámításra, azonban ez a feltételezés nem minden esetben érvényesül. Komplex oldatok esetében, vagy erősen orientált kötődésekkor kialakulhatnak rendezett rétegek, melyek már nem tekinthetők izotrópnak. Így lehetséges, hogy a kiértékeléskor irreálisan vastag rétegek, vagy negatív vastagságok jönnek ki. Későbbi feladatok közé tartozik ezen anomáliák feloldása, optikai anizotrópia számolása.[10, 11]



5.2. ábra. M , n_A és d_A értéke, a $20 \mu\text{g/ml}$ antitest koncentrációjú mérés esetén, GA-del előkészített felületen.

Az 5.2 grafikonon jól látszik az antitestek kiugróan magas számolt vastagsága ($\sim 150 \text{ nm}$), ez egyértelműen nem valós adat. Feltételezzük, hogy a réteg pozitív anizotrópiával rendelkezik, oszlopos szerkezetű a molekularétegünk.

Az 5.1 táblázatba összefoglaltuk az előbbi két ábráról leolvasott adatokat. Az egyes adatok az adott oldat kötődése után mért egységnyi felületre vonatkoztatott tömeget tartalmazzák, így az előző rétegek tömegei is beleszámítanak. Kiértékeléseinkben az előkészítési fázisban immobilizálásra került rétegeinket nem vesszük figyelembe.

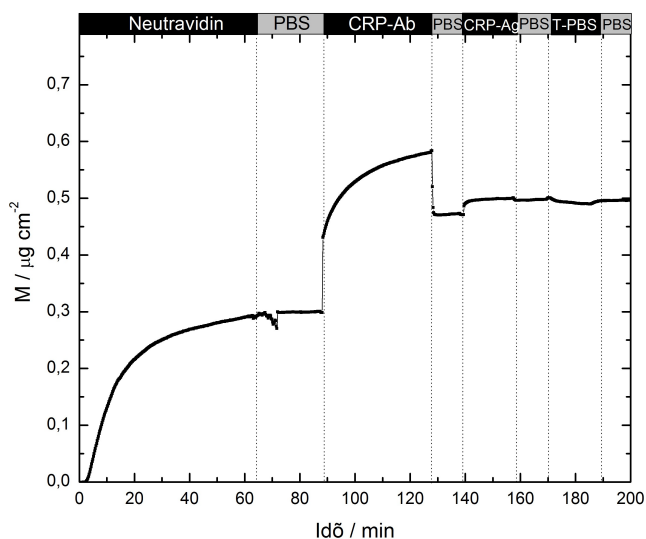
Antigén koncentráció [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	10	20
$M_{N.Av.}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	0.2586	0.2511
M_{CRP-Ab} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	0.4021	0.4191
M_{CRP-Ag} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	0.4258	0.4768

5.1. táblázat. A glutáraldehydes előkészítés hatására bekövetkező tömegváltozások

