



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

**Mikrocseppentésen alapuló immobilizációs eljárás fejlesztése
nagy hibridizációs hatékonyságú peptid-nukleinsav biochipek
előállítására**

**OTDK
dolgozat**

“A tudományos kutatás megnyugtató terület erkölcsi szempontból a felfedezés öröme miatt, mert még akkor is, ha az kevés gyakorlati jelentőséggel bír, ott az érzés, hogy minden új tudást végérvényesen az emberiség számára szerzünk.”

/Irène Joliot-Curie/

Készítette:

Simon László Ferenc

I. éves Vegyészmérnök MSc hallgató

Témavezető:

Dr. Gyurcsányi E. Róbert

Egyetemi docens

Kutatócsoport-vezető, MTA-BME „Lendület” Kémiai Nanoérzékelők Kutatócsoport

Konzulens:

Dr. Lautner Gergely

Egyetemi tanársegéd

Budapest,

2014.

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1	PEPTID-NUKLEINSAV FELISMERŐ SZÁL	6
2.1.1	<i>PNS szál szerkezete.....</i>	<i>7</i>
2.1.2	<i>PNS szálak alkalmazásának további lehetőségei</i>	<i>8</i>
2.1.3	<i>PNS szálak immobilizációjának lehetőségei.....</i>	<i>10</i>
2.2	SZÍVINFARKTUS BIOMARKER, HSA-MiR-208A MIKRORNA	12
2.3	KÉPALKOTÓ FELÜLETI PLAZMON-REZONANCIÁS MÓDSZER	13
2.3.1	<i>A felületi plazmon-rezonanciás mérés elméleti alapja</i>	<i>14</i>
2.3.2	<i>Az SPRi készülék mérési elrendezése.....</i>	<i>17</i>
2.3.3	<i>Biomolekuláris kölcsönhatások kinetikájának meghatározása</i>	<i>18</i>
3	KÍSÉRLETI RÉSZ.....	24
3.1	ALKALMAZOTT VEGYÜLETEK ÉS OLDATOK.....	24
3.2	ALKALMAZOTT MŰSZEREK ÉS ESZKÖZÖK	25
3.3	MÓDSZEREK ÉS ELJÁRÁSOK	28
3.3.1	<i>PNS szenzorchippek előállítása.....</i>	<i>28</i>
3.3.1.1	<i>A PNS szálak mikrocseppentésének előkészítése.....</i>	<i>29</i>
3.3.1.2	<i>PNS felismerő szálak immobilizálása a planáris arany felületre</i>	<i>29</i>
3.3.2	<i>Képalkotó SPR mérések.....</i>	<i>31</i>
4	KÍSÉRLETI MUNKÁIM EREDMÉNYEI ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	33
4.1	A PNS SZENZORCHIP ELŐÁLLÍTÁSÁNAK OPTIMÁLÁSA.....	35
4.1.1	<i>A nem-specifikus adszorpciónak ellenálló referencia felületek kialakítása</i>	<i>35</i>
4.1.2	<i>Különböző PNS szálak előzetes vizsgálata</i>	<i>36</i>
4.1.3	<i>PNS szálak immobilizációjának vizsgálata</i>	<i>37</i>
4.1.4	<i>A mikrocseppentésre alkalmazott tű hatása a PNS szálak hibridizációs hatékonyságára</i>	<i>41</i>
4.1.5	<i>Inkubálási idő vizsgálata</i>	<i>42</i>
4.1.6	<i>A módszerfejlesztés során elért kimutatási határ javulás.....</i>	<i>45</i>
4.2	MÉRÉSI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA.....	47
4.2.1	<i>Mérés során alkalmazott puffer ionerősségének hatása a hibridizációra.....</i>	<i>47</i>
4.2.2	<i>PNS szálak szelektivitásának vizsgálata</i>	<i>49</i>

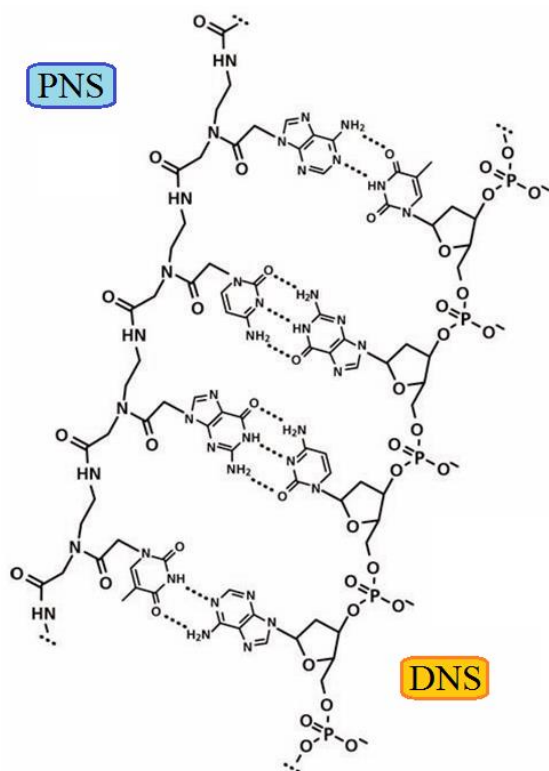
4.3	A MÓDSZER ELŐNYEINEK A BEMUTATÁSA	52
4.3.1	<i>Elérhető maximális törésmutató változás (R_{max}) értékének meghatározása</i>	<i>52</i>
4.3.2	<i>Kalibrációs görbének a meghatározása az R_{max} ismeretében</i>	<i>55</i>
4.3.3	<i>Felületi PNS sűrűség meghatározása.....</i>	<i>56</i>
4.4	KINETIKAI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA HAGYOMÁNYOS MÓDSZERREL	58
4.5	FORDÍTOTT-KINETIKAI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA	63
5	ÖSSZEFOGLALÁS ÉS TOVÁBBI TERVEIM.....	66
6	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	68
7	IRODALOMJEGYZÉK	69
8	MELLÉKLETEK.....	74
	1. SZÁMÚ MELLÉKLET: NUKLEINSAV KÖLCSÖNHATÁSOK	
	2. SZÁMÚ MELLÉKLET: SZENZORCHIP CSEPPENTÉSI TERVE	
	3. SZÁMÚ MELLÉKLET: EGYENSÚLYI ÁLLANDÓ MEGHATÁROZÁSA KÜLÖNBÖZŐ PNS SZÁLAKRA	

Napjainkban egyre nő az igény a különböző biomarkerek felismerésére alkalmas szelektív receptorok iránt, a célmolekulák (*analát*) meghatározásának optimalására, illetve kötődési kinetikájának vizsgálatára a későbbi bioanalitikai alkalmazásuk érdekében. A molekuláris felismerés alapja, hogy a célmolekula és a felismerő molekula között jól definiálható, általában nem kovalens jellegű kölcsönhatások jönnek létre, amelynek szelektivitását a legtöbb esetben a két molekula tér-, és funkcionalitásbeli komplementaritása biztosítja.

A természetben számos ilyen kölcsönhatás figyelhető meg, amelyek közül az egyik legismertebb a nukleinsavakban található szerves bázisok között kialakuló H-híd. Két komplementer nukleinsav szál között (legyen az akár DNS vagy RNS) rendkívül specifikus és nagy affinitású kölcsönhatás alakulhat ki, amelynek erősségét növeli a komplementer bázisok száma. Ugyanakkor, a nukleinsavak negatív töltése között kialakuló elektrosztatikus taszítás jelentősen gyengíti ezt a kölcsönhatást, illetve a szelektív felismerést biztosító szálak könnyen elbomlanak nukleáz enzimek jelenlétében.

A nukleinsav szenzorok fejlesztésénél, ahol tipikusan nagyon kis nukleinsavak mennyiséget kell meghatározni (akár néhány attomólos koncentrációkat) és ahol a tárolhatóság a lebontó enzimek miatt egy igen fontos szempont, a természetes nukleinsav felismerő szálak alkalmazása nem mindig célravezető. Az elmúlt időszakban azonban számos olyan szintetikus oligonukleotid analógot fejlesztettek ki, amelyek tulajdonságai több szempontból is előnyösebbek a természetes nukleinsavakénál [1][2][3].

Ezen szintetikus felismerő szálak előnyös tulajdonságait a DNS szál vázának szerkezeti módosításával érték el. Így például a dezoxiribóz-foszfát váz N-(2-aminoetil)-glicin egységekből álló, „*semleges töltésű*” peptid láncra cserélésével egy nagyobb affinitású szintetikus DNS analóg, nevezetesen peptid-nukleinsav (PNS, angolul *Peptide Nucleic Acid*) [4] állítható elő. A PNS szálak esetében a bázisok metilénkarbonil kötésen keresztül kapcsolódnak a peptid alapú vázhoz (1. ábra).



1. ábra – PNS és DNS molekulák szerkezete és a hibridizációjuk során kialakuló H-híd kölcsönhatások.

Kutatócsoportunk egyik hosszú távú fejlesztési célja a nukleinsav alapú biomarkerek szelektív meghatározására alkalmas érzékelők fejlesztése, különös tekintettel a mikroRNS (microRNA, micro Ribonucleic Acid) molekulák meghatározására. Az utóbbi időszakban a mikroRNS szálak meghatározása kiemelt figyelmet kapott tekintettel arra, hogy nagyon sok betegség esetében (a teljesség igénye nélkül többek között daganatos, szív-, és érrendszeri, idegrendszeri, valamint autoimmun) összefüggést találtak a mikroRNS koncentráció és a betegség jelenléte között [5][6][7][8][9]. A PNS felismerő szálak választása sok szempontból ideális lehet a mikroRNS-ek meghatározására, hiszen jelentősen nagyobb affinitással és (bio)kémiai stabilitással rendelkeznek, mint a természetes nukleinsav molekulák.

Célkitűzésem az volt, hogy komplementer szekvenciájú peptid-nukleinsav – mikroRNS szálak kötődési kinetikáját és a kötődés erősségét jellemző disszociációs egyensúlyi állandót meghatározzam, illetve több receptor szál szimultán vizsgálatára alkalmas képalkotó felületi plazmon-rezonanciás (SPRi - Surface Plasmon Resonance imaging) módszert kidolgozzam. Az SPRi az egyik legalkalmasabb módszer heterogén fázisú biomolekuláris kölcsönhatások megfigyelésére [10], amellyel jelölésmentesen (*label-free method*) akár 10^{-7} nagyságrendű törésmutató változás is valós időben követhető nyomon.

Célvegyületként egy új, az orvosi irodalomban szívinfarktus biomarkerként azonosított 22 bázis hosszú, mikroRNS szálát alkalmaztam. A párhuzamos vizsgálatok előfeltételét képezte, hogy mikrocseppentéssel PNS szenzorchipet állítsak elő, amelynek a legkézenfekvőbb módja a tiol-végcsoporttal ellátott PNS szálak cseppentése az SPRi szenzorchip arany felületére. A PNS szálak Au-S kötésen keresztül, önszerveződő (*self-assembly*) módon [11] kötődnek az arany felülethez, PNS monoréteg kialakításával. Ugyanakkor, korábbi megfigyeléseink [12] és irodalmi adatok szerint ez az eljárás általában nem biztosít megfelelő hibridizációs hatékonyságú PNS felületet, mert a PNS szálak nem-specifikusan is adszorbeálódnak arany felületen, így ezeknek a szálaknak a hibridizációja gátolt. Ennek megfelelően a PNS szálak esetében az említett, közvetlen arany felülethez való immobilizációt nem szokták alkalmazni, bár kétségtelenül ez lenne a legegyszerűbb és legköltséghatékonyabb módja az immobilizációnak.

