



Tripszin immobilizálása polidimetilsziloxán felületen fehérjék on-line bontásához

Kecskeméti Ádám, III. Kémia BSc

OTDK pályamunka

Témavezető: Dr. Gáspár Attila egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi előzmények.....	4
2.1. Peptidtérkép vizsgálatok	4
2.2. A peptidtérkép vizsgálatoknál alkalmazott technikák	5
2.3. On-line fehérjeemésztő rendszerek	7
2.4. PDMS, mint adszorbens és mikrofluidikai csipek anyaga	9
2.5. Fehérjék immobilizálása.....	10
3. Kísérleti körülmények.....	11
3.1. Felhasznált vegyszerek.....	11
3.2. Készülékek	12
3.3. On-line CE enzimreaktor készítése	14
4. Eredmények és értékelésük	15
4.1. Peptidtérkép készítése off-line emésztést követően.....	15
4.2. Tripszin adszorpciója PDMS felületen	17
4.3. Tripszin aktivitásának vizsgálata	19
4.4. Az on-line enzimreaktor működése	22
5. Összefoglalás	23
6. Irodalomjegyzék.....	24
7. Köszönetnyilvánítás	25

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt ötven évben kifejlesztett új, nagyhatékonyságú műszeres analitikai eljárások, mint pl. a tömegspektrometria és a gélelektroforézis, lehetővé tették a fehérjék meghatározását és vizsgálatát. A tömegspektrometriában használatos lágy ionizációs eljárások, különösen a mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció-repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS), lehetővé teszi fehérjék és más sérülékeny, nagyméretű biomolekulák elemzését. Napjainkban a vizsgálatok egyre inkább élő szervezetek teljes fehérjeállományának felderítésére irányulnak. Így jött létre az 1990-es években a proteomika tudományága, amely komplex fehérjeelegyek analízisével foglalkozik.

Ezen új tudományág kihívásai közé tartozik a sejtekben található több ezer fehérje elválasztása, ill. az izolált fehérje elsősorban kvalitatív elemzése. Ezen analízishez fontos volt találni olyan eljárásokat, melyek kevés mintát igényelnek, ugyanakkor gyors analízist tesznek lehetővé. Erre lehet megoldás a peptidtérkép vizsgálat (peptide mapping), azonban a standard eljárás időigényes, így jelenleg is intenzív kutatások zajlanak ezen peptidtérkép vizsgálat gyorsítására.

A peptidtérkép vizsgálatokhoz a MALDI-MS mellett elektroforetikus technikákat (pl. kapilláris elektroforézis (CE)) is alkalmazhatunk. Ilyenkor a fehérjéknek egy proteolitikus enzimmel (pl. tripszinnel) történő bontásával kapott peptidelegyet használunk a vizsgálatához. Kutatómunkám során célunk az volt, hogy a tripszint aktivitásának megőrzése mellett PDMS felületen gyakorlatilag irreverzibilisen megkössük és így a különböző fehérjék enzimes bontásának folyamatát jelentősen felgyorsítsuk.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. Peptidtérkép vizsgálatok

Köztudott, hogy a fehérjék 20-féle fehérjeépítő aminosavból felépülő biopolimerek. Az aminosavak sorrendjét (aminosav szekvenciáját) nevezzük a fehérjék elsődleges szerkezetének. Az így kialakult peptidlánc konformációját nevezzük másodlagos szerkezetnek. A hosszú láncok a térben háromdimenziós szerkezetet vesznek fel, mely a fehérje harmadlagos szerkezete, ami alapján egy fehérje lehet fibrilláris vagy globuláris. Amennyiben több alegység is található egy fehérjén belül, úgy az alegységek egymáshoz viszonyított helyzete a fehérje negyedleges szerkezete.

Peptidtérkép vizsgálatok során a fehérjéket specifikus enzimekkel peptidekre hasítjuk. Ilyen enzimek lehetnek pl. a tripszin, papain, kimotripszin, elasztáz. Az általunk is használt tripszin az arginin és a lizin C-terminális peptidkötéseit hasítja. A hasítás során kapott peptidelegyet ezután elválaszthatjuk kromatográfiásan, elektroforetikus technikákkal vagy tömegspektrumot is készíthetünk belőle. Ekkor kapjuk a peptidtérképet, amely ujjlenyomatszerűen jellemzi a fehérjét, így egy adatbázissal összehasonlítva azonosíthatjuk azt. Ezen technika közvetett információt szolgáltat a fehérje aminosav szekvenciájáról; azonosságon alapuló vizsgálatot tesz lehetővé.

Az oldatban történő enzimés emésztés során az enzimet minden esetben alacsony koncentrációban kell alkalmazni, hogy ne történjen önemésztés. Az enzim ugyanis nagyobb koncentrációban képes önmaga emésztésére is. Ennek oka, hogy az enzim nem feltétlenül csak a mintafehérjével reagál, hanem egy másik enzimmolekulával is (ami szintén fehérje), és ennek eredményeképpen önmagát bontja. Az alacsony enzimkoncentráció azt eredményezi, hogy az emésztés akár 12 órát is igénybe vehet.

A gyorsaságot jelentősen lehetne növelni az enzim magasabb koncentrációban történő alkalmazásával, ekkor azonban ki kell küszöbölnünk az önemésztést. Ezt megtehetjük az enzim immobilizálásával, ugyanis ha az emésztést csak immobilizált formában lévő enzimek végzik, úgy az enzimek nem tudnak egymással reagálni. Fontos azonban, hogy immobilizált tripszin használatakor nagy felület/térfogat arányú rendszert használjunk (ilyen pl. a CE, ill. a mikrofluidikai csipek), így tudjuk ugyanis biztosítani, hogy az oldatban lévő fehérjemolekulák többsége rövid idő alatt találkozzon a felületen immobilizált enzimmel.

2.2. A peptidtérkép vizsgálatoknál alkalmazott technikák

A peptidtérkép vizsgálatokhoz a kromatográfiás módszerek mellett egyre inkább kapilláris zónaelektroforetikus technikákat (CZE) és MALDI tömegspektrometriát használnak.

A kapilláris zónaelektroforézis egy olyan elektroforetikus eljárás, mellyel a kapillárisba egy zónában bejuttatott mintakomponenseket tömeg/töltés arányuk szerint tudjuk elválasztani egymástól ún. diszkrét zónákra. Az elektroforetikus elválasztás menete a következő: a kapillárist valamilyen elektrolit oldattal töltjük meg (általában puffer oldat), majd a minta injektálása történik meg. A puffer oldat biztosítja a pH állandóságát, ill. az elektroforézishez szükséges elektromos áramvezetést. Ugyanakkor a puffer pH-ja befolyásolja a minták töltését. A kapilláris két végére a puffert tartalmazó edények kerülnek. Az elektroforézis elektromos tér hatására indul meg, melyet a két edénybe merülő elektródra kapcsolt feszültség biztosít. A kapilláris falának szilanolcsoportjainak protonáltsága határozza meg a felület töltését, ami tehát pH függő. Egy hagyományos kvarckapilláris fala pH=3 felett negatív töltéssel rendelkezik. Emiatt a puffer oldat pozitív töltéssel rendelkező részecskéi a kapilláris belső falánál kettősrétegbe rendeződnek. A hidratált kationok elektromos térerő hatására a katód (-) irányába mozdulnak el, ez pedig az egész puffer oldat áramlását eredményezi. Ezt a jelenséget nevezzük elektroozmotikus áramlásnak (EOF), ami a leírtak miatt katód irányú. A mintakomponensek áramlási sebessége a saját elektroforetikus vándorlási sebességük és az EOF áramlási sebességének vektoriális összege. Belátható, hogy a kationok az EOF-nél nagyobb sebességgel, a semleges komponensek az EOF sebességével mozognak, míg az anionos komponensek csak akkor detektálhatók, ha elektroforetikus vándorlási sebességük kisebb, mint az EOF sebessége.