5.2. Immobilizáció PEI réteggel

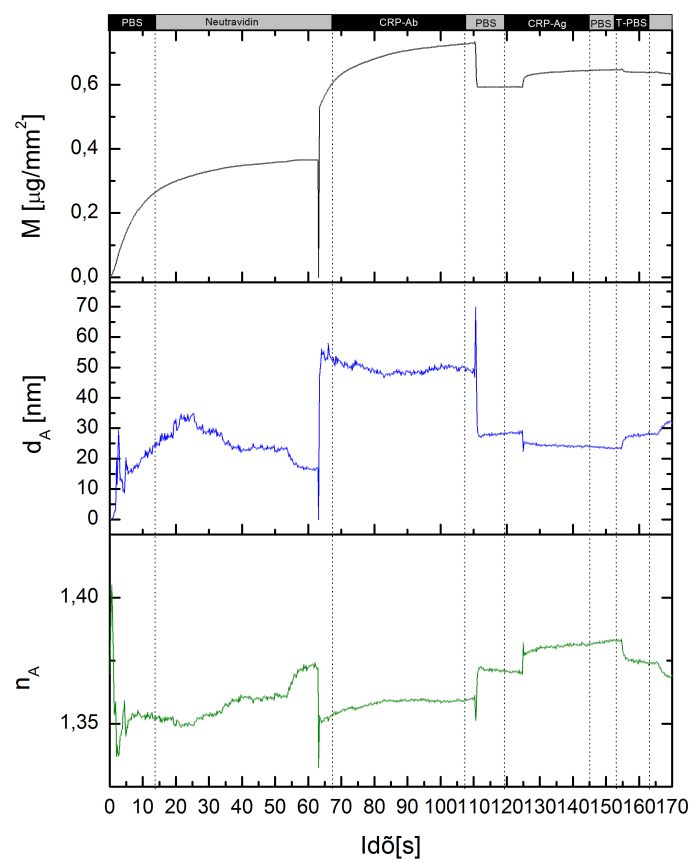
Hasonlóan a glutáraldehydes immobilizációhoz a következő mérésekben is $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú antitestet használtam, melyből $50 \mu\text{l}$ -t injektáltam. A neutravidin oldatból egységnyi felületre kitapadt molekulák tömege kicsit nagyobb, mint a glutáraldehydes előkészítés esetén, de nem számottevően, a pufferes lemosással sem változik a jelünk, így a PEI réteges neutravidin immobilizálás is alkalmas az antitestek rögzítésére, majd azokhoz antigének kapcsolására.

Az antigén koncentráció $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ az 5.3 ábrán. A PBS-es mosást követően az antitestek növelték a tömeget, majd az antigén bekötődése is a várt jelet adja.



5.3. ábra. $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ antitest koncentrációjú mérés, PEI-vel előkészített felületen

Az 5.3 mérés alkalmával egy buborék megfigyelhető az 70. perc környékén, melyet sikeresen eltávolítottunk, és az alapvonal sem tolódott el.



5.4. ábra. M, n_A és d_A értéke a $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ antitest koncentrációjú mérés esetén, PEI-vel előkészített felületen

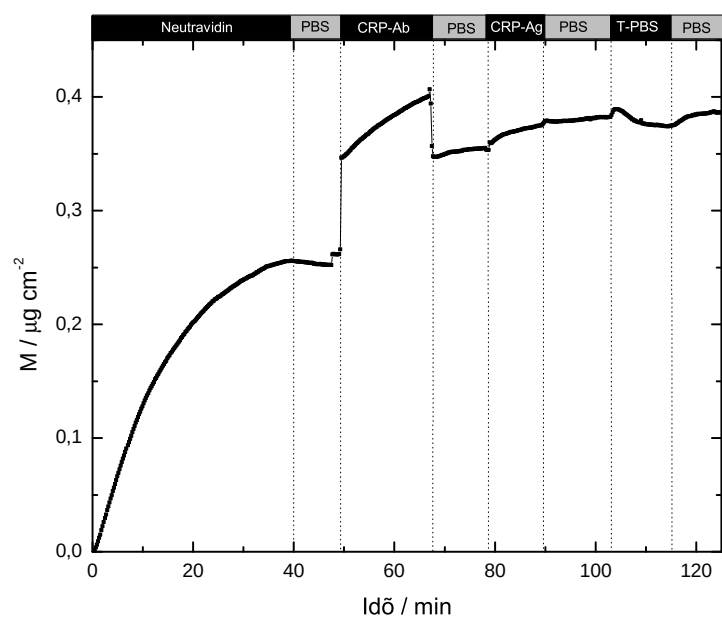
Ahogy a glutáraldehides immobilizáció során irreálisan vastag réteget kaptunk az antitestre, úgy a PEI-s (5.4 ábrán látható) mérés során is megfigyelhető ez a jelenség, sőt negatív vastagság is látszik 10 perc körül.