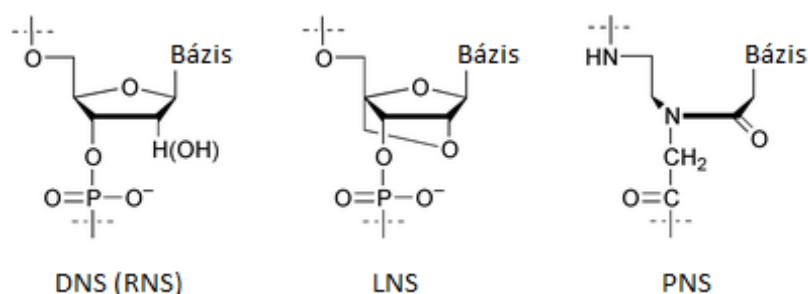
Ezt megoldandóan egy új immobilizációs eljárást vezettünk be és tanulmányoztunk részletesen, amelynek lényege, hogy a felismerő PNS szálakat a vele komplementer DNS szállal előhibridizált formában kötjük a felülethez. Hipotézisünk az volt, hogy a hibridizált PNS bázisai kisebb mértékben tudnak nem-specifikus kölcsönhatással az arany felülethez kötődni és a hibridizált PNS alkalmazásával spontán módon alakul ki az optimális felületi PNS receptor-sűrűség is. Mindez biztosítja a nagyobb hibridizációs hatékonyságot. A hipotézisünket alátámasztja Li és Rothberg megfigyelése [13], miszerint az egyszálú DNS szálak erősen adszorbeálódnak arany részecskéken, míg a kettősszálú DNS szálak nem. Erre ők azt az intuitív magyarázatot adták, hogy a kettős szálú DNS (dsDNA, *double-stranded Deoxyribonucleic Acid*) esetében a bázisok funkciós csoportjai a komplementer bázisok közötti H-híd kölcsönhatás kialakításában vesznek részt és így kevésbé tudnak kölcsön hatni az arany felülettel, mint a flexibilis egyszálú DNS-ek (ssDNA, *single-stranded Deoxyribonucleic Acid*). Nehézséget jelent tehát, hogy a PNS szálak a semleges töltésüknek köszönhetően a DNS molekuláknál is erősebben adszorbeálódnak nem-specifikusan a szenzorchip arany felületére.

Összefoglalva, kutatómunkám célja nagy hibridizációs hatékonyságú peptid-nukleinsav alapú szenzorchip kifejlesztése és tesztelése volt képző felületi plazmon-rezonanciás módszer segítségével a modellként választott szívinfarktus biomarker szelektív meghatározására. Az általunk kidolgozott, mikrocseppentésen alapuló immobilizációs módszer szándékaink szerint lehetőséget ad PNS felismerő molekulák kölcsönhatási kinetikájának a korábbi eljárásoknál egyszerűbb és pontosabb meghatározására.

2.1 Peptid-nukleinsav felismerő szál

A nukleinsav szenzorok az esetek döntő többségében hibridizációs felismerésen alapulnak, amikor egy immobilizált felismerő szál szelektíven kötődik a komplementer célvegyülethez a Watson-Crick bázispárosodás szabályainak megfelelően [14]. A szintetikus nukleinsav felismerő szálak fejlesztésének fő motivációját a természetes nukleinsavak szerkezeti és (bio)kémiai stabilitásának javítása, illetve a nagyobb affinitás megvalósításának igénye jelenti. Ennek megfelelően több szintetikus nukleinsav analóg is kifejlesztésre került, amelyekben általában a dezoxiribonukleinsav váz módosul, de a módosítás alkalmazható az internukleotid kötés mellett a pentózra és a bázisra is [15][16][17][18][19]. Általában a fejlesztések háttérében a terápiás alkalmazások álltak (pl. géncsendesítés), ahol a biológiai környezetben mindig jelenlevő nukleázok miatt a természetes nukleinsavak nem stabilisak. Ennek megfelelően ezek kémiai módosítása minden esetben szükséges a molekulák nukleáz rezisztenciájának növeléséhez és a sejtbe való bejutáshoz.

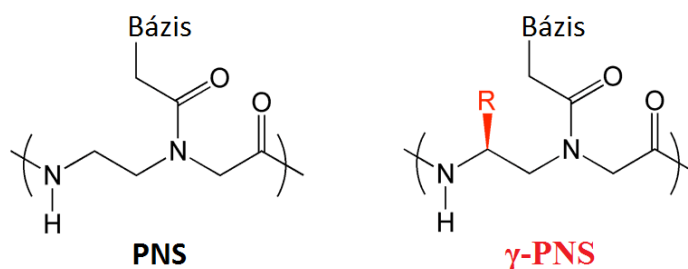
Az egyik legnépszerűbb szintetikus DNS analóg a peptid-nukleinsav [20], amelynek a váza N-(2-aminoetil)-glicin egységekből épül fel [21]. Ezen a peptid vázon egymástól megfelelő távolságra helyezkednek el a bázisok, amelynek köszönhetően a természetes DNS-hez hasonlóan Watson-Crick bázispárosodással kötődnek a nukleinsavakhoz.



2. ábra – DNS (RNS), LNS és PNS molekulák szerkezete.

A szelektív felismeréshez számos lehetőség közül (2. ábra) egy másik alternatíva az ún. lakatolt-nukleinsav (LNS, angolul Locked Nucleic Acid) szál használata [1]. A molekula

jellegzetessége, hogy a 2'O és 4'C atomjai között mesterségesen kialakított keresztkötésnek köszönhetően igen stabil szerkezetű [2], merev vázú, így hibridizációkor nagyon stabil kölcsönhatást tesz lehetővé a komplementer nukleinsav szálakkal [22]. További lehetőség a γ -PNS szálak alkalmazása [23], melyben az aminosav monomer oxo-csoportjától gamma-helyzetben lévő C-atomra szintetizálnak különböző szubsztituenseket (például hidroxil-, vagy metil-csoportot) (3. ábra), amelynek köszönhetően stabilabb hibridizációs komplex kialakítására lesz képes.



3. ábra – A PNS és γ -PNS szálak szerkezete.

2.1.1 PNS szál szerkezete

A dezoxiribóz-foszfodiészter váz lecserélése egy N-(2-aminoetil)-glicin monomerekből felépülő peptid láncre, fiziológias pH-n semleges, esetenként részlegesen pozitív töltésű felismerő szálal eredményez a polianion DNS szál helyett. Ennek hatására a hibridizáció során nem alakul ki elektrosztatikus taszítás a PNS szál és a komplementer nukleinsavak között. Ennek több előnyös következménye van a PNS és komplementer szekvenciájú nukleinsav közötti hibridizációra, így:

- A PNS és a komplementer nukleinsavak között kialakuló kölcsönhatás erősebb, mint az azonos hosszúságú és szekvenciájú természetes nukleinsavakkal történő hibridizáció során kialakuló kölcsönhatás [24]. Hibridizációs *assay*-ek esetében, amennyiben nem a detektálás érzékenysége vagy a nem-specifikus adszorpció határozza meg a kimutatási határt, akkor minél kisebb a kettős szál disszociációs egyensúlyi állandója, annál kisebb kimutatási határ érhető el.
- A komplementer szálak közötti kölcsönhatás erőssége gyakorlatilag független az oldat ionerősségétől, hiszen nem szükséges leárnýékolnunk a negatív töltések taszító hatását.
- A PNS felismerő szálak alkalmazásával jobb diszkrimináció (megkülönböztethetőség) érhető el az egy hibahelyet tartalmazó (*single base mismatch*) nukleinsavakkal szemben is, azaz nagyobb szelektivitást biztosít, mint a természetes szálak.

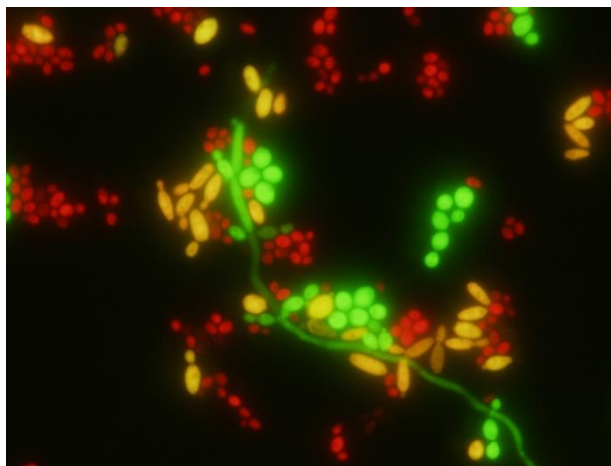
A PNS kémiai és biológiai is ellenállóbb [25], azaz savval, lúggal, nukleáz enzimekkel szemben is nagyobb rezisztenciát mutat, mint a természetes nukleinsavak, valamint sokkal stabilabb kölcsönhatás érhető el vele a hibridizációkor [24]. Szintézisük során egyre nagyobb a valószínűsége a részleges önhibridizációnak és a méretük növekedésével vízdékonyságuk is csökken, így jellemzően maximum 18 bázis hosszú PNS szálakat alkalmaznak, viszont a komplementer nukleinsavakkal alkotott stabilabb komplexek eredményeképpen akár rövidebb PNS szálak is megfelelő stabilitású kettős szálakat eredményeznek.

2.1.2 PNS szálak alkalmazásának további lehetőségei

A szintetikus oligonukleotid analógok alkalmazását megelőzően a nukleinsavak felismerésére kifejlesztett módszerek megbízhatóságát a természetes eredetű felismerő szálak instabilitása és hibridizációs képességeiknek határa szabta meg. A PNS szálak előnyös tulajdonságainak köszönhetően egyre több módszerben használják őket, így például lehetőséget ad teljes sejt analízisre (WCA – Whole Cell Analysis) [26]. Ebben az esetben a PNS szál végére kötött fluoreszcens-csoportnak köszönhetően a hibridizáció a sejten belül (*in-situ*) nyomon követhető (FISH – Fluorescence In-Situ Hybridization) [27].

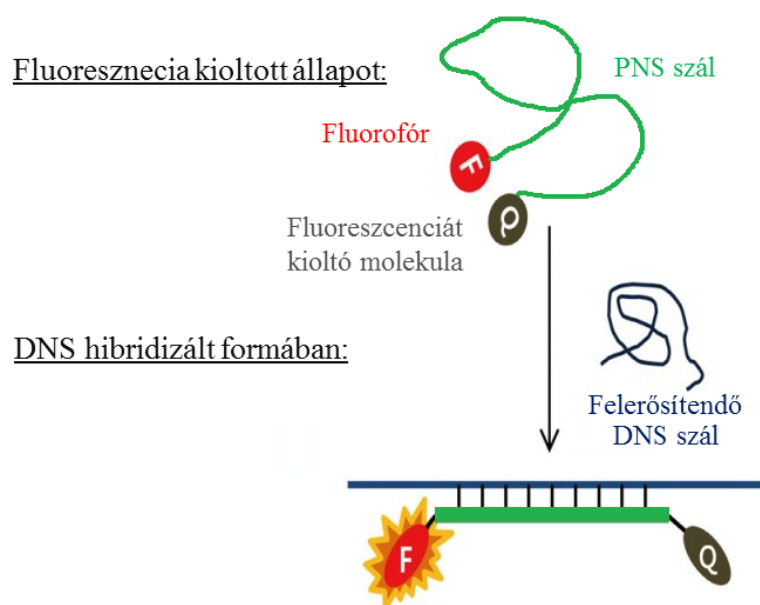
Ismeretes, hogy a baktériumok és élesztő gombák nagy mennyiségben állítanak elő faj-specifikus riboszómális RNS (rRNS – ribosomal RNA) és hírvivő RNS (mRNS – messenger RNA) molekulákat, amelyek a sejten belül helyezkednek el. Ezen humán patogének vizsgálatához korábban szükséges volt a sejtek lizálása (a sejtek felbontása oly módon, hogy a felszabaduló DNS valamint RNS molekulák roncsolódás nélkül oldatba kerüljenek), hiszen csak így léphetnek az analát molekulák kölcsönhatásba a felismerő molekulákkal. A PNS szálak azonban képesek a foszfolipid kettős rétegen keresztüljutni anélkül, hogy bármiféle strukturális változást idéznének elő a sejten, és hibridizálni a komplementer szekvenciájú rRNS vagy mRNS molekulákkal.

Amennyiben a különböző szekvenciájú PNS szálakat eltérő fluoreszcens csoporttal jelölnék meg, amelyek elkülöníthető hullámhosszon emittálnak, akkor egy fluoreszcens mikroszkóp alkalmazásával feltérképezhető a sejt genetikai állománya, struktúrája, és a faj-specifikus RNS-eknek köszönhetően a bakteriális kórokozók és élesztőgombák gyors, és pontos azonosítására nyílik lehetőség (4. ábra). A módszer hasonló a pozitív és negatív Gram-festéshez, ám annál sokkal több információt nyerhetünk a sejt struktúrájának és genetikai állományának feltérképezésével.