A MALDI-TOF-MS olyan lágy ionforrással felszerelt tömegspektrométer, mely alkalmas a makromolekulák (pl. fehérjék) mellett kisebb komponensek (pl. peptidek) molekulatömegének nagy pontosságú meghatározására. A MALDI mintatartó lemezére oldatban visszük fel a minta és a mátrixvegyület keverékét, majd az oldószer elpárolgását követően tudjuk ionizálni a mintát. Ennek során egy nagy energiájú lézerrel sugározzuk be azt. A mátrix nagy elnyeléssel rendelkezik a sugárforrás hullámhosszán, így elnyeli annak energiáját, ennek hatására a minta deszorbeálódik a mintatartóról, majd a gerjesztett mátrixmolekulák ionizálják a minta molekuláit.

A MALDI ionforrások jellemzően TOF analizátorral működnek, azaz a minta ionizálását, és feszültséggel történő gyorsítását követően egy vákuum alatt álló repülési csőbe

jutnak a molekulák. A repülési időt egyértelműen hozzárendelhetjük egy tömeg/töltés értékhez, így nyerjük a tömegspektrumot. A MALDI rendelkezik azon előnyös tulajdonsággal, hogy nem jellemző rá a sokszorosan töltött részecskék kialakulása, sőt, gyakran csak egyszeres pozitív töltésű részecskék keletkeznek, így jó esély van arra, hogy a kapott legnagyobb m/z érték a molekulacsúcs (amennyiben nincs fragmentáció). Alkalmazása kifejezetten előnyös nagyméretű biomolekulák tömeganalízisének, ugyanis ezen molekulák gyakran fragmentálódnak, így más ionforrások alkalmazása a minta nagymértékű roncsolását eredményezi, ami miatt nehezebb lenne a molekulatömeg meghatározása.

2.3. On-line fehérjeemésztő rendszerek

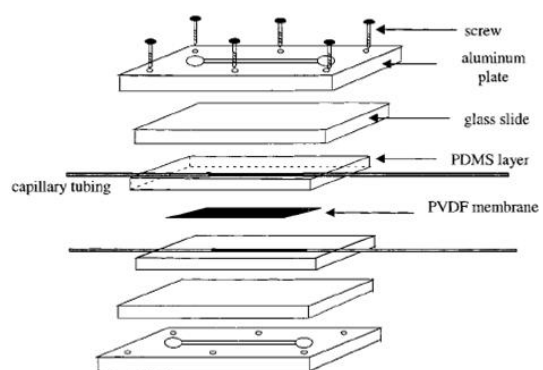
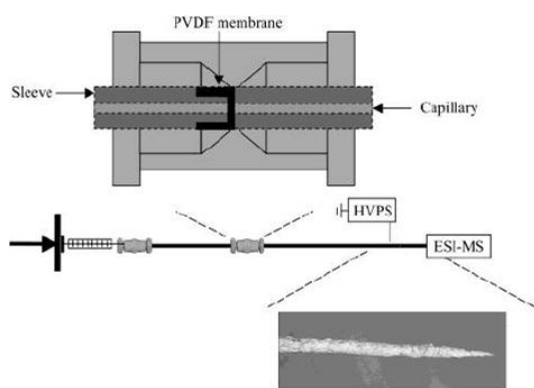
Az on-line fehérjeemésztő rendszerek jellemzője, hogy a fehérje emésztése nem egy külön oldatban, hanem a peptidtérkép készítése előtt közvetlenül történik az adott rendszerben, pl. CZE peptidtérkép esetén az injektálás után a szeparációs kapilláris belsejében megy végbe a minta emésztése.

Enzimet immobilizálni alapvetően kétféle módon lehet: kovalens kötással vagy adszorpcióval. Leírták L-1-tozilamido-2-feniletill klórmethyl keton-tripszin (TPCK-tripszin), ill. pepszin A kovalens kötését kvarckapilláris belső falához¹. A kovalens kötés megvalósítása azonban vegyszerigényes, bonyolult folyamat, létrehozásához a felület kezelése és egyéb segédanyagok szükségesek, amik növelik az előállítás költségeit.

Adszorpcióval történő immobilizálásra különösen alkalmas a poli-vinilidénfluorid (PVDF) membrán, amiből többfajta elrendezésű enzimreaktor is kifejlesztettek^{2,3}, közös jellemzőjük, hogy a PVDF membrán egy csatorna vagy kapilláris belsejében (azzal párhuzamosan vagy arra merőlegesen fut) található meg, amelyre adszorbeálódik a tripszin (adszorpciós kapacitás: $\sim 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Az így kialakított rendszer kevésbé vegyszerigényes, ám problémás a membrán elhelyezése, ill. probléma lehet a nem megfelelő csatlakoztatások kiküszöbölése a merőleges elrendezésnél (1. ábra).

További számos példa található a szakirodalomban fehérjék immobilizálására, pl. bevonhatjuk a kapillárist polimerrel, amihez kovalens módon kapcsolható a tripszin⁴, leírták az enzim polidimetilsziloxán (PDMS) mikrocsiphez⁵, ill. 3-féle (epoxi, karbonildiimidazol, etiléndiamin) monolitikus lemezhez történő kovalens kapcsolását⁶. Adszorpciót végeztek polisztrénszulfonáton⁷, ill. karbonilezett PDMS felületen⁸. A felület töltésétől függően az adszorpció hajtóereje hidrofób-hidrofób vagy elektrosztatikus kölcsönhatás. Egészen különös immobilizálási kísérletek is akadnak, a tripszint szol-gél mátrixba lehet zárni CE kapillárisban⁹, ill. pipettahegy szilikagél töltetének felületét is vonták már be tripszinnel¹⁰. A leírt rendszerek mindegyike 15 perc alatt képes fehérjebontást végezni, és a reaktorok élettartama is kiváló (1-2 hónapig nem veszít aktivitásából az enzim).

Azonban ezen immobilizált enzimreaktorokra jellemző, hogy kovalens kötés esetén az immobilizálás vegyszerigényes, adszorpció esetén pedig problémás az adszorbens megfelelő elrendezése miatt. Célunk egy olyan reaktor megalkotása, mely kialakítása nem vegyszerigényes, ugyanakkor az adszorbensnél sem jelentkeznek az említett problémák.