Az 5.1 táblázathoz hasonlóan a 5.2 táblázat tartalmazza az egységnyi felületre kitapadt rétegek tömegét.

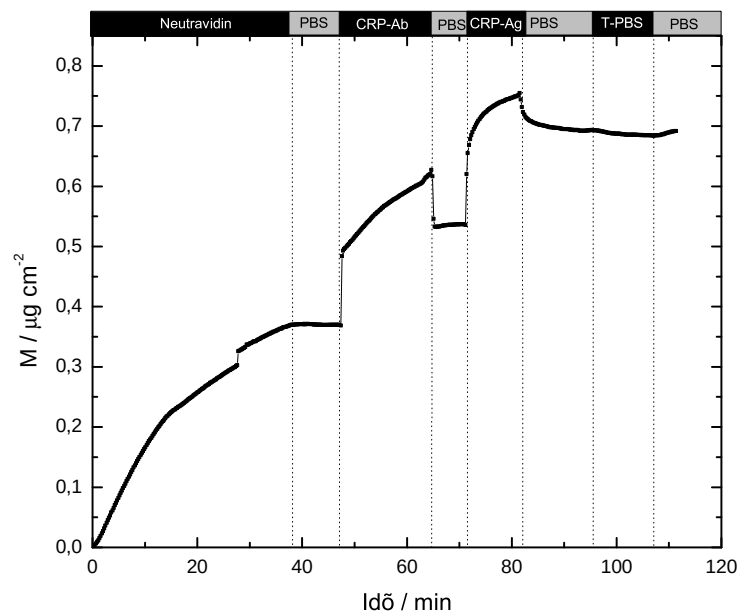
Antigén koncentráció [$\mu g/ml$]	10	20
$M_{N.Av.} [\mu g/cm^2]$	0.2990	0.3651
$M_{CRP-Ab} [\mu g/cm^2]$	0.4707	0.5911
$M_{CRP-Ag} [\mu g/cm^2]$	0.4965	0.6333

5.2. táblázat. A PEI-s előkészítés hatására bekövetkező tömegváltozások

Látható mindkét módszer esetén, hogy nem csupán azt tudjuk megállapítani, hogy a specifikusan keresett antitest jelen van vagy sem az oldatban, hanem további mérések, és a reprodukálhatóság igazolásával kvantitatív analízisre is lehet használni. Az 5.5 ábrán látható, hogy a módszer már $1 \mu g/ml$ -es koncentrációt is képes kimutatni a CRP antigénből. Az egészséges ember CRP szintje $10 \mu g/ml$, enyhe gyulladás és vírusos megbetegedések esetén $40-100 \mu g/ml$ az értéke, bakteriális fertőzések esetén $40-200 \mu g/ml$ a koncentrációja a vérben, de akár magasabbra is emelkedhet. Az irodalmi adatokat elemezve látható, hogy a CRP koncentrációja széles skálán mozoghat az emberi szervezetben. Módszerünk alkalmasságát ezért a magasabb antigén koncentrációkra is megvizsgáltuk. Az 5.6 ábrán $100 \mu g/ml$ -es koncentrációjú antigén oldatot fecskendeztünk a küvettába.



5.5. ábra. M értéke $1 \mu\text{g/ml}$ antitest koncentrációjú mérés esetén, PEI-vel előkészített felületen



5.6. ábra. M értéke $100 \mu\text{g/ml}$ antitest koncentrációjú mérés, PEI-vel előkészített felületen