4. ábra – Fluoreszcencia mikroszkópiás kép az egyes sarjadzógombák kimutatásakor különböző színű (hullámhosszon emittáló) fluoreszcens csoportokkal jelölt PNS szálak alkalmazásával. *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* (zöld), *Candida tropicalis* (sárga), *Candida glabrata* és *Candida krusei* (piros) [28].

A PNS szálaknak egy másik, igen izgalmas alkalmazhatósága a polimeráz láncreakciók valós idejű, mennyiségi nyomon követése (qPCR – *quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*) [29][30]. PCR amplifikálás (polimeráz enzimmal végzett láncreakció sokszorosítása a nukleinsav szálaknak) során célunk, hogy egy bizonyos szekvenciájú nukleinsav molekulából szelektív módon többet állítsunk elő, azonban az amplifikálás mennyiségi nyomon követése meglehetősen nehézkes. Egy alkalmas módszerben olyan, fluoreszcens csoporttal jelölt PNS felismerő szálakat használnak, amely PNS szálak másik végére egy fluoreszcenciát kioltó molekulát raknak (molekuláris villogó, angolul *molecular beacon*) (5. ábra).



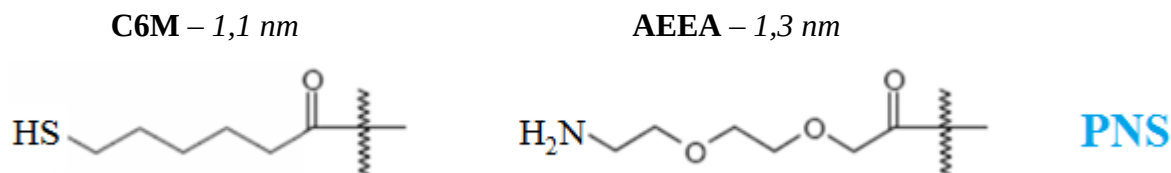
5. ábra – A qPCR amplifikálás során a PNS szálra kötött fluorofór-, és fluoreszcenciát kioltó csoportoknak köszönhetően a DNS szál mennyiségének növekedése valós időben nyomon követhető a hibridizáció során kialakuló fluoreszcencia megfigyelésével [30].

A hosszú PNS szál részleges önhibridizációja során nem mérhetünk fluoreszcens jelenséget, hiszem a fluorofór („F” – fluoreszkáló molekula, vagy annak egy része, amely a fény kibocsátásáért felelős, angolul *Fluorophore*) közel kerül a fluoreszcenciát kioltó („Q” – *Quenching*) molekulához.

A DNS szál sokszorosítása során felmelegítjük a reakcióelegyet, így egyre több, a PNS-sel komplementer szekvenciájú DNS szál kerül az oldatba. A qPCR hőmérsékletprogramjának hűtési szakaszában a PNS-DNS komplex olvadáspontja alatti hőmérsékletre hűl a közeg, így a PNS és DNS szálak hibridizálnak egymással. Ennek következtében a PNS szál kiegyenesedik, így a fluoreszcenciát kioltó molekula távol kerül a fluorofórtól, amelynek fluoreszcenciája ezáltal mérhetővé válik. Minél több a DNS szál van az oldatban, annál intenzívebb fluoreszcencia mérhető, így valós időben nyomon követhető az adott szekvenciájú DNS szál sokszorosítása. Igen érzékeny meghatározásról van szó, hiszen a mérés során már néhány fluoreszcens molekula is jól megkülönböztethető a sötét háttértől, így a módszer rendkívüli kis kimutatási határral bír.

2.1.3 PNS szálak immobilizációjának lehetőségei

A fent említett molekuláris villogóktól eltérően a nukleinsav szenzorok leggyakrabban nem homogén, hanem heterogén fázisú kölcsönhatáson alapulnak, amikor is a felismerő szál egy jelátalakító felületére van immobilizálva. Az egyik leggyakrabban alkalmazott felület az arany, pl. kvarckristály nanomérlegek, felületi plazmon-rezonanciás, vagy elektrokémiai szenzorok esetében. A felismerő szálakat egyrészt közvetett módon lehet kikötni a felületre, amely a specifikus és rendkívül erős biotin-avidin kölcsönhatásnak köszönhetően napjainkra igen elterjedt módszerré nőtte ki magát [31]. Ekkor a felismerő szálakat biotinnal jelölik, és avidinnel (streptavidinnel, vagy extravidinnel) módosított felületre kötik ki. Egy avidin molekula elvileg 4 biotin molekula megkötésére képes, de az immobilizált avidin fehérje orientációja miatt az elérhető kötőhelyek száma általában 2, így a PNS szálak a felületen egymástól optimális távolságra helyezkednek el a komplementer szálakkal való hibridizációhoz. Egy másik lehetséges út a közvetlen módon történő immobilizáció, aminek során tiol-, vagy diszulfid-származékokkal módosított felismerő szálakat kötnék ki arany felületre, kihasználva a tiol molekulák önszerveződő képességét, és a közel kovalens erősségű (a biotin – avidin kölcsönhatásnál is erősebb) Au-S affinitást. Ez esetben fontos, hogy a felismerő szál egy alkalmas távtartón keresztül legyen immobilizálva a felületre (pl. C6M – AEEA távtartó, lásd 6. ábra) [32].



6. ábra – A PNS felismerő szálak immobilizációjához alkalmazott C6M – AEEA távtartó.

Ez utóbbi módszer azonban nem annyira elterjedt, hiszen az egyszálú PNS szálak hajlamosak az arany felületére nem-specifikusan adszorbeálódni, így nagymértékben csökken a hibridizációs képességük. Amiért mégis érdemes vizsgálni és optimalni a módszert, hogy az immobilizáció során egy önszerveződő monoréteg (SAM – Self-assembled Monolayer) jön létre a vizsgált felületen, amelynek kialakulása nélkülözhetetlen az elektrokémiai [33][34], képalkotó felületi plazmon-rezonanciás [35][36], valamint kvarckristály mikromérleggel [37] történő nukleinsav meghatározásokhoz. Az önszerveződő monoréteg kialakulásával az immobilizált nukleinsav felismerő szálak felületi sűrűsége nagyon tág tartományban állítható, illetve nagymértékben befolyásolható a felismerő réteg tulajdonságai az együttes-, illetve utóimmobilizálás során a térkitöltő tiolokkal és diszulfid származékokkal. Az egy lépésben történő kikötésnek köszönhetően nincsen szükség további keresztkötő reagensekre, amelynek következtében egyszerűbb és költséghatékony az immobilizálási eljárás. Másrészt, viszont pontosan az a tény, hogy a felületi sűrűséget a kompakt monorétegtől a kisebb sűrűségű rétegekig szabadon változtatható, sokszor jelentős optimalást igényel.

A biotin-avidin keresztkötésen alapuló immobilizációs technika elterjedése a nukleinsav szálak esetében egy korábbi tanulmány megállapításainak köszönhető [38]. E szerint a biotinnal jelölt felismerő DNS szálak immobilizációja sokkal hatékonyabb extravidin módosított felületekre, hiszen a tiol-végcsoporttal módosított DNS szálak az immobilizációt követően nem-specifikusan adszorbeálódnak az arany felületre, és csak 6-merkaptó-1-hexanol oldatával történő utókezelést követően szüntethető meg részlegesen a közvetlen kapcsolat a DNS szál és az arany felület között.

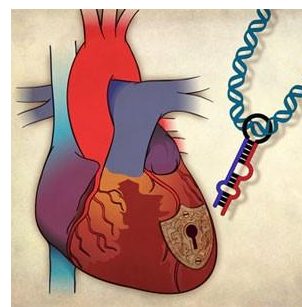
Ez utóbbi feltételezést bizonyítja Li és Rothberg tanulmánya [13], miszerint az egyszálú DNS molekula meglehetősen erősen adszorbeálódik az arany kolloid felületére, ellentétben a kettős hélix szerkezetű, hibridizált állapotban lévő DNS szállal. Ennek magyarázata, hogy a hibridizált állapotban lévő oligonukleotidok esetében a bázisok H-híd kölcsönhatás kialakításával kapcsolódnak a komplementer szálhoz, így nem alakul ki kölcsönhatás a bázisok és az arany felület között, ellentétben az egyszálú DNS szálakkal, ahol a bázisok szabadon kölcsönhatnak az arany kolloidokkal.

Martin-Gago és munkatársaik tanulmánya szerint [39] az önszerveződő, egyszálú PNS monorétegek kialakulása kritikusabb a kísérleti körülményekre, mint a természetes nukleinsavak esetében tapasztaltak és nagymértékben függ a felületre kikötni kívánt felismerő szál oldatának koncentrációjától. A két lépésben lejátszódó immobilizációs folyamat során a felületre kerülő egyszálú PNS szálak „elfeksznek” a felületen, majd egy bizonyos felületi receptor-sűrűség elérése után egy fázisátmenet következtében a felületre merőlegesen „felálló” pozíciót vesznek fel („*lying-down*” és „*standing-up*” modellek) [40]. Elfekvésük egyik oka lehet, hogy a fiziológiás pH-n gyengén pozitív töltésük miatt elektrosztatikusan kölcsönhatnak az állandó negatív töltésű arany felülettel, illetve a szabad bázisok és arany között is kialakulhatnak másodlagos kölcsönhatások. A tanulmány szerint a felületet 1 μM -os PNS-oldattal érdemes módosítani, mert ennél nagyobb koncentrációknál (5-10 μM) a felület telítődik, és olyan kompakt monoréteg alakul ki, amelynél röntgen fotoemissziós spektroszkópiával (XPS – *X-ray Photoemission Spectroscopy*) nem mutatható ki a komplementer DNS szál kötődése.

A felismerés során leginkább a PNS szálak felületi receptor-sűrűségével befolyásolható a hibridizáció hatékonysága. Ugyan a PNS-, és a komplementer szekvenciájú, negatív töltésű nukleinsav szálak között nem alakul ki elektrosztatikus taszítás hibridizációkor, azonban hogyha a PNS szálak túl közel kerülnek, úgy az egymáshoz közeli felismerő szálakkal hibridizáló nukleinsav molekulák elektrosztatikus taszításuk révén gátolják egymás asszociációját. Ez az effektus független az immobilizáció kémiaiájától, csökkenteni pedig csak a hibridizációs puffer ionerősségének növelésével vagy a felismerő szálak felületi receptor-sűrűségének csökkentésével lehet. A nagy hibridizációs hatékonyság eléréséhez tehát elengedhetetlen a PNS szálak optimális felületi borítottságának kialakítása.

2.2 Szívinfarktus biomarker, hsa-miR-208a mikroRNS

A modellként választott mikroRNS molekulák felfedezése 1993-ra nyúlik vissza, amikor is biomarker szerepük egyértelművé vált a kutatók számára [41]. A mikroRNS-ek rövid láncú (18-26 nukleotid), fehérjét nem kódoló RNS molekulák [42], amelyek a transzlációs folyamatok befolyásolásával, a hírvivő mRNS-en keresztül részt vesznek a génszabályzásban és a sejt fehérjekészletének poszttranszkripciós szintű szabályozásában [41]. Napjainkig több, mint 1100 humán mikroRNS szekvenciát azonosítottak a kutatók [43] és valószínűsítik, hogy a fehérjét kódoló humán gén közel egyharmada mikroRNS



szabályzás alatt áll. Igen stabil molekulák, amely annak köszönhető, hogy különböző fehérjékkel komplex formát alkotva, vagy exoszómákba (50-80 nm átmérőjű, foszfolipid kettős réteggel határolt extracelluláris vezikulum) ékelődve fordulnak elő a szervezetben [44]. Testfolyadékokban mérhető koncentrációjuk jelentős mértékben megváltozhat különböző betegségek esetén [45][46], ezért a jövőben ígéretes biomarkerek lehetnek. Kimutathatóak vérből, köpetből, testnedvekből, és minden olyan mintából, melyben DNS található, így lehetőség nyílik nem invazív (nem testbe hatoló) mintavételi módszerek alkalmazására [47].