1. ábra
*Különböző elrendezésű PVDF membrán adszorbenst tartalmazó immobilizált
 enzimreaktorok.^{2,3}*

2.4. PDMS, mint adszorbens és mikrofluidikai csipek anyaga

A polidimetilsziloxán a leggyakrabban használt szilíciumalapú polimer. Előnyös tulajdonsága, hogy optikailag áttetsző, nem gyúlékony, biokompatibilis, rugalmas és olcsó. Alkalmazása kiterjed mindennapi életünk számos területére, felhasználják implantátumok, kontaktlencsék alapanyagaként, de előfordulhat a samponunkban is, ill. ételeinkben.

A polimer térhálósodását követően annak felülete igen hidrofób, ennek következménye, hogy számos szerves makromolekula kiválóan adszorbeálódik rá. Az adszorpció mértéke igen jelentős (a szem csarnokvizében lévő fehérje adszorpciójával magyarázható a kontaktlencse homályossága is, amennyiben nem tisztítjuk megfelelően). Mikrofluidikai csipekben igyekszünk elkerülni az adszorpciót, mivel ez a csatorna falának felületi töltését változtatja, ami csökkenti a mérések reprodukálhatóságát. Emiatt több cikk foglalkozik makromolekulák, különösen fehérjék PDMS felületén való nem-specifikus adszorpciójának leküzdésével^{11,12,13}.

A PDMS-ről elmondható, hogy mivel áttetsző, olcsó, veszélytelen, és rugalmas, ezért többen használják mikrofluidikai csipek alapanyagaként. A csipek csatornái magas felület/térfogat aránnyal rendelkeznek, ami alkalmassá teszi on-line enzimreaktorként való felhasználásra. A leírtak alapján a PDMS mikrofluidikai csipeket megfelelőnek találtuk arra, hogy adszorpció révén immobilizáljunk tripszint, magas felület/térfogataránnyal rendelkező rendszerben.

On-line enzimreaktort alakíthatunk ki hagyományos CE kapillárisban is, amennyiben bevonjuk a kapilláris belső felületét igen vékony PDMS réteggel. A PDMS-t hexánban szuszpendálva tudunk igen vékony PDMS rétegeket kialakítani felületeken¹⁴. Ezt a szuszpenziót áramoltatva a kapillárisban be tudjuk vonni annak belső felületét vékony PDMS réteggel. Az ilyen PDMS-sel bevont kapilláris pedig szintén használható a magas felület/térfogat arány miatt reaktorként.

2.5. Fehérjék immobilizálása

Fehérjék immobilizálása során a fehérjéket valamilyen szilárd felülethez rögzítjük kovalens kötéssel, vagy adszorpcióval. Ennek során azonban olyan változások történhetnek a fehérje szerkezetében, mely során az elveszítheti aktivitását. Kovalens kötés kialakításánál általában azt kell szem előtt tartani, hogy a fehérje aktív centrumát ne érintse a kötés, míg adszorpciónál számolnunk kell a fehérje esetleges denaturációjával.

A PDMS felületen az adszorpció és a fehérjeátrendeződés egyidejűleg játszódik le. Átrendeződés során a fehérjék térszerkezete meghajlik, megnyúlik, szétterül. Ezen folyamatok hajtóereje a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások a PDMS felülettel. Amennyiben adszorpcióval immobilizálunk fehérjét (enzimet), úgy fontos a fehérjeátrendeződés visszaszorítása az aktivitás megőrzése érdekében. Az adszorpciónak kedvező körülmények a magas fehérje koncentráció, ill. a közeg pH-jának izoelektromos pont körüli értéken tartása¹⁵.

Érdekes megjegyezni, hogy némely fehérje (pl. mioglobin) felületen való átrendeződését spektrofotometriával is lehet vizsgálni¹⁶. Eszerint a mioglobin esetében az UV spektrum megváltozását eredményezi a konformációs átrendeződés.

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

3.1. Felhasznált vegyszerek

Proteolitikus enzimként kísérleteimben tripszint (Sigma Aldrich) alkalmazunk. Az off-line fehérje bontás során lizozim mintát emésztettünk, az emésztéshez trifluorecetsavat (TFA), 1,4-ditiotreitol (DTT), jódecetsavat (IAA), ammónium-hidrogén-karbonátot, ill. hangyasavat alkalmaztunk (valamennyi VWR termék).

A tripszin aktivitásának vizsgálatához az S-2222 (Fermentas) kromogén szubsztrátot a DEOEC Biokémiai Intézetétől kaptuk.

A PDMS csipek előállítása során a nyers PDMS-t térhálósító adalékkal (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) 10:1 arányban elegyítjük, majd ebből 70 °C-on 1 óra alatt nyerjük a megszilárdult polimert.

3.2. Készülékek

Atomerő mikroszkóppal végzett méréseimhez egy Veeco diCaliber típusú készüléket használtam (2. ábra). Az AFM nagy felbontású, letapogatáson alapuló mikroszkópiai módszer. Egy konzol végén található kis tű segítségével tapogatja le a felszínt, úgy, hogy amennyiben a tű a felülethez közel ér, úgy a konzol enyhén meghajlik. Ekkor a tű felemelkedik, és a következő pontot kezdi el letapogatni. A folyamat eredményeképp a felület morfológiájáról nyerünk nagy felbontású képet.



2. ábra
Veeco diCaliber AFM készülék.

A felületen végbemenő folyamatokat felületi plazmon rezonancia spektroszkópiával (SPR) lehet vizsgálni¹⁷. A felületi plazmon, mint az adott fémszenzor (általában arany) felületével párhuzamosan terjedő elektromágneses hullám igen érzékeny a felület változásaira. A szenzort vékony (<100 nm) PDMS réteggel bevonva tudunk rajta adszorpciót vizsgálni. Kísérleteimet egy Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA) által gyártott Nicolet™ 6700 FT-IR spektroszkópon végeztem, melyhez egy SPRTM 100 modul volt kapcsolva.

További méréseimhez Hewlett Packard 8453 típusú spektrofotométert, Hewlett Packard ^{3D}CE típusú kapilláris elektroforézis készüléket (3. ábra), ill. Bruker Biflex III MALDI-TOF tömegspektrométert használtam.

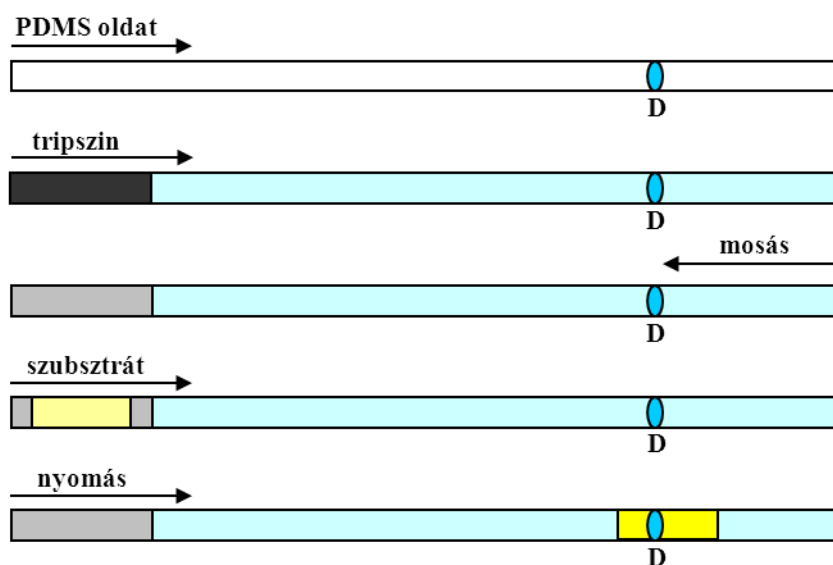


3. ábra
Hewlett Packard ^{3D}CE típusú kapilláris elektroforézis készülék.