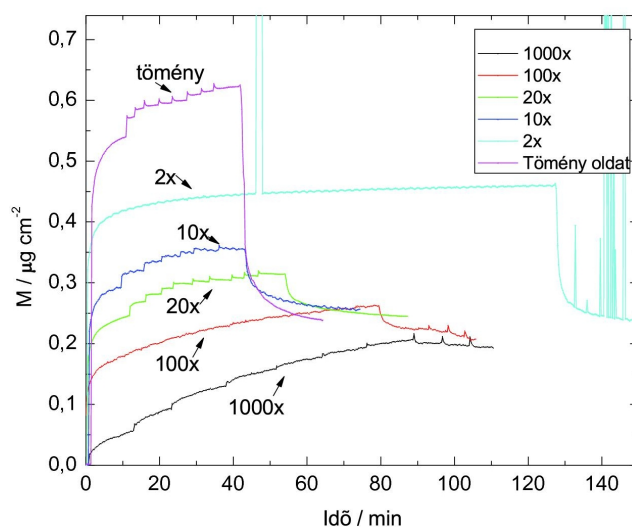
5.3. Marhaszérum oldatok vizsgáltai

A vér fő testnedvünk, folyékony szövet. Fő feladatai az oxigén és a szén-dioxid, a tápanyagok és a víz, valamint az oldott anyagcseretermékek szállítása. Ezen kívül fontos szerepe van az immunreakcióknál, a hormonok szállításában és a testhőmérséklet-szabályozásában. A vér speciális, folyékony sejt közötti állománnyal rendelkező szövet.

Az általunk fejlesztett diagnosztikai eszköz célja vérből kimutatni a betegségmarkereket. Ahhoz, hogy el tudjuk különíteni a számunkra fontos antitest-antigén kölcsönhatásokat, meg kell vizsgálnunk a mérési adatokhoz járulékot adó többi véralkotó és a chipfelület kölcsönhatását.

A vér különböző formáiban vizsgálható, attól függően, hogy milyen előkészítési folyamatokon ment keresztül. A vér natív formájában sejttes elemekből és vérplazmából áll. Sejttes elemei a vörösvértestek, melyek elsősorban az oxigén és szén-dioxid szállításáért felelősek, a fehérvérsejtek, melyek a szervezet védekezésében játszanak szerepet, a vérlemezkék feladata a vérzéscsillapításban van. A vérplazma már a vér alakos elemeit nem tartalmazza, az alakos elemek ülepedése után a plazma a felülúszó frakció. A szérumban már az alvadási faktorok sincsenek jelen (pl.: fibrinogén), véralvadás és centrifugálás után a szérum alkotja a felülúszó frakciót. A szérum vízből, oldott ionokból és szerves molekulából, plazmafehérjékből áll, az általunk vizsgált C-reaktív fehérje is megtalálható benne.

Méréseinkhez egyelőre marhaszérumot használtunk, melynek különböző koncentrációiban néztük az adszorpcióit, pufferként PBS-t használtunk. Két injektálási módot alkalmaztunk az egyiknél azonos időnként egyforma térfogatokat injektáltunk (tömény oldat, 10x, 20x, 1000x hígítás esetén), a másik során egy injektálás történt és hosszabb ideig vártunk (2x, 100x hígítás). A mosási szakaszok is látszanak az 5.7 ábrán, amikor a tömeg hirtelen csökkenni kezd, ezeket általában több lépcsőben végeztük. 2x hígításnál több helyen is látszik, hogy a számítógép meghibásodott, melyet a program jelzett, így azokat a kiértékeléskor nem vettük figyelembe.