A szívizom roncsolódásakor 9 különböző mikroRNS fejteti hatását [48]. A szívinfarktus biomarker, hsa-miR-208 mikroRNS családba a kutatók vizsgálatai alapján két fajta RNS sorolható [49], amelyek közül az egyik a szívspecifikus miR-208a mikroRNS [50]. Ez a biomarker az α -szívizom nehéz miozinlánc génjének intronjában (Myh6) kódolt szekvencia (5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3') [51][52][53], amely feldúsulása a szervezetben balkamra hipertrófiával járó szívelégtelenséget okoz.

A mikroRNS-ek kimutatására jelenleg leggyakrabban alkalmazott technikák a *northern blotting*, *microarray* technikák, kemi-, és biolumineszcens módszerek, valós idejű PCR, elektrokémiai [54] és Raman-spektroszkópiái, valamint fluoreszcencián alapuló (például fluoreszcencia anizotrópia) módszerek [55]. Ezen módszerek azonban munka-, illetve időigényük miatt nem alkalmasak a betegágy melletti (POC – *Point of Care*) diagnosztikában történő alkalmazásra. Az egyik legkisebb kimutatási határ jelenleg képalkotó felületi plazmon-rezonanciás (SPRi) módszer segítségével érhető el.

A mikroRNS-ek meghatározására alkalmas szenzorok kifejlesztése egyre nagyobb jelentőséggel bír, hiszen a legfrissebb kutatások szerint a mikroRNS-ek egyrészt részt vesznek a vírusok elleni védekezésben [56], másrészt pedig a táplálék lebontási folyamatait átvészelve testidegen, növényi eredetű mikroRNS-ek kerülhetnek be az emberi szervezetbe [57], így például a rizsben megtalálható miR-168a mikroRNS képes negatív irányba szabályozni az LDLRAP1 génjét (májban lévő fehérje), ami a vérből el tudja távolítani az LDL-koleszterint („rossz” koleszterin).

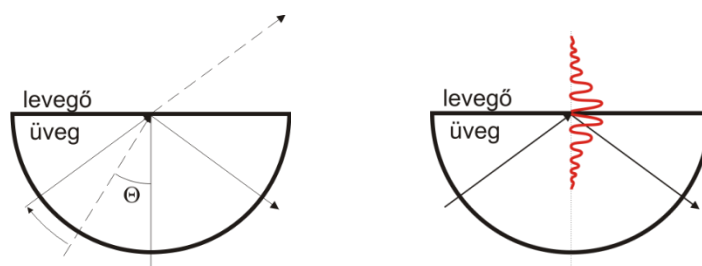
2.3 Képalkotó felületi plazmon-rezonanciás módszer

A felületi plazmon-rezonanciát 1902-ben figyelték meg először [58], de csak 1968-ban értették meg mélyebben magát a fizikai jelenséget [59][60]. Érzékelésre csak jóval később, az

1980-as években kezdték alkalmazni [61][62], ezt követően pedig a biomolekuláris kölcsönhatások jelölésmentes és valós idejű detektálását lehetővé tevő módszerként terjedt el [62][63][64]. Tekintettel arra, hogy az SPR technika egy felületi jelenségen alapul, a jelváltozást elsődlegesen a felülettel érintkező oldatréteg törésmutató változása határozza meg. Ez történhet egy kölcsönhatás következtében a felületre kötődött vagy eltávolított komponens miatt, de befolyásolhatja a mintaoldat törésmutatója is. Ennek megfelelően az első SPR készülékek két csatornásak voltak, a mérőcsatorna regisztrálta a specifikus és nem-specifikus kölcsönhatásokat és a referencia csatorna a nem-specifikus kölcsönhatásokat, pl. az oldatcserénél fellépő oldattömegi törésmutató változásokat. A mérő-, és referencia csatornák jelváltozásának különbsége adta a specifikus kölcsönhatást jellemző jelváltozást. Ugyanakkor, ezek a készülékek nem tudták biztosítani a bioanalitikai vizsgálatokhoz szükséges nagy áteresztőképességet, amelyre a képalkotó felületi plazmon-rezonanciás (iSPR - *imaging Surface Plasmon Resonance*) módszer bevezetésével nyílt lehetőség [65]. Segítségével valós időben és jelölés nélkül követhető nyomon affinitási kölcsönhatások kinetikája egyszerre akár több száz ponton. Különböző jelerősítési (*amplifikációs*) módszerek alkalmazásával rendkívül kis mennyiségek is meghatározhatók, akár 5 attomól [66].

2.3.1 A felületi plazmon-rezonanciás mérés elméleti alapja

Amikor a fényforrásból származó, a beesési síkkal párhuzamosan polarizált fény (*p-polarizáció*) áthalad egy prizmán, a prizma/levegő határfelületén (a nagyobb optikai sűrűségű közegből a kisebb optikai sűrűségű közegbe lépve) a fény elhajlik a határfelület síkja felé (7. ábra). A fény beesési szögét változtatva elérhetjük azt a kritikus szöget, ahol az összes beeső fény visszaverődik a prizmában. Ezt nevezzük teljes belső visszaverődésnek.



7. ábra – Teljes belső visszaverődés (bal) és az evanescens tér (jobb) [67].

Ekkor ugyan a fény nem halad keresztül a prizmán, de a besugárzó fotonok elektromos tere bejut a fényvisszaverő közegbe, ahol az elektromágneses térnek egy része a térben terjed, másik része pedig a felülethez kötött, tőle távolodva exponenciálisan csökkenő térerősségű. Ezt, a

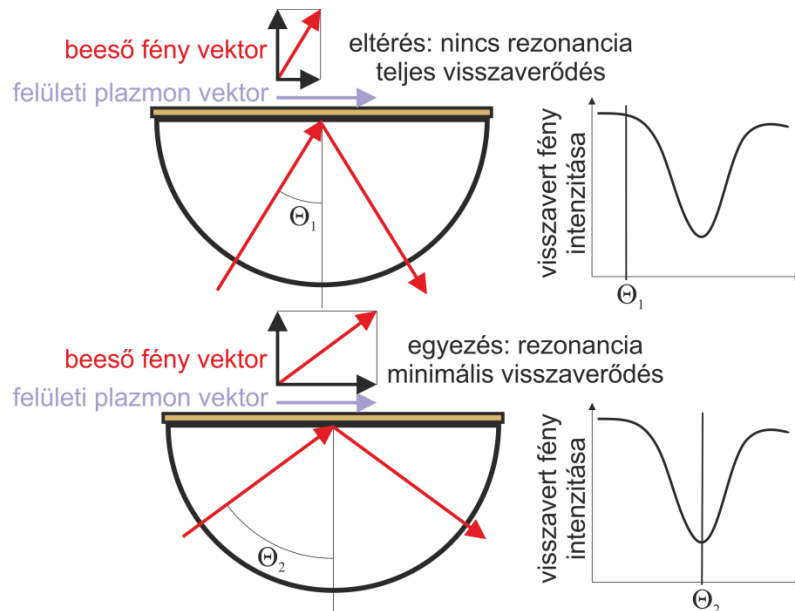
besugárzó fény hullámhosszának körülbelül a felével megegyező távolságra behatoló elektromos teret, evanescens térnek nevezzük, mivel amplitúdója exponenciálisan csökken a felülettől távolodva.

Az SPRi mérőrendszereknél a prizma visszaverő felületét egy vékony nemesfém réteggel vonják be, legtöbbször arannyal (nagyjából 47 nm vastagságban), mivel az arany könnyen kezelhető az SPRi jelképzés szempontjából, kémiaiilag megfelelően inert, illetve különböző módszerekkel kémiaiilag módosítható, így széles körben nyílik lehetőség a felismerő molekulák immobilizációjára.

Amikor a foton elektromos térének energiája éppen megfelelő, kölcsönhatásba lép az arany felület szabad, vezető elektronjaival. A beeső fotonok ekkor elnyelődnek és az energiájuk átadódik az elektronoknak, amik ekkor átalakulnak felületi plazmonokká (8. ábra), így a visszavert fény intenzitása lecsökken. A kvantumelméletben a fotonok és az elektronok hullám- és részecsketermészettel is rendelkeznek, így a plazmon tulajdonképpen az elektronsűrűség hullám részecsketermészete.

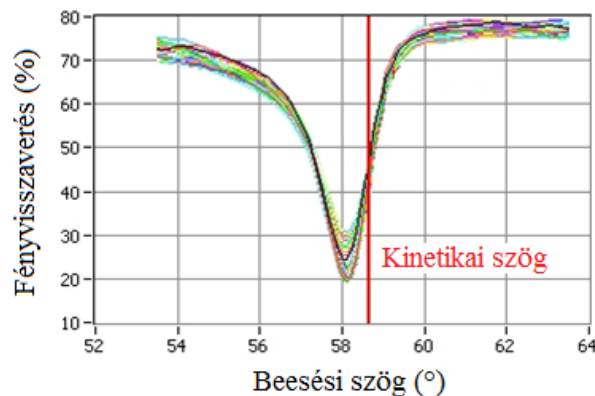
A felületi plazmonok (szabatosabban felületi plazmon-polariton) a fém és dielektrikum határán terjedő szabad, vezetési elektronok kollektív mozgásához kapcsolódó elektronsűrűség-oszcillációkból, és a hozzá kapcsolt, a felületre merőleges elektromos vektorú elektromágneses térből állnak, melyek energiája azonos a gerjesztő fény fotonjainak energiájával, ám impulzusa nagyobb, mint a besugárzó fotonoké.

A foton – plazmon átalakulás során természetesen az impulzus-, és energia megmaradásnak teljesülnie kell. Akkor következik be a rezonancia gerjesztés, amikor a beeső fény impulzusa megegyezik a plazmonok impulzusával (8. ábra). A felületre egy adott szögben beeső fénysugár impulzus vektora matematikailag felbontható egy felülettel párhuzamos és egy felületre merőleges komponensre. A beeső fény beesési szögének megváltozásakor a komponensek relatív nagysága megváltozik, azonban mivel a plazmonok kizárólag az arany felületén fordulnak elő, így az SPR szempontjából csak a felülettel párhuzamos komponens számít. Tehát egy adott beesési szögnél akkor jön létre plazmon-rezonancia, ha a foton felülettel párhuzamos vektor komponense megegyezik a plazmon impulzusával.



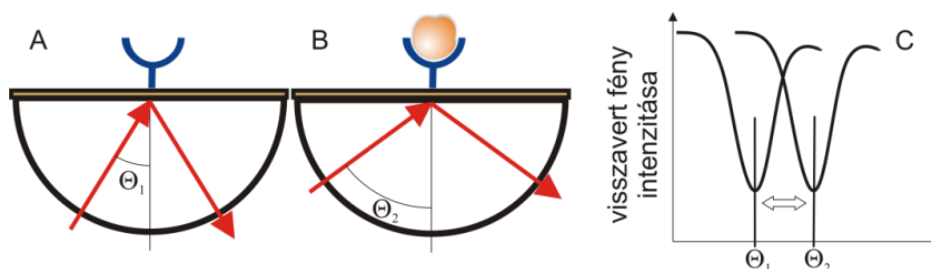
8. ábra - A felületi plazmon-rezonancia sematikus ábrája. A besugárzó fény impulzusa felbontható a felületre merőleges és a felülettel párhuzamos komponensekre. Amikor a felülettel párhuzamos komponens nagysága megegyezik az arany felületi plazmonjainak impulzusával, akkor megtörténik a plazmon gerjesztés [67].

A mérések során általam használt műszer a minimumos SPR görbe felületi törésmutató változásra legérzékenyebb pontjában (inflexiós pont, az ábrán piros vonallal jelölve) méri a fényintenzitást (9. ábra), mely változásának nyomon követéséből regisztrálja a kinetikai görbét.