3.3. On-line CE enzimreaktor készítése

Az általunk megtervezett rendszerben egy szeparációs CE kvarckapilláris első néhány cm-es szakasza szolgál reaktorként. A reaktor kialakításakor a következők szerint járunk el: a kapillárist 5 percig NaOH-dal, majd 5 percig vízzel öblítem, majd 1 m/m%-os hexános PDMS: térhálósító anyag (10:1) szuszpenziót áramoltatok a kapillárison 5 percen keresztül, 50 mbar nyomással. Ezután levegővel öblítem a kapillárist 5 percig, majd 1 órán át 70 °C-os kemencébe helyezem.

Ezután a kapilláris első részébe 0,1 mol/dm³ tripszin oldatot injektálok (az általam használt 37 cm hosszú kapillárisnál ez az injektálás 50 mbar alkalmazását jelentette 50 sec-ig), majd ezt hagyom állni 5 percig. Ezután az oldatban lévő tripszint eltávolítom a kapillárisból fordított nyomás alkalmazásával, és még 10 percig mosom a kapillárist vízzel, 50 mbar nyomáson. Az így nyert kapilláris bemeneti ~6 cm-es szakasza tartalmaz immobilizált tripszint, a szubsztrát/fehérje injektálása így ide történhet, majd 5 perc állást követően ismételt nyomás alkalmazásával detektálható a termék.



4. ábra

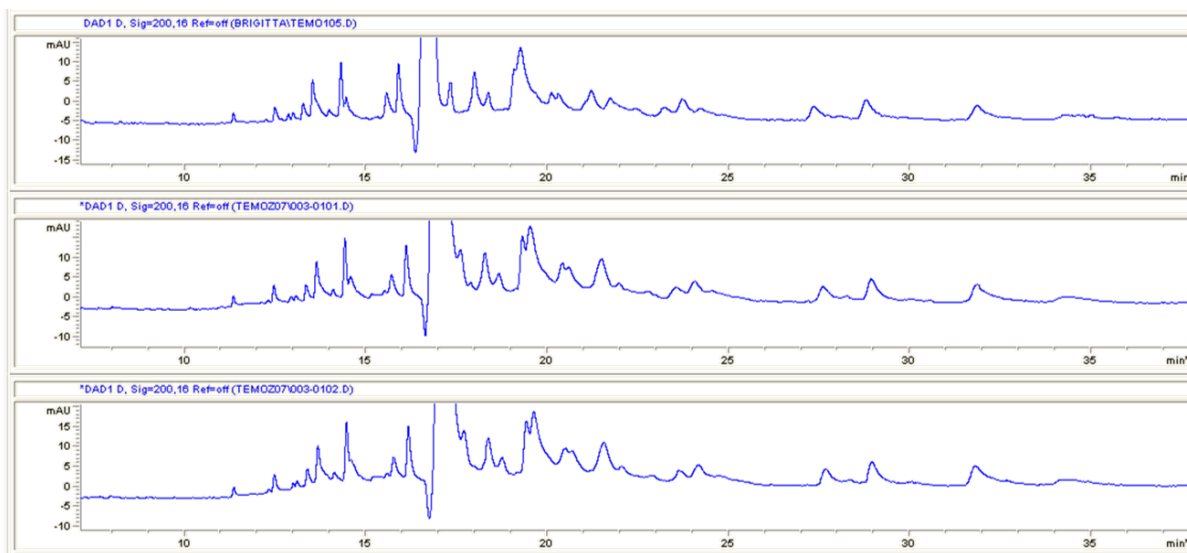
Az immobilizált tripszint tartalmazó kapilláris (on-line enzimreaktor) kialakításának sematikus ábrája.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

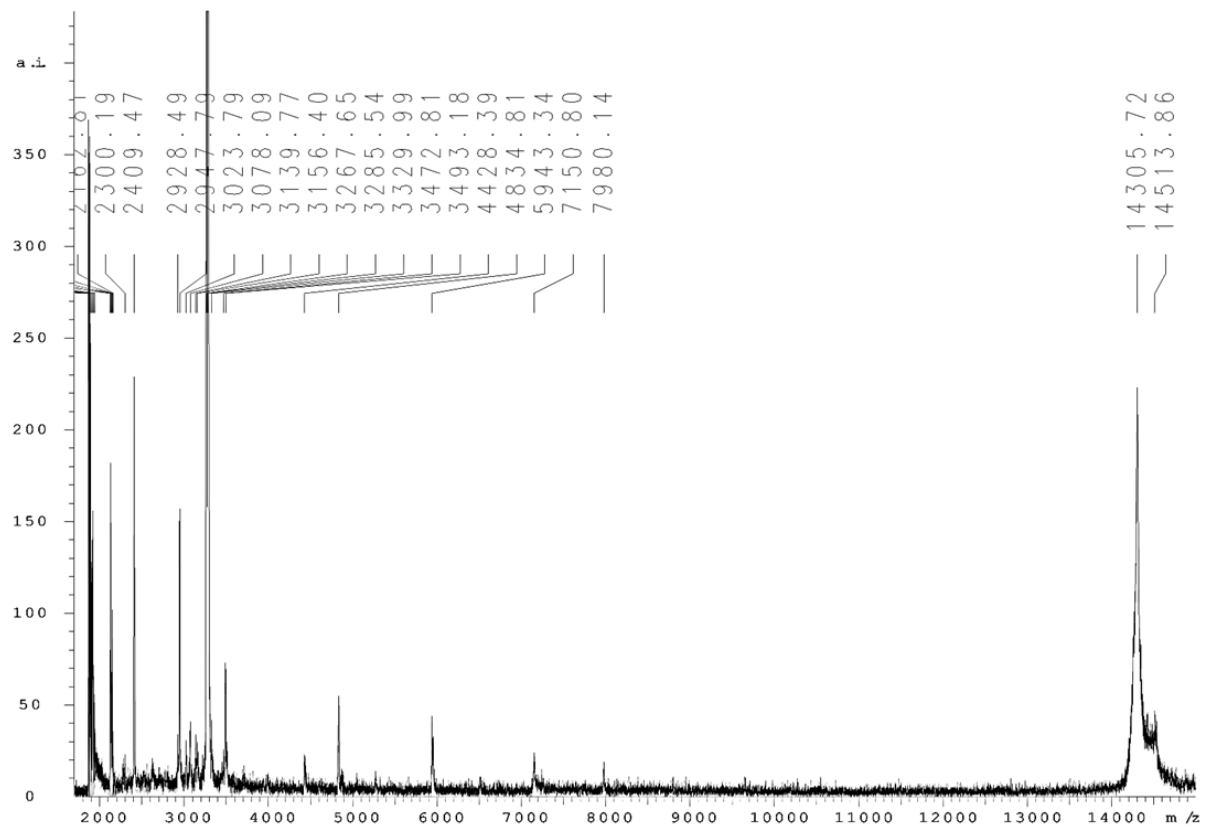
4.1. Peptidtérkép készítése off-line emésztést követően