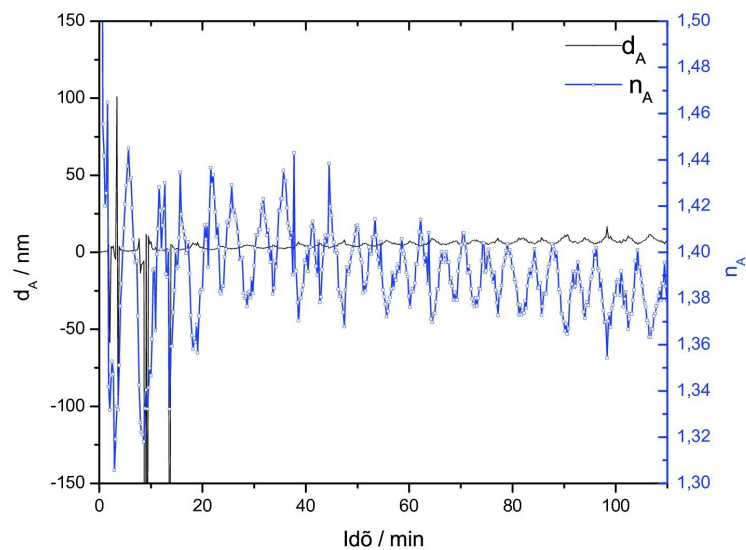


5.7. ábra. A különböző hígítású marhaszérum oldatokból egységnyi felületre kitapadt tömeg

Leolvasható az 5.7 ábráról, hogy jelentős mennyiségű szérum alkotó tapad a chip felületére. Az asszociációs szakaszban jól látszik, hogy minél magasabb koncentrációjú oldatot alkalmazunk, annál jobban nő a felületre kitapadt molekulák tömege. A lemosási szakaszban minden hígítás esetén megfigyelhető disszociáció, a kétszeres hígítású és tömény oldatok esetén már lényegesen nagyobb a lemosódás mértéke is.

Az oldatot hányszorosára hígítottuk	M lemosás előtt [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	M lemosás után [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
1000	0.2538	0.1784
100	0.2695	0.1658
20	0.3191	0.2445
10	0.3611	0.2553
2	0.4688	0.2326
Tömény oldat	0.6215	0.2331

5.3. táblázat. A szérum a hígítás függvényében mekkora tömeg tapadt ki a felületre



5.8. ábra. 0.1 %-os szérumoldat vastagsága és törésmutatója

Kiértékeléseink során a kitapadt réteg vastagságát is vizsgáltuk (5.8 ábra), azonban a kiértékelő program fent már említett feltételezései mellett valószínűsítjük, hogy nem jutottunk valódi eredményekhez[10, 11], mert itt is negatív vastagsággal találkozhattunk. Valószínűsítjük, hogy a szérum a kitapadása során folyamatos átrendeződéseken megy keresztül, melyek hatására anizotropia jön létre a rétegben.

6. fejezet

Konklúzió

Kitűzött célunk a glutáraldehides előkészítési munkálatok helyett egy új antitest rögzítési eljárás kidolgozása volt. Az általunk választott PEI réteg előnye a szervetlen és szerves felületekhez erős kötődése, a szilanizálás elkerülése, egy rövidebb előkészítési munkát igénylő módszer alkalmazása, a felület célzott kezelése. Ahhoz, hogy az új réteghez sikeresen kötődjenek a következő molekulák, nem csak kémiai kötődéseket kell figyelembe vennünk, hanem oda kell figyelni a biológiai rendszerek bonyolultságára, az aktív helyek orientációjára, biológiai aktivitásuk, affinitásuk megőrzésére.

Méréseinkben összehasonlítottuk a klasszikus APTES+GA és a PEI rétegen rögzített neutravidin molekulák tömegét, majd az ehhez kapcsolódó antitest-antigén komplexét.

Megállapíthatjuk, hogy a különbözően előkészített felületek között nem találtunk jelentős különbségeket. Eredményeinkből látszik, hogy széles CRP-Ag koncentráció tartományban mérhetünk ezzel a módszerrel, már az $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ -es koncentráció is jól mérhető jelet adott a grafikonon, melynek tízszerese található meg az egészséges emberi vérben, betegségek esetén pedig akár több százszorosa is lehet.

Eddigi méréseinkben csak a PEI réteg pH-ját optimalizáltuk, a jövőben további finomítások szükségesek, mint például a hőmérséklet, az inkubálási idők, ionerősség, réteg keresztkötése és az antitest különböző koncentrációi.