9. ábra – SPR rezonancia görbe különböző felismerő szálak foltjain. A legkisebb reflektivitáshoz tartozik a maximális plazmon gerjesztés. A piros függőleges vonal jelzi a törésmutató változásra legérzékenyebb szöget, ahol a második derivált ordináta értéke zérus. (Saját mérés)

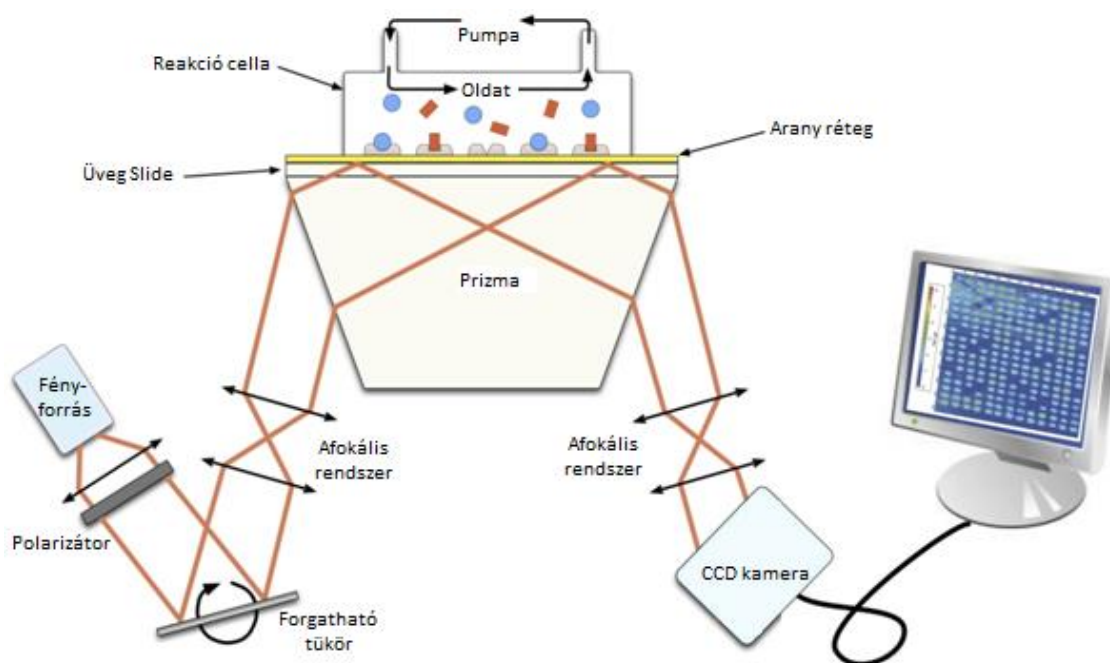
A biomolekuláris kölcsönhatások nyomon követését az teszi lehetővé, hogy a molekulák bekötődésekor a szenzor felületén megváltozik a törésmutató, így a rezonancia szög eltolódik (10. ábra).



10. ábra – Az arany felületre immobilizált felismerő molekula Θ_1 szög alatt idéző teljes visszaverődést a szenzor felületén (A). Az analát molekula bekötődése során a rezonanciaszög Θ_2 -re változik (B), így a rezonancia szög eltolódásán keresztül (C) a bekötődés érzékenyen nyomon követhető [67].

2.3.2 Az SPRi készülék mérési elrendezése

Az áramló oldatos rendszerbe egy bemérő hurok és kétállású szelep segítségével jól meghatározott térfogatú analát-oldat injektálható egy adott térfogatárammal. Amikor az analát-oldat eléri a biochip felületét, akkor a felületre kötött felismerő szálak (PNS) hibridizálnak a komplementer nukleinsav (DNS vagy mikroRNS) molekulákkal, így a dielektrikum arany felülettel határos részén – néhány nanométer vastagságban – megváltozik a törésmutató.

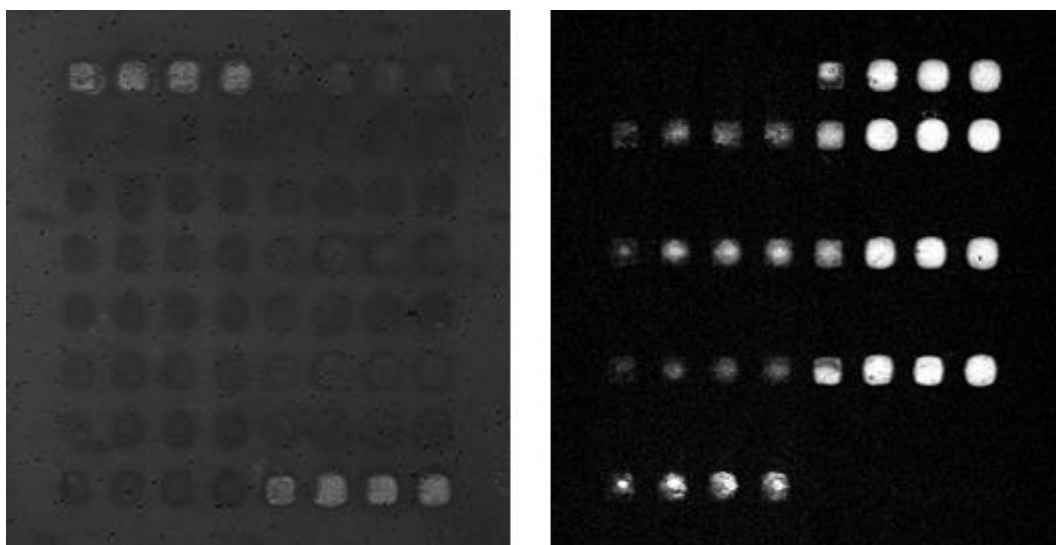


11. ábra – Az SPRi készülék felépítése [68].

A mérés során (11. ábra) a chipet egy *p*-polarizált fénysugárral sugározzuk be úgy, hogy az teljes visszaverődést szenvedjen. A felületi plazmonok maximális gerjesztése egy adott beesési

szögnél történik meg, ilyenkor a visszavert fény intenzitásában egy minimum látszik (9. ábra), amely meghatározza a rezonancia szöget. Az analát molekula bekötődésekor megnő a dielektrikum törésmutatója, tehát a rezonanciaszög eltolódik, így az eredeti SPR rezonancia görbe inflexiós pontjában megváltozik a fényintenzitás. Ezt a változást követve az idő függvényében ábrázolható a biomolekuláris kölcsönhatás során bekövetkező törésmutató változás a szenzorchip eredeti törésmutatójához viszonyítva.

A reakciócellában a biochip felületén bekövetkező törésmutató változás nyomon követhető tehát a visszavert sugárzás intenzitás változásán keresztül egy CCD kamera segítségével (12. ábra).

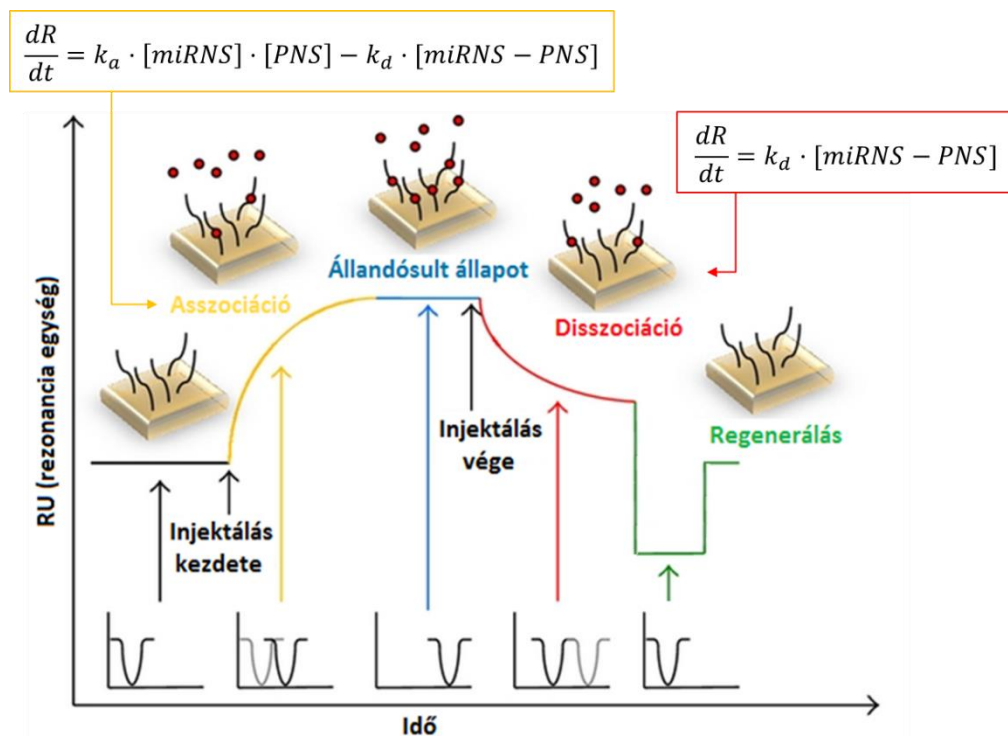


12. ábra – Bal oldalon látható a biochip CCD kamerás képe a mérés előtt, jobb oldalon pedig a bekötődés során felvett differenciális kép. A biochip jobb felén látható pontok világosabbak, oda tehát több mikroRNS szál kötődött be. (Saját mérés)

2.3.3 Biomolekuláris kölcsönhatások kinetikájának meghatározása

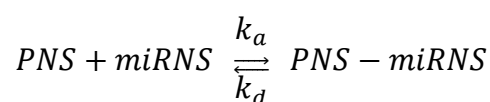
A kinetikai ciklus során (13. ábra) az asszociációs szakaszban a felületre immobilizált felismerő szál (PNS) hibridizál az áramló oldatban lévő komplementer nukleinsavval (DNS vagy mikroRNS), így megváltozik a törésmutató a chip felületén. Ezt egy kvázi egyensúlyi (*steady-state*) állapot követi, ahol az asszociáló és disszociáló molekulák száma megegyezik, így beáll egy dinamikus egyensúly, tehát nem változik meg a fém-dielektrikum határán a törésmutató. Amikor az áramló oldat már nem tartalmaz több komplementer nukleinsavat, megkezdődik a disszociáció, amely időbeli lefutása, meredeksége függ az affinitás kölcsönhatás erősségétől, így a k_d – disszociációs sebességi koefficiensstől. Regenerálás során a pH megváltoztatásával felszakítjuk

a kettős hélix szerkezetet stabilizáló H-híd kölcsönhatásokat, így a szenzorchip felületén csak az immobilizált felismerő szálak maradnak, tehát visszakapjuk az eredeti alapvonalat.



13. ábra – A kép egy SPRi szenzorgramot mutat be. Az injektálás utáni asszociációs szakaszt egy kvázi állandósult (steady-state) állapot követi, majd a disszociáció szakasza. A felület regenerálása után visszakapjuk az alapvonalat. Az asszociációs-, és disszociációs szakaszban mérhető jelváltozásokat a feltüntetett egyenletek írják le.

A vizsgált kölcsönhatás formalizált reakcióegyenlete szerint a rendszerben egyszerre lesznek jelen szabad PNS és mikroRNS (miRNS) molekulák, illetve ezek hibridizált komplexei:



A folyamat egyensúlyi állandója a következő formulával számítható ki [69]:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[PNS - miRNS]}{[PNS] \cdot [miRNS]} \quad K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[PNS] \cdot [miRNS]}{[PNS - miRNS]}$$

ahol, K_A a kölcsönhatás asszociációs egyensúlyi állandója [M], K_D a folyamat disszociációs egyensúlyi állandója [M⁻¹], amelyek egymással inverz viszonyban állnak; k_a a hibridizált formát jellemző asszociációs sebességi koefficiens (amely tipikusan 10³-10⁷ nagyságrendű biológiai mintáknál, mértékegysége: M⁻¹s⁻¹), k_d pedig a disszociációs sebességi együttható, ami a

kölcsönhatás erősségének a jellemzésére szolgál (tipikusan 10^{-1} - 10^{-6} nagyságrendű biológiai mintáknál, mértékegysége: s^{-1}). A K_D az egyensúlyi állapotra jellemző, míg a dinamikára a k_a és k_d értékekből következtethetünk.