Lizozim peptidtérkép vizsgálatához annak off-line emésztését végeztem el. Ennek során a lizozim 5 mg/ml koncentrációjú oldatát készítettem el 1 mmol/dm³ TFA oldatban. Ennek 10 µl-es részletéhez 30 µl 8 mol/dm³ karbamid oldatot adtam, majd az oldatot 30 percig hagytam állni szobahőmérsékleten. Ezután 4 µl 100 mmol/dm³ DTT oldatot adtam hozzá, ezután 1 óráig inkubáltam az elegyet 37 °C-on. A következő lépésben 4 µl 200 mmol/dm³ IAA oldatot adtam a rendszerhez, majd 45 percig sötétben állt. Az így kapott elegyhez 200 µl 25 mmol/dm³ NH₄HCO₃ oldatot adtam, végül tripszin 0,5 mg/ml koncentrációjú oldatának 10 µl-ét adtam az elegyhez. Mindezek után az emésztés 12 óra alatt zajlott le 37 °C-on. A reakció leállításához 25 µl 1%-os hangyasavoldat használható. Az emésztés során használatos segéganyagoknak a diszulfidhidak redukálásában, a fehérje térszerkezetének bontásában, ill. az enzim optimális működésében van szerepe.

Az így kapott peptidelegyből MALDI-TOF és CZE segítségével készítettem peptidtérképet. Az így kapott peptidtérképből a fehérje azonosítása számítógépes adatbázis alapján történhet.



5. ábra
CZE elektroferogram a lizozim off-line emésztését követően.

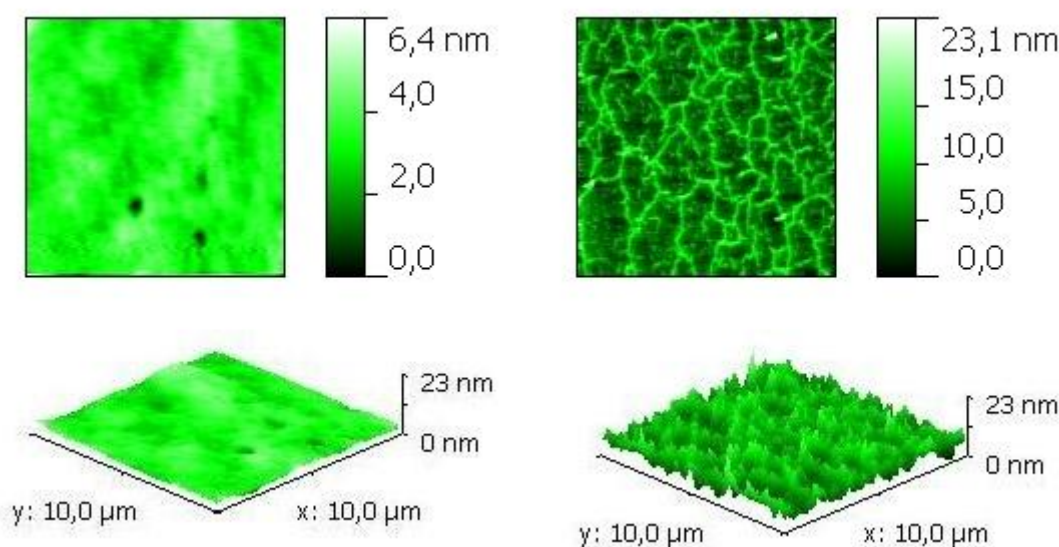


6. ábra
MALDI tömegspektrum a lizozim off-line emésztését követően.

4.2. Tripszin adszorpciója PDMS felületen

Az első lépés az enzimreaktor elkészítéséhez a tripszin adszorpciójának vizsgálata. Ez egyben a legsarkalatosabb kérdés is, hiszen a tripszinnek nem szabad oldatba kerülnie adszorpció után a felületről, azaz az adszorpciónak gyakorlatilag irreverzibilisnek kell lennie.

Első kísérletünkben vékony (~1 mm vastag) PDMS lapkát készítettünk, amit tripszin oldatba merítve előkezeltünk, majd alaposan vízzel leöblítettük. Az így nyert tripszin borítású PDMS lapkáról atomerő mikroszkóppal (AFM) készítettünk felvételeket.



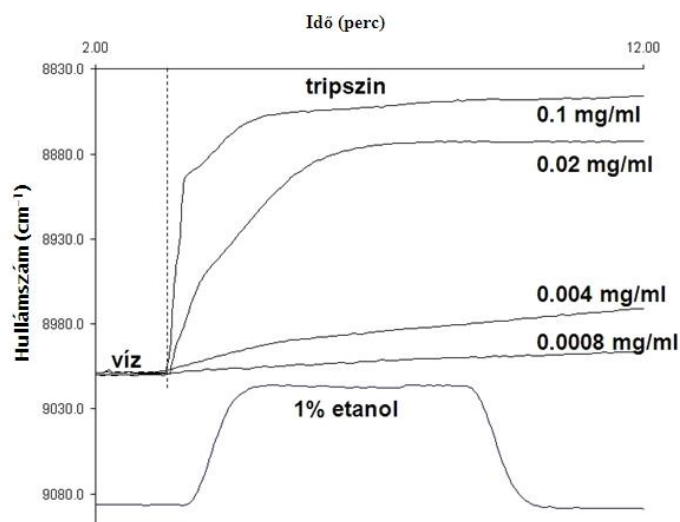
7. ábra

AFM felvételek egy tiszta, ill. egy tripszin oldatba merített és alaposan leöblített PDMS lapkáról.

Az adszorpció folyamatának valós idejű tanulmányozását SPR segítségével végeztem. Az SPR szenzort spincoater segítségével tudom 100 nm-nél vékonyabb PDMS réteggel bevonni. Ekkor 0,2 m/m% PDMS-t tartalmazó hexános szuszpenziót cseppentve a szenzorra oszlatom el a PDMS-t egyenletesen az arany felszínén.