A marhaszérumos kísérletekből láthatjuk, hogy fontos foglalkoznunk a chip felületének megfelelő előkészítésével, a nem specifikus kötődésekből származó hamis jelek kiküszöbölésével.

Közel harminc mérésünk során több antitest és antigén koncentrációval is foglalkoztunk, ezek elemzésével információt kaphatunk a különböző rétegek kinetikájáról,

valamint a kimutatási határról. A későbbi vizsgálatainkban tervezzük a vastagság irreális értékeinek elemzését, a lehetséges anizotrópia kimutatását, az átrendeződések hatásának magyarázatát.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani témavezetőinknek, Dr. Horváth Róbertnek és Dr. Kurunczi Sándornak útmutatásukért és tanácsaikért, a módszerek bemutatásáért, rengeteg segítségükért a dolgozat összeállításában.

Köszönjük Szabó Bálintnak a kísérleteinkben használt marhaszérumot.

Köszönjük Patkó Dániel állandó segítségét kísérleteink során, folyamatos tanácsait, a mérés során fellépő problémák elhárítását.

Irodalomjegyzék

- [1] Erdei Anna. Immunológiai Módszerek. Medicina Kiadó, (2006)
- [2] Gergely János, Erdei Anna. Immunbiológia. Medicina Kiadó, (2000)
- [3] Oroszlán Melinda A C1q, a mannozkötő fehérje és a C-reaktív fehérje hatásának vizsgálata endotélsejteken, szerepük az endotél diszfunkcióban. Doktori Értekezés, (2006)
- [4] J. J. Ramsden, M. Németh-Sallai, J. Vörös, I. Szendrő. Intergrált optikai hullámvezető szenzor felületi adszorpció vizsgálatára. Fizikai Szemle 281-285, (1997/9)
- [5] Horváth Róbert. Optikai hullámvezető szenzorok biofizikai alkalmazásai. ELTE Doktori Értekezés, (2001)
- [6] Vörös János. Integrált optikai hullámvezető szenzor alkalmazása bioanyagkutatásban. Doktori Értekezés, (1999)
- [7] R. Kurrat. Adsorption of biomolecules on titanium-oxide layers in biological model solutions. Swiss Federal Institute of Technology Zurich Dissertation
- [8] J. Anzai, M. Nishimura, J.Chem.Soc. Perkin Trans., 2 (1997) 1887-1889.
- [9] R. Mészáros, L. Thompson, I. Varga, T.Gilányi. Adsorption properties of polyethyleneimine on silica surfaces in the presence of sodium dodecyl sulfate. Langmuir 19 (2003) 9977-9980
- [10] R. Horvath, J.J. Ramsden Quasi-isotropic analysis of anisotropic thin films on optical waveguides Langmuir 23 (18), pp. 9330-9334 (2007).
- [11] R. Horvath, J. McColl, G.E. Yakubov, J.J. Ramsden Structural hysteresis and hierarchy in adsorbed glycoproteins The Journal of Chemical Physics 129 (7), art. no. 071102 (2008).

- [12] Orgován Norbert. Folyadékkezelés OWLS-kísérletekben. Tudományos Diákköri Dolgozat, (2010)
- [13] S. Kurunczi, R. Horváth, D. Patkó, N. Orgovan, P. Petrik, A. Hámori, A. Hainard, N. Turck, J.C. Sanchez, D. Giannone. P3SENS D7.2: Report Immobilization. (2011)
- [14] P. Peluso, D.S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L.S. Jung, P. Wagner, S. Nock, Anal. Biochem. 312 (2003) 113-124.
- [15] R.A. Vijayendran, D.E. Leckband, Anal. Chem. 73 (2001) 471-480.
- [16] Kovács Noémi. Fehérjeadszorpció jelölésmentes és valós idejű monitorozása optikai bioszenzorral. Diplomamunka, (2011)