A hibridizáció során bekövetkező törésmutató változás a disszociáció szakaszában csak a disszociációs sebességi együtthatóval lesz arányos, míg az asszociáció alatt az asszociációs és a disszociációs sebességi állandó értékétől is függ, így a kinetikai vizsgálat során először a k_d -t határozzák meg, majd ezt rögzítve számítható ki a k_a értéke a K_D meghatározásához. Ennek magyarázatául szolgál, hogyha egy adott felületi receptor-sűrűségű PNS folton vizsgáljuk a disszociációs sebességi koefficiens értékét, úgy az független lesz az injektált mikroRNS-oldatok koncentrációjától, hiszen a disszociáció hajtóereje az analát molekulák kémiai potenciáljának a különbsége a felület és az áramló oldat között. Az asszociáció során viszont a hibridizált szálak egy része disszociál is, tehát egy dinamikus folyamat révén a k_a és k_d is meghatározza a törésmutató változás nagyságát. Az analízis során tehát a mért jel idő szerinti deriváltját vizsgálják, és keresik a kapcsolatot a jelváltozás, valamint a koncentrációk között.

$$\frac{dR}{dt} = k_d \cdot [PNS - miRNS] \qquad \frac{dR}{dt} = k_a \cdot [PNS] \cdot [miRNS] - k_d \cdot [PNS - miRNS]$$

Megoldva a differenciálegyenleteket azt kapjuk, hogy:

$$R(t) = R_{eq} \cdot e^{-k_d \cdot t} + R_0 \qquad R(t) = \frac{k_a \cdot [PNS] \cdot R_{max}}{k_a \cdot [PNS] + k_d} \cdot (1 - e^{-(k_a \cdot [PNS] + k_d) \cdot t}) + R_0$$

ahol R_{eq} a kvázi egyensúlyi (*steady-state*) állapotban mért jel, R_{max} a teljes felületi hibridizációs kapacitás (mérhető jel nagysága, amikor az összes PNS a komplementer mikroRNS szállal hibridizált állapotban van), R_0 az alapjel, t az idő. A kinetikai meghatározásokhoz tehát nélkülözhetetlen az R_{max} értékének pontos ismerete.

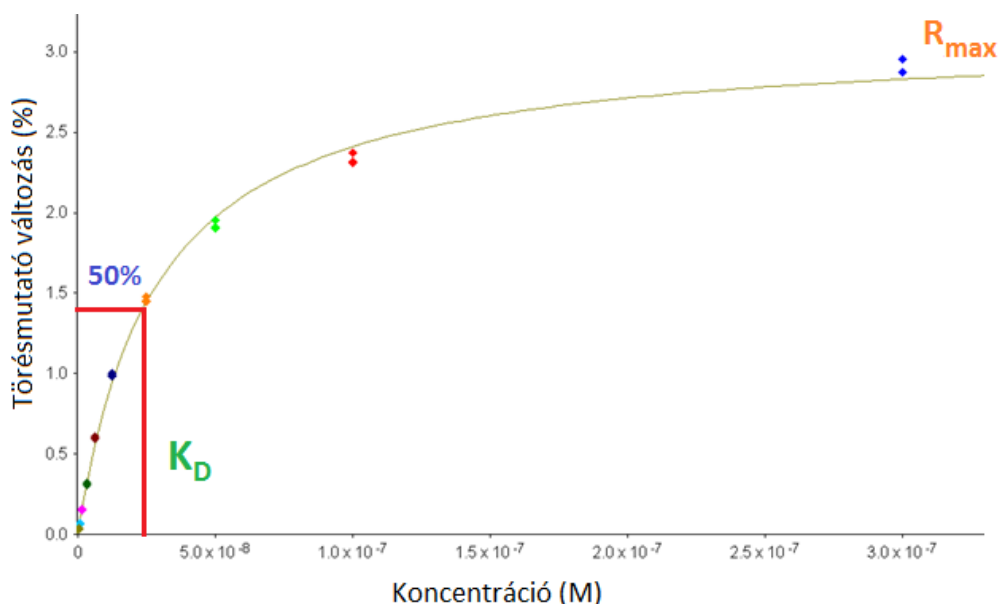
Egyensúlyban a komplex koncentrációja egyenesen arányos a válaszjellel (R_{eq}), és az analát koncentrációjával, így a szabad felismerő szál (PNS) koncentráció $R_{max} - R_{eq}$ formában származtatható az egyensúlyi komplex koncentrációjából, hogyha ismerjük a mérhető jel nagyságát

abban az esetben, amikor az összes PNS hibridizált állapotban van (R_{max}). Az R_{max} meghatározása után tehát elegendő az injektált miRNS koncentrációjának ismerete. Ezek szerint:

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot [miRNS] \cdot (R_{max} - R_{eq}) - k_d \cdot R_{eq} = 0$$

Az egyensúlyi állandó a k_d/k_a hányados képzésén felül nagy érzékenységgel meghatározható az egyensúlyi izotermáról, hiszen az 50%-os felületi telítettséget eredményező analát koncentráció a K_D értékével egyezik meg, így a disszociációs állandó értékét az abszcisszáról olvashatjuk le a koncentráció-egyensúlyi jel görbéről a telítési koncentráció felénél (14. ábra).

Az R_{max} értékének meghatározása azonban rendkívül nagy mennyiségű analátot igényel (akár több száz μM -os koncentrációkat), így a kiértékelő szoftverek extrapolációval számítják azt, amely a legtöbb esetben nem ad valós értéket, így a K_D meghatározása ezzel a módszerrel meglehetősen bizonytalan. A k_a és k_d meghatározásakor a kinetikai görbéket globálisan, az összes görbére egyszerre illesztik, amelynek következtében egy asszociációs és disszociációs sebességi állandóval jellemezhető a teljes görbesereg.

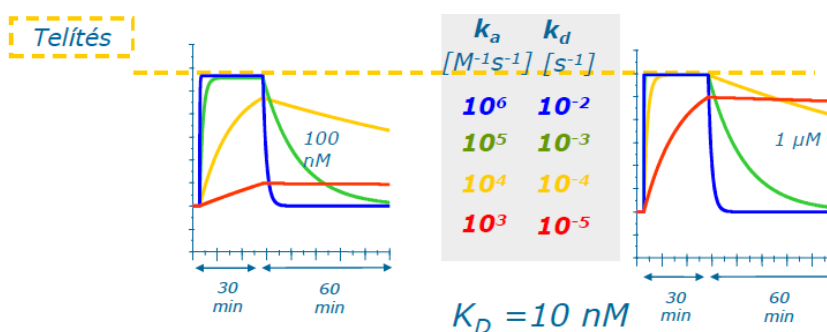


14. ábra – Egyensúlyi állandó meghatározása az egyensúlyi izotermából. (Saját mérés)

A kinetika vizsgálata során fontos szempont az injektált mikroRNS-, és a felcseppentett PNS-oldat koncentrációjának helyes megválasztása. Kis koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor nem kapunk szignifikáns jelet (ezen segíthetünk az áramlási sebesség csökkentésével,

hiszen ekkor nő a tartózkodási idő, de így a disszociációs sebességi koefficiens jelentősen lecsökkenhet) és az asszociáció diffúzió-limitálttá válhat, ellentétben nagy mikroRNS koncentráció hatására túl gyorsan érhetjük el a telítési szakaszt. Kis PNS receptor-sűrűség esetén nem kapunk szignifikáns jelet, míg nagy PNS koncentráció esetén előfordulhat, hogy diffúzió limitálttá válik a kölcsönhatás, illetve hogy a kvázi egyensúlyi (*steady-state*) állapot csak nagy mikroRNS koncentrációnál, igen lassan áll majd be. Hogyha a felismerő szálak közel helyezkednek el egymáshoz, akkor a hibridizáló, töltéssel rendelkező mikroRNS szálak elektrosztatikus taszításuk révén gátolják egymás hibridizációját, mely a meghatározás szempontjából szintén problémát jelent. A kölcsönhatás vizsgálatához igen kritikus tehát a megfelelő PNS-oldat és mikroRNS-oldat koncentrációjának helyes megválasztása.

Egy adott K_D -t végtelen sok k_a – k_d párossal lehet leírni. Ezek közelítő értékeinek ismeretében határozhatunk a felcseppentett PNS-, és injektált mikroRNS-oldatok optimális koncentrációjáról. A 15. ábra elemzésekor jól látható, hogy 100 nM-os analát-oldat injektálásakor a sárga színű affinitási profil értékelhető ki megfelelően, azonban ha a vizsgált kölcsönhatás egyensúlyi állandói a piros görbére jellemző profillal, k_a és k_d sebességi állandókkal írható le, akkor érdemes megnövelni az injektált analát koncentrációját annak érdekében, hogy megbízhatóbb információkhoz jussunk.



15. ábra – Hogyha ismerjük a kölcsönhatás asszociációs-, és disszociációs sebességi állandóinak értékeit, akkor könnyebben dönthetünk a vizsgálandó molekula oldatának koncentrációjáról. Amennyiben a sárga színű profillal jellemezhető a kölcsönhatás, úgy javasolt 100 nM koncentrációjú oldatot vizsgálni, míg a piros profil esetén érdemes a koncentrációt 1 μ M-ra növelni. (Kémiai és bioszenzorok, Gyurcsányi E. Róbert)

A mérés során a dielektrikum effektív törésmutatóját ($\Delta R\%$ – *reflectivity variation [%]*) mérjük a szenzor közvetlen felületén, tőle néhány száz nm távolságban. Az asszociációs szakaszban mért törésmutató változás arányos a felületi borítottság változásával, így hogyha megváltozik a szenzor felületén a törésmutató (tehát a mikroRNS szál hibridizál a PNS szállal), akkor a változás a

mikroRNS molekulák felületi sűrűségével lesz arányos. Mivel a biomolekulák tipikusan hasonló törésmutató változást okoznak [70], ezért becsülni lehet a felületi borítottságot. A Horiba SPRi esetében (figyelembe véve a gerjesztési paramétereket) 1% törésmutató változás (*reflectivity variation*) 185 pg/mm² felületi borítottságnak felel meg. Biacore készülékek rezonancia egységben (*RU – resonance unit*) határozzák meg a jelváltozást, így 1RU = 1 pg/mm² felületi borítottság változással lesz egyenlő ($\sim 0.0054054 \Delta R\%$). Ismerve tehát az analát és felismerő szál moláris tömegét, meghatározható a PNS molekulák felületi receptor-sűrűsége.

3 KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1 Alkalmazott vegyületek és oldatok

➤ PNS felismerő szálak (Eurogentec/PANAGEN, Seraing, Belgium):

	Peptid-nukleinsav	N'	Bázissorrend	C'
1	PNS18mer (N'tiol)	AEEA-C6M	GCTTTTTGCTCGTCTTAT	-
2	PNS18mer (C'tiol)	-	GCTTTTTGCTCGTCTTAT	AEEA-C6M
3	PNS18mer (C'tiol; N'lizin)	lizin	GCTTTTTGCTCGTCTTAT	AEEA-C6M
4	PNS12mer (C'tiol)	-	TGCTCGTCTTAT	AEEA-C6M
5	PNS1Smer (C'tiol; N'lizin)	lizin	TGCTCGTCTTAT	AEEA-C6M

➤ DNS (Sigma-Aldrich) és mikroRNS (Sigma-Aldrich) szálak:

6	miR-208a DNS22mer	5'	ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT	3'
7	miR-208a mikroRNS22mer	5'	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	3'

➤ Negatív kontrollként alkalmazott PNS-, és mikroRNS szálak:

8	NK PNS18mer	N'	GCCGCTTCTTTATCTTTT	C'
9	NK RNS22mer	5'	AGUACUAAUUCGUCUCUGUUCU	3'

A nukleinsavak-, és a szintetikus oligonukleotid-analógok oldatait -10°C-on fagyasztva tároltam 100µM-os koncentrációjú, 20-30 µL-es egységek formájában, hogy biológiai stabilitásukat megőrizsem. A liofilizált formában érkezett PNS-, DNS-, és mikroRNS-oldatok készítéséhez proteáz és nukleáz mentes vizet használtam („Water for molecular biology, DEPC-treated and sterile filtered” (Sigma)).