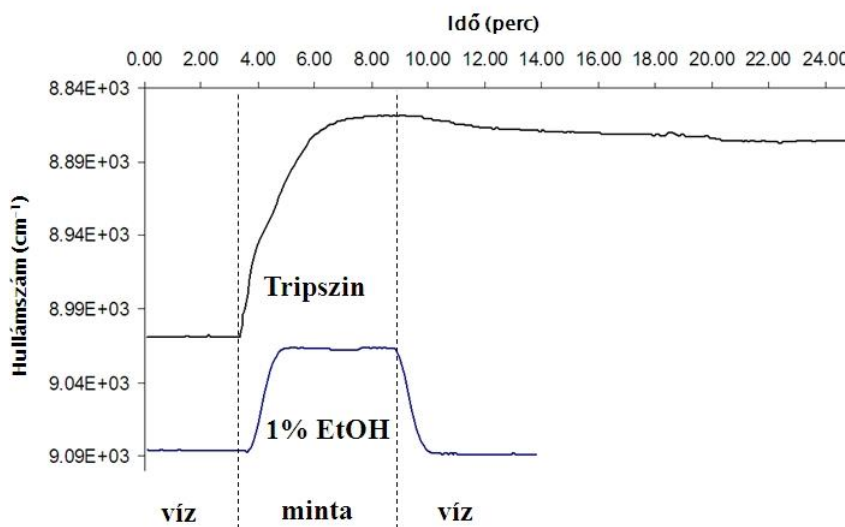
Látható, hogy amennyiben különböző koncentrációjú tripszin oldatokat áramoltatunk a felület fölött, úgy a telítés más értékeknél következik be (8. ábra). Ez a már említett fehérjeátrendeződési folyamatok miatt következik be, továbbá ez alapján tudtuk megállapítani, hogy a legkedvezőbb az 1 mg/ml koncentrációjú tripszin oldat használata az átrendeződés visszaszorításához. Elképzelhető továbbá, hogy a görbéken található töréspontok is az átrendeződés miatt jelentkeznek, ám ennek tisztázására még egyéb méréseket kell folytatnunk.

Amennyiben a tripszin injektálása és a felület telítése után vizet áramoltatunk a PDMS felületén, úgy látható, hogy még több mint 10 perc után sincs számottevő csökkenés a felületen kötött tripszin mennyiségében (9. ábra). Erre alapozva mondhatjuk, hogy a tripszin gyakorlatilag irreverzibilisen kötődik a PDMS felületéhez, így amennyiben megőrzi aktivitását, használható immobilizált enzimreaktorban.



8. ábra

Különböző koncentrációjú tripszin oldatok injektálása PDMS-sel bevont SPR szenzorra.

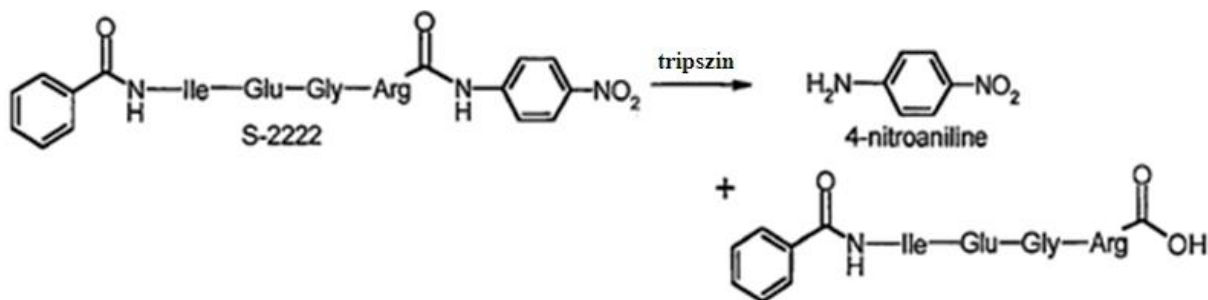


9. ábra

A tripszin injektálása utáni hosszas mosogatás hatása.

4.3. Tripszin aktivitásának vizsgálata

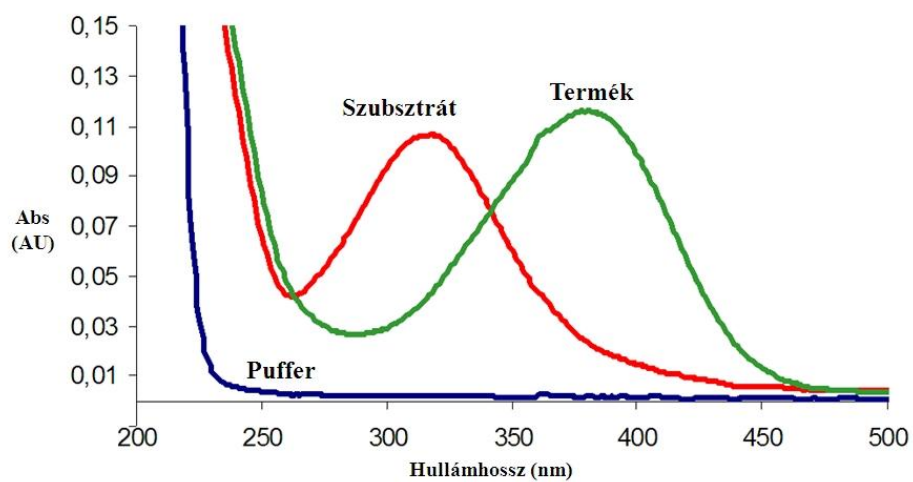
Tripszin aktivitását egyszerűen lehet vizsgálni valamilyen kromogén szubsztrát segítségével, amikor a tripszin hatására a szubsztrátból az oldat színváltozását okozó anyag szabadul fel. Ilyen az S-2222 nevű kromogén szubsztrát, amely az alábbi reakciót szenved el tripszin hatására:



10. ábra

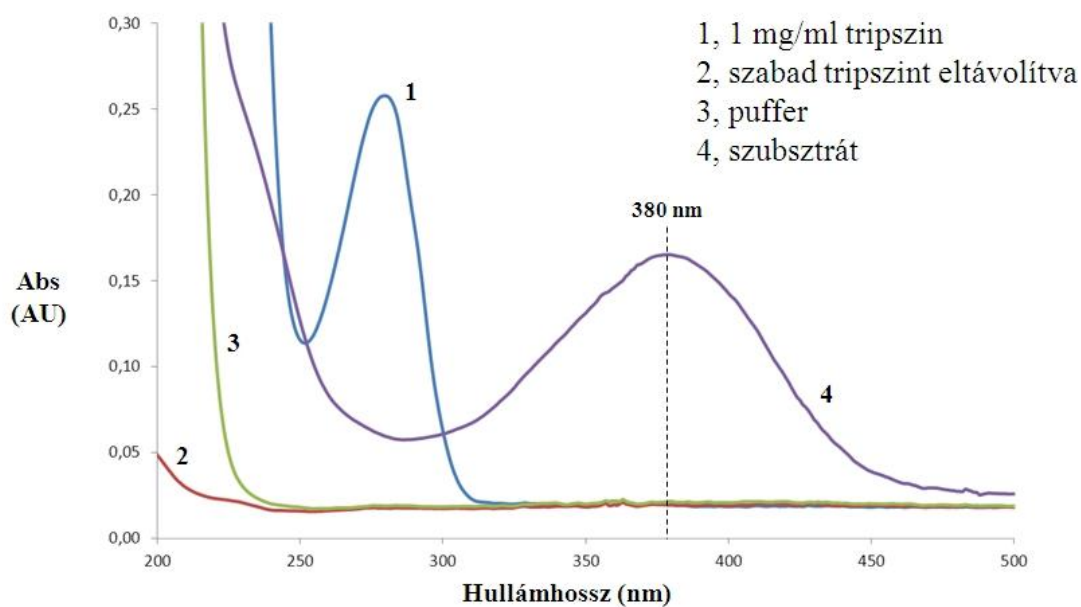
Tripszin hatására az S-2222 kromogén szubsztrátból p-nitroanilin szabadul fel, amitől az oldat sárga színűvé válik.