➤ A mérések során használt pufferek:

PBS Foszfát puffer: 10 mM (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), pH=7,4
(tableta, Sigma-Aldrich)

PB	Kis ionerősségű foszfát puffer: 10 mM dinátrium-hidrogénfoszfát (<i>Reanal</i>), pH=7,4-re állítva 1M hidrogén-klorid oldattal (<i>Fluka</i>)
3XSSC	Citrát puffer: 45 mM trinátrium-citrát·dihidrát (<i>Reanal</i>) (450 mM NaCl (<i>Fluka</i>)), pH=7,0-ra állítva 1M hidrogén-klorid oldattal (<i>Fluka</i>)
SBB	Borát puffer: 10 mM dinátrium-tetraborát·dekahidrát (<i>Reanal</i>), 140 mM NaCl (<i>Fluka</i>), pH=10,0-ra állítva 1M nátrium-hidroxid oldattal (<i>Fluka</i>)

➤ *A BioChip blokkolásának optimalizálásakor vizsgált tiolok:*

MCH:	6-merkaptó-1-hexanol (<i>Sigma-Aldrich</i>)
MUS:	11-merkaptó-undekán sav (<i>Sigma-Aldrich</i>)
ME:	2-merkaptó-etilamin (<i>Sigma-Aldrich</i>)
QT:	(11-merkaptoundecil)-N,N,N-trimetilammónium-bromid (<i>Sigma-Aldrich</i>)
TEG:	(11-merkaptoundecil)-tetra(etilén-glikol) (<i>Sigma-Aldrich</i>)
HEG:	(11- merkaptoundecil)-hexa(etilén-glikol) (<i>Sigma-Aldrich</i>)

➤ *Mikrotiter tálcá blokkoló oldat:* Pierce © Protein free blokkoló puffer (*Thermo SCIENTIFIC*)

➤ *BioChip blokkoló oldat:* 1 mM MCH, PBS pufferben oldva

➤ *SPRi fluidikai rendszerének tisztítására alkalmazott oldatok:*

1%-os SDS-oldat (nátrium-dodecil-szulfát) (*Reanal*)
100 mM NaOH-oldat (*Reanal*)
100 mM HCl-oldat (*Fluka*)
96%-os etanol (*Reanal*)
Ioncserélt víz, 18,2 MΩ/cm fajlagos ellenállás (*Millipore Synergy® UV ultrapure Water System*)

3.2 Alkalmazott műszerek és eszközök

- Képkalkotó felületi plazmon-rezonanciás mérőműszer: SPRi-PLEX II (*HORIBA Jobin Yvon SAS, Palaiseau, Franciaország*)
- Mikrocseppentő robot: BioOdyssey™ Calligrapher™ MiniArrayer (*BioRad*)
- PCR fülke: UV-cabinet for PCR operations UVT-S-AR (*BioSan*)

- UV-ózon tisztító rendszer: Digital UV Ozone System, PSD Pro Series (NOVASCAN)
- Centrifuga: 5430R (Eppendorf)
- Termosztált rázógép: TS-100C Thermo-Shaker (BioSan)

➤ Kiértékelő szoftverek, és protokollok:

A mikrocseppentő robot vezérléséhez alkalmazott szoftver a BioOdyssey™ Calligrapher™ MiniArrayer Application Software version 1.0 (BioRad) volt. Az SPR készülék vezérlését az SPRiView p5.0.1 (Horiba) szoftverrel végeztem. Az SPR mérés során kapott adatok kiértékeléshez és ábrázolásához az SPRiAnalysis 2.0 (Horiba) szoftvert alkalmaztam. A kinetikai mérések kiértékelésére a ScrubberGen (Biacore) szoftvert használtam. A fordított-kinetikai kiértékelés során a „SPR-TN01: Single Injection Step Analysis in ScrubberGen software, HORIBA Scientific” protokoll szerint jártam el, melynek lényege, hogy a kinetikai paraméterek meghatározása során nem teszek különbséget a különböző koncentrációjú PNS foltok között, és egy adott analát koncentrációra vizsgálom a kinetikát.

➤ A mikrocseppentéshez alkalmazott tűk (Arrayit™ corporation):

- Kontakt tű:
Stealth Solid Pin

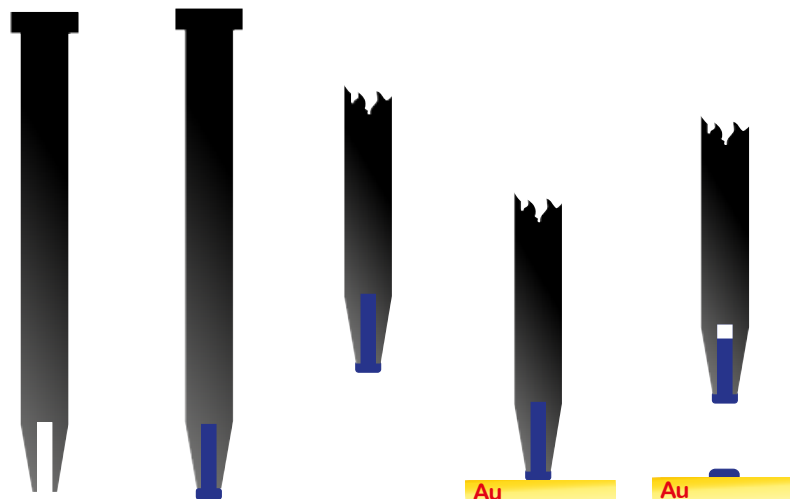
katalógus szám: SSP015
tű átmérője: 0,061”
a cseppentett folt átmérője: 375 µm



16. ábra – A cseppentés során a tű belemerül a PNS-oldatot tartalmazó mikrotiter tálca üregeibe, és a tű végére egy apró oldatcsepp kerül. A robotkar a szenzorchip fölé pozicionálja a tűt, majd hozzáérinti az arany felülethez, így a PNS szálakat tartalmazó csepp a szenzorchip felületére kerül.

- Mikrocsatornás tű:
Stealth Micro Spotting Pin

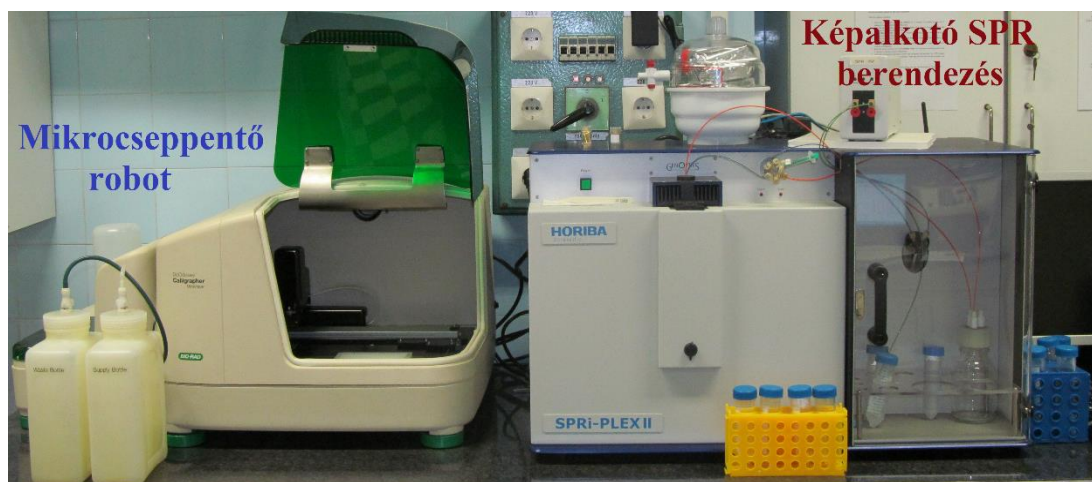
katalógus szám: SMP15
felszívási térfogat: 0,25 µL
a cseppentett folt átmérő: 500 µm



17. ábra – A cseppentés a kontakt tűhöz hasonlóan zajlik. Ez esetben azonban a kapilláris hatásnak köszönhetően a cseppentő tű mikrocsatornája is megtelik a PNS szálakat tartalmazó oldattal, így nagyobb térfogatú csepp juttatható a szenzorchip felületére.

➤ Egyéb fogyóeszközök:

A mikrocseppentéskor a különböző cseppentett oldatokat kis sűrűségű polietilénből készült mikrotiter tálca (Performa® DTR 384 Well Plate, EdgeBio) lyukaiba pipettáztam. Az SPR mérésekhez a HORIBA Jobin Yvon cég (*Palaiseau, Franciaország*) által forgalmazott *BioChip* és *Slide* elnevezésű szenzorchipet alkalmaztam. A Biochip esetében a planáris arany felületű szenzorchip (*Slide*) integrálva van a prizmával (*Etched Prism P1225*) (lásd 19. ábra). A *Slide* típusú szenzorchip és a prizma közötti „optikai illesztést” nagy törésmutatójú olajréteggel ($n_D = 1.642\text{--}1.700$) biztosítottam.



18. ábra – BioOdyssey™ Calligrapher™ MiniArrayer mikrocseppentő robot (bal) és Horiba SPRI-PLEX II képkalkotó felületi plazmon-rezonanciás berendezés (jobb) fényképe.

3.3.1 PNS szenzorchipek előállítása

A képkalkotó felületi plazmon-rezonanciás méréseknél planáris, aranyozott szenzorchipet használtam, amelynek felületét mikrocseppentő robot segítségével módosítottam a PNS felismerő szálakkal. A szenzorchip felületére a vizsgált mikroRNS-sel komplementer szekvenciájú PNS szálat kontakt cseppentő tű (375 μm átmérőjű cseppek), vagy mikroszatórnás tű alkalmazásával immobilizáltam (500 μm átmérőjű cseppek). A cseppentéskor a tiol-végcsoporttal rendelkező nukleinsavak spontán módon kötődnek az arany felületű szenzorchipen Au-S kötés kialakításával. A mikrocseppentő robot megfelelő programozásával biztosítottam annak lehetőségét, hogy mind a *BioChip*, mind pedig a *Slide* kialakítású szenzorchip felületét tudjam módosítani (19. ábra)



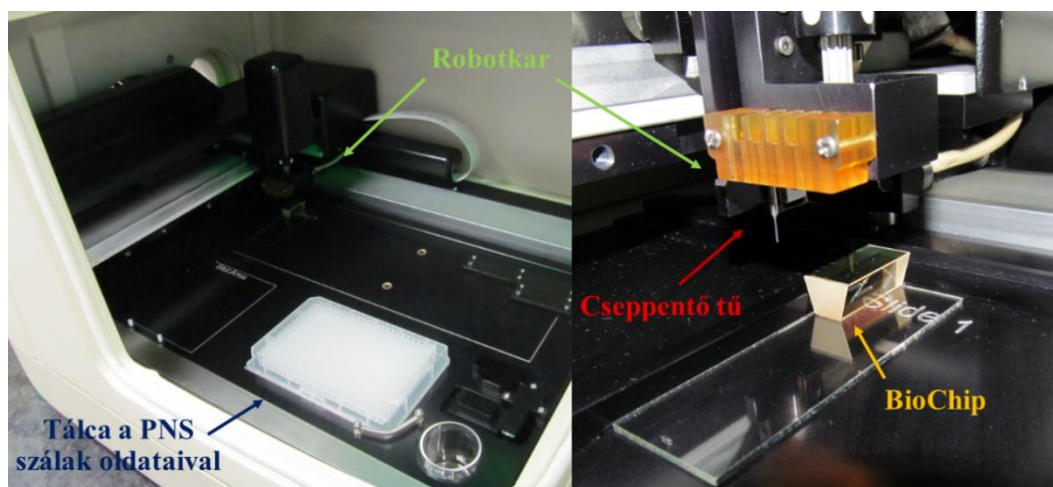
19. ábra – Prizma, Slide és BioChip. A jobb oldali szenzorchipen jól láthatóak a felcseppentett PNS foltok.