A reakciót spektrofotométerrel követve azt tapasztaljuk, hogy a szubsztrátnak és a terméknek más hullámhosszon van elnyelési maximuma (11. ábra). Saját rendszerünk modellezéseként egy kűvetta belső felületét vontam be vékony PDMS réteggel (hexános szuszpenzió segítségével), majd tripszin oldattal töltöttem meg. Ezután minden oldatban lévő tripszint eltávolítottam a kűvetta kiürítésével, majd hosszas vizes öblítésével. A következő lépésben pufferrel (Tris, pH=7,8) töltöttem meg a kűvetát, és ehhez adtam hozzá az S-2222 szubsztrátot. A lépésenként felvett spektrumokból (12. ábra) kitűnik, hogy az átalakulás megtörtént, hiszen a terméknek megfelelő adszorpciós maximum adódott. Az átalakulás folyamatát is tudjuk követni, amennyiben a felület telítését alacsony koncentrációjú tripszin oldattal végezzük.



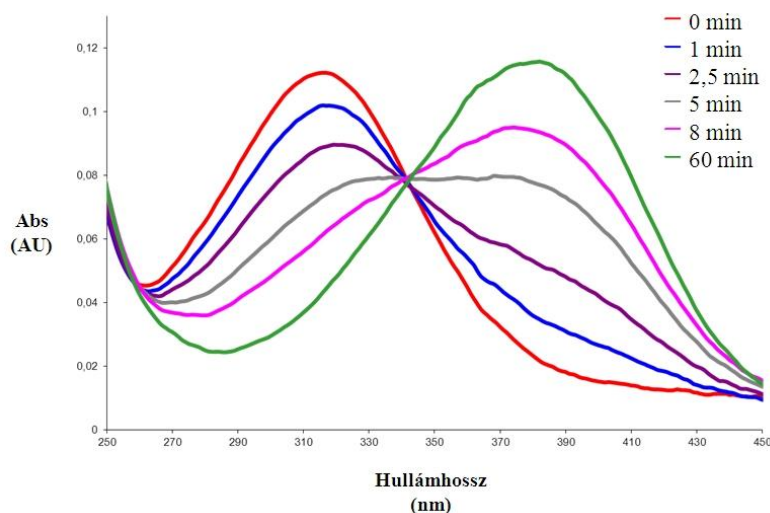
11. ábra

Az S-2222 kromogén szubsztrát bomlásának követése spektrofotometriásan.



12. ábra

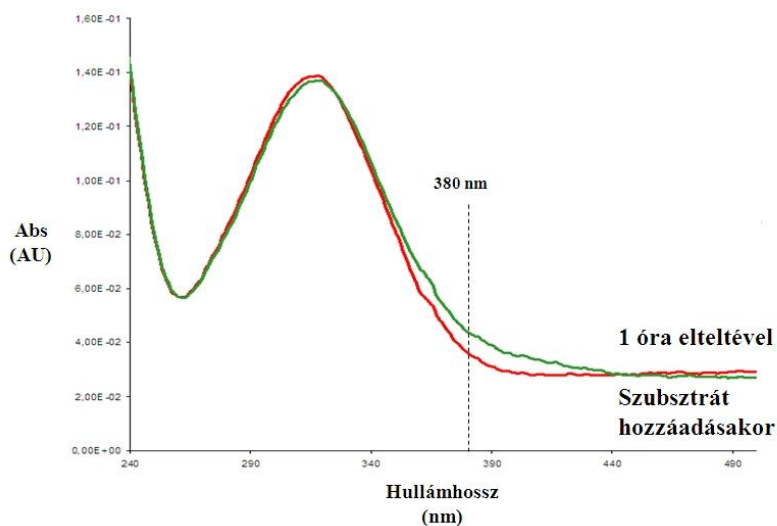
A PDMS felületére adszorbeálódott tripszin aktivitásának vizsgálata: a PDMS-sel bevont küvétát megtöltöttem 1 mg/ml tripszin oldattal (1), majd a szabad tripszint eltávolítottam (2), Tris pufferrel töltöttem meg a küvétát (3), majd az S-2222 szubsztrátot adtam hozzá (4).



13. ábra

Az S-2222 szubsztrát átalakulása a PDMS felületen megkötődött tripszin hatására, 0,1 µg/ml kiindulási tripszin oldatból végezve az adszorbeálást.

A szabad tripszin eltávolításának sikerességét kontrollméréssel ellenőriztem (14. ábra). Ekkor az öblítésre használt vízhez adtam a szubsztrátot, így amennyiben még maradt az oldatban szabad tripszin, úgy annak el kell, hogy végezze a szubsztrát emésztését. A szubsztrát hozzáadása után közvetlenül és az 1 órával később felvett spektrumok közti különbség minimális.



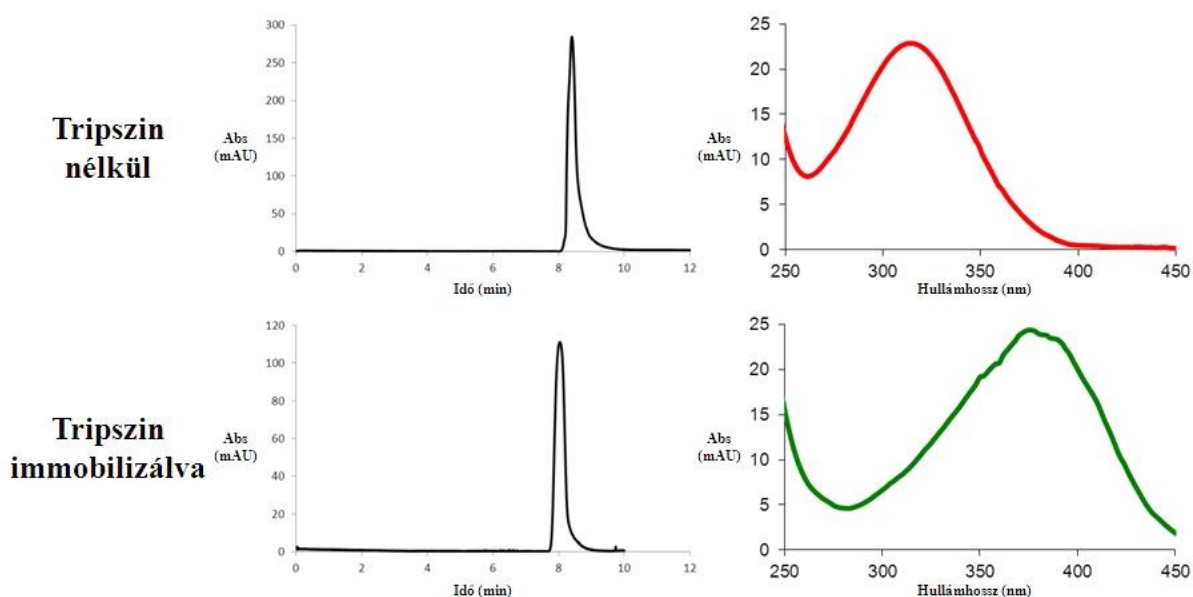
14. ábra

Szabad tripszin tartalom kontrollvizsgálata.

Mivel a tripszin megőrizte aktivitását a PDMS felületén, a megalkotott immobilizálási technika alkalmazható enzimreaktorokban.

4.4. Az on-line enzimreaktor működése

Az on-line enzimreaktor kialakítását már bemutattam a 3.3 fejezetben. A leírt módon a kapillárisban adszorbeált tripszin aktivitását a már említett S-2222 kromogén szubsztrát felhasználásával vizsgáltam. Egy tripszinmentes és egy tripszint tartalmazó kapillárisba injektáltam a szubsztrátot, majd 5 perc várakozás után nyomás segítségével az oldatot a kapilláris másik végéhez közel elhelyezett detektorhoz áramoltattuk. Az így kapott csúcs spektrumát vizsgálva megállapítottuk, hogy teljesen átalakult a szubsztrát az immobilizált tripszint tartalmazó kapillárisban.



15. ábra

A szubsztrát injektálása tripszin nélküli és tripszint tartalmazó küvettába (CE készülék).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Egy új, egyszerű tripszin immobilizálási eljárást sikerült kidolgoznom fehérjetérkép vizsgálatokhoz. Atomerő mikroszkópiás, felületi plazmon rezonanciás és spektrofotometriás vizsgálatokkal igazoltam, hogy a tripszin a hidrofób és porózus PDMS felületére gyakorlatilag irreverzibilisen adszorbeálódik. Az S-2222 kromogén szubsztrát segítségével bebizonyítottam, hogy a tripszin a PDMS felületen megkötve is megőrzi aktivitását.

Ezeket az eredményeket felhasználva egy olyan immobilizált enzimreaktort alakítottam ki, amely csupán nanoliternyi térfogatú mintamennyiséget (fehérjét) igényel és rövid idő alatt végez emésztést. Mivel az általunk használt szubsztrátot sikerült 5 perc alatt bontani az immobilizált tripszint is tartalmazó (PDMS-el bevont) szeparációs kapillárisban, ezért valószínűleg fehérjéket is rövid idő alatt tudunk bontani a kapillárisban immobilizált enzim segítségével. Ennek gyakorlati megvalósítása jövőbeli terveink közé tartozik, mint ahogy az emésztés során kapott peptidelegy elektroforetikus elválasztása és a peptidtérkép elkészítése is.

A PDMS-sel bevont CE kapillárisokban végrehajtott emésztéses kísérletek mellett a jövőben szeretnénk az immobilizálási eljárást mikrofluidikai csipekben is alkalmazni. Mivel a kutatócsoportunkban előállított mikrofluidikai csipek alapanyaga PDMS, így az enzimreaktor kialakítása az ilyen mikrocsipekben kézenfekvő. A mikrofluidikai csipeket MALDI-MS-hez kapcsolva szeretnénk peptidtérképek felvételét elkészíteni, így a csipben történő emésztést követően a peptidelegy közvetlenül a MALDI mintatartó lemezére kerülne. További előnye ennek a technikának a mikrofluidikai csipek változatos mintázata, ami miatt egyidejűleg több minta emésztése is lehetséges, jelentősen gyorsítva az elemzési sebességet.

Eredményeim egy részét tudományos közleményben¹⁸ is közreadtuk.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Krenková, J., Klepárník, K., Foret, F.; *J. Chromatogr. A* 2007, 1159:110-118.
2. Gao, J., Xu, J., Locascio, L. E., Lee, C. S.; *Anal. Chem.* 2001, 73:2648-2655.
3. Cooper, J. W., Chen, J., Li, Y., Lee, C. S.; *Anal. Chem.* 2003, 75:1067-1074.
4. Ye, M., Hu, S., Schoenherr, R. M., Dovichi, N. J.; *Electrophoresis* 2004, 25:1319-1326.
5. Wu, H., Zhai, J., Tian, Y., Lu, H., Wang, X., Jia, W., Liu, B., Yang, P., Xu, Y., Wang, H.; *Lab Chip* 2004, 4:588-597.
6. Nicoli, R., Gaud, N., Stella, C., Rudaz, S., Veuthey, J.-L.; *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2008, 48:398-407.
7. Xu, F., Wang, W.-H., Tan, Y.-J., Bruening, M. L.; *Anal. Chem.* 2010, 82:10045-10051.
8. Wu, H., Zhai, J., Tian, Y., Lu, H., Wang, X., Jia, W., Liu, B., Yang, P., Xu, Y., Wang, H.; *Lab Chip* 2004, 4:588-597.
9. Sakai-Kato, K., Kato, M., Toyo'oka, T.; *Anal. Chem* 2002, 74:2943-2949.
10. Ota, S., Miyazaki, S., Matsuoka, H., Morisato, K., Shintani, Y., Nakanishi, K.; *J. Biochem. Biophys. Methods* 2007, 70:57-62.
11. Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N., Hahn, J. H.; *Electrophoresis* 2003, 24:3607-3619.
12. Wu, D., Zhao, B., Dai, Z., Qin, J., Lin, B.; *Lab Chip* 2006, 6:942-947.
13. Huang, B., Wu, H., Kim, S., Zare, R. N.; *Lab Chip* 2005, 5:1005-1007.
14. Thangawng, A. L., Ruoff, R. S.; *Biomed Microdevices* 2007, 9:587-595.
15. Chumbimuni-Torres, K. Y., Coronado, R. E., Mfuh, A. M., Castro-Guerrero, C., Silva, M. F., Negrete, G. R., Bizios, R., Garcia, C. D.; *RSC Advances* 2011, 1:706-714.
16. Anderson, A. B., Robertson, C. R.; *Biophys. Journal* 1995, 68:2091-2097.
17. Mrksich, M., Sigal, G. B., Whitesides, G. M.; *Langmuir* 1995, 11:4383-4385.
18. Gaspar, A., Kecskemeti, A., Gomez, F. A.; *Electrophoresis*, 2012, közlésre elfogadva.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Gáspár Attila egyetemi docensnek, a munkámhoz nyújtott segítségét, türelmét.

Köszönettel tartozom Dr. Hegedűs Csabának, a DEOEC Fogorvostudományi Kar dékánjának és Bakó Józsefnek, akik lehetővé tették az SPR méréseket.

Hálával tartozom Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek értékes tanácsaiért és a MALDI-TOF felvételekért.

Köszönet illeti Dr. Szabó Istvánt és Csarnovics Istvánt az AFM felvételekért.

Továbbá köszönöm a CETOX Kft.-nek, hogy biztosította a kutatásaimhoz szükséges eszközparkot.

Anyagi támogatásban részesültem a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 pályázat által, amiért szintén hálás vagyok.