3.3.1.1 A PNS szálak mikrocseppentésének előkészítése

A mikrotiter tábla lyukainak a falát, amelyekbe a PNS-oldatokat helyeztem, 100 μ L Pierce© Protein free (TBS) blokkoló pufferrel 1 órán keresztül blokkoltam, majd 3 alkalommal 100 μ L ioncserélt vízzel mostam, és nitrogén gázzal szárítottam. A blokkolásra azért volt szükség, hogy a tábla lyukaiba helyezett oldatokból a PNS szálak ne adszorbeálódnak a tábla falára. A cseppentési tervnek megfelelően az egyes cellákba elkészítettem a felismerő szálakat tartalmazó, 20 μ L térfogatú oldatokat, amelyek elkészítéséhez 100 μ M-os PNS és DNS törzsoldatokat használtam. Ezeket a törzsoldatokat tisztaterű fülkében készítettem liofilizált nukleinsavak feloldásával RNáz-, DNáz-, és proteáz mentes vízzel. Az alkalmazott mikropipetta hegyeket ezt megelőzően UV sugárzással fél órán keresztül sterilizáltam.

Az immobilizálás során a PNS-t egyszálú, és a vizsgált mikroRNS-sel megegyező szekvenciájú DNS szállal előhibridizált formában is cseppentettem a szenzorchip felületére. Az utóbbi esetben a DNS-ből a PNS-re vonatkoztatva 20 mólszázalék felesleget alkalmaztam, így biztosítva, hogy a komplementer PNS-DNS szálak közötti rendkívül stabil kölcsönhatásnak is köszönhetően a PNS szálak hibridizált állapotban legyenek. Az oldatok bemérését követően a mikrotiter táblát 2 percen keresztül, 1500 rpm fordulatszámon centrifugáltam, hogy ne maradjon légbuborék az üregek alján vagy falán, mert ez befolyásolhatja a cseppentett folyadékmennyiséget.

3.3.1.2 PNS felismerő szálak immobilizálása a planáris arany felületre



20. ábra – BioRad Calligrapher™ mikrocseppentő robot kamrája (bal), cseppentő tű a BioChip-el (jobb).

A mikrocseppentés során különböző koncentrációjú, szekvenciájú, és jelöléssel ellátott PNS szálakat cseppentettem különböző összetételű puffer oldatokból arany szenzorchipek felületére. Ezeket az oldatokat a cseppentési tervnek megfelelően (lásd egy *BioChip* cseppentési tervét a 2. számú mellékletben) egy 384 lyukú tálca üregeibe táraztam be. A cseppentés első lépéseként beállítottam és a mikrocseppentő készülékkel állandó értéken tartottam az immobilizációhoz szükséges 15°C-ot és 65%-os relatív páratartalmat a műszer kamrájában (20. ábra), így biztosítva, hogy a néhány nanoliternyi folyadékcsepp ne párologjon el az arany felületről és a tiol-végcsoportot tartalmazó felismerő PNS szálak immobilizációja folyadék fázisban történjen.

A cseppentés során a tűt a robotkar a mikrotiter tálca egyik üregében található PNS-oldatba meríti, ekkor a tű alján egy néhány nL térfogatú csepp marad. Amikor a tű hegyét a robotkar hozzáérinti a szenzorchip felületéhez, akkor PNS-oldat átkerül az arany felületre. Amennyiben mikrocSATORNÁS tűvel dolgozunk, úgy a kapilláris hatásnak köszönhetően a tű belső üregébe is kerül PNS-oldat, ezáltal a cseppentett térfogat megnő. Ez az eljárás ismétlődik a cseppentés során úgy, hogy a különböző oldatok között a tű egy automatikus tisztítási lépésen esik keresztül annak érdekében, hogy elkerüljük a keresztszennyeződést.

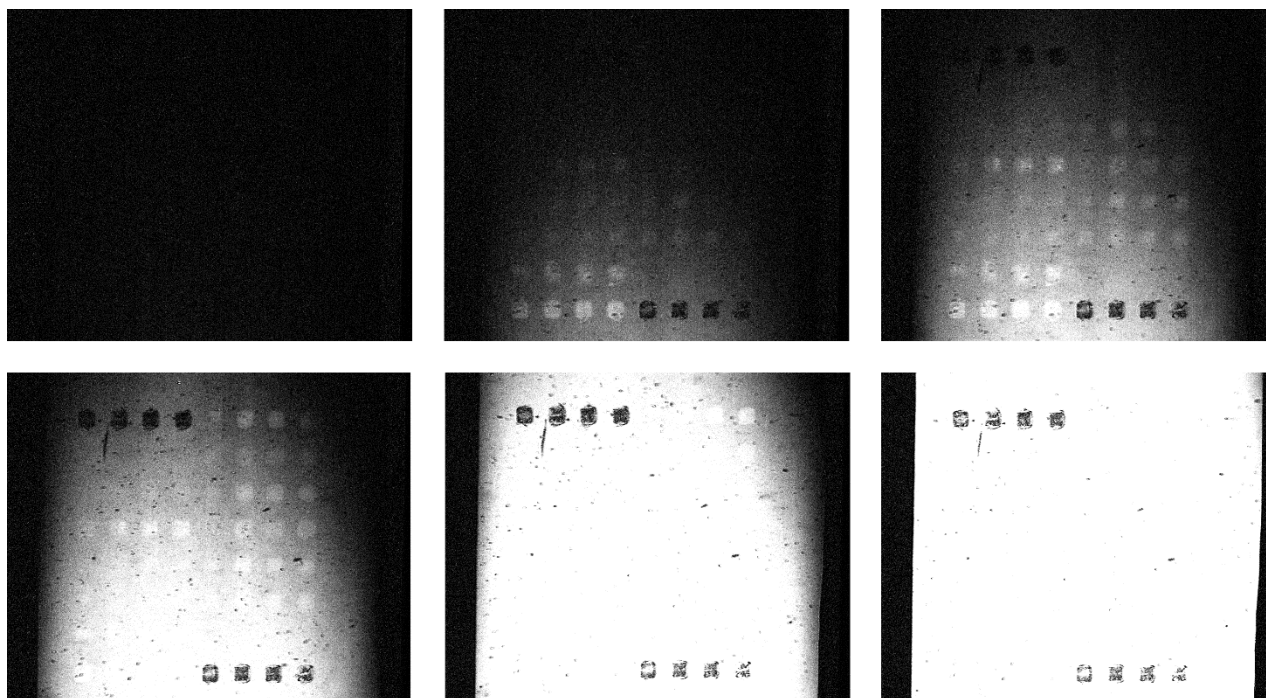
A szükséges immobilizációs idő (tipikusan 4-19 óra) után 1 mM-os MCH-oldattal (PBS pufferben oldva) 250 rpm-en rázva 15 percen keresztül blokkoltam (21. ábra) a *BioChip* vagy *Slide* felületét. A MCH egyrészt blokkolja a szabad arany felületet és ezáltal elkerülhető, hogy a mosási lépés során a különböző cseppekben található PNS felesleg keresztszennyeződést okozzon. Másrészt a MCH blokkolt felület ellenáll a nukleinsavak nem-specifikus kötődésének, azaz az SPR méréshez megfelelő referencia felületet biztosít. A tiol-csoport oxigénnel érintkezve oxidálódhat, ezért a MCH feloldása előtt a PBS puffert nitrogéngázzal oxigén mentesítettem.



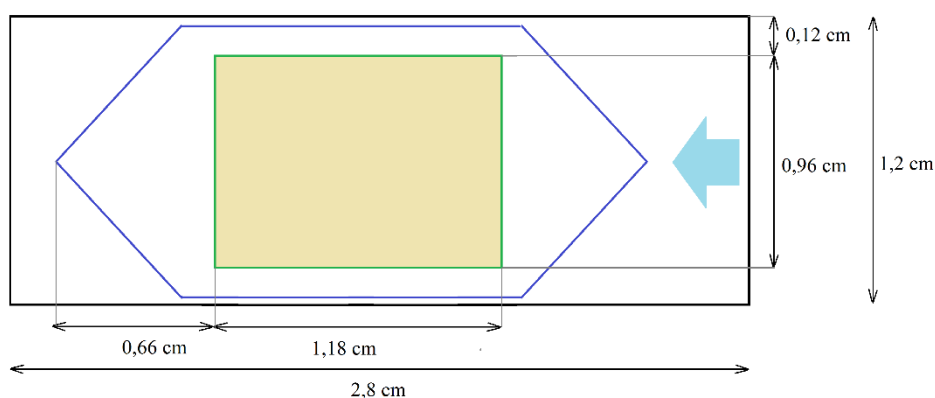
21. ábra – *BioChip* blokkolása 1 mM-os MCH-oldatban (PBS). A jobb oldalon látható, hogy a *BioChip* tisztításakor a felületre permetezett víz a cseppentett pontokat nedvesíti, míg máshonnan leperreg.

3.3.2 Képképző SPR mérések

Az SPR mérések során jellemzően PBS puffert használtam vivő oldatként, amelyet tipikusan 50 μL /perc sebességgel áramoltattam keresztül a mérőcellán. A mérőcella néhány tized milliméter magasságú, így az injektált oldat a cellában homogénen terül el (22. ábra). A cella méreteit a 23. ábra mutatja be.

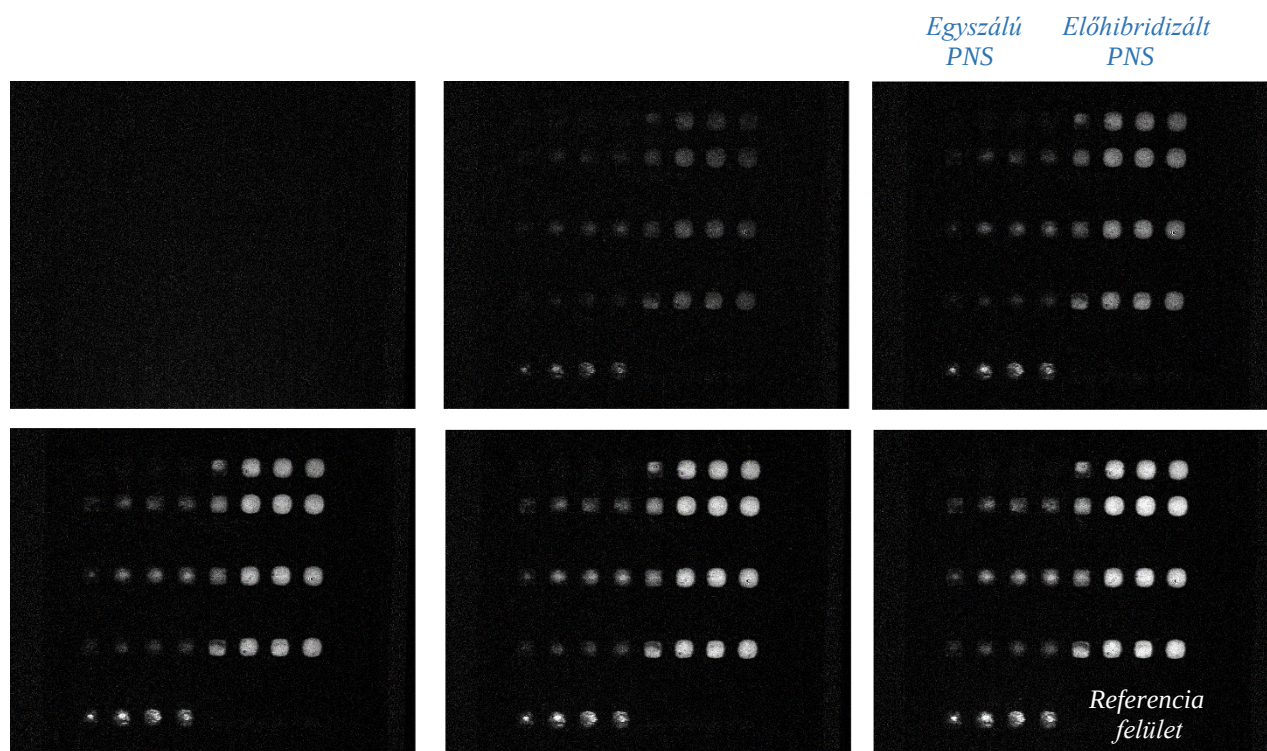


22. ábra – Az áramló PBS-nél nagyobb törésmutatójú oldal injektálásakor készült differenciális kép, ami az SPRi mérőcellába kerülő oldat áramlási profilját mutatja be (felvételek között eltelt idő 3 másodperc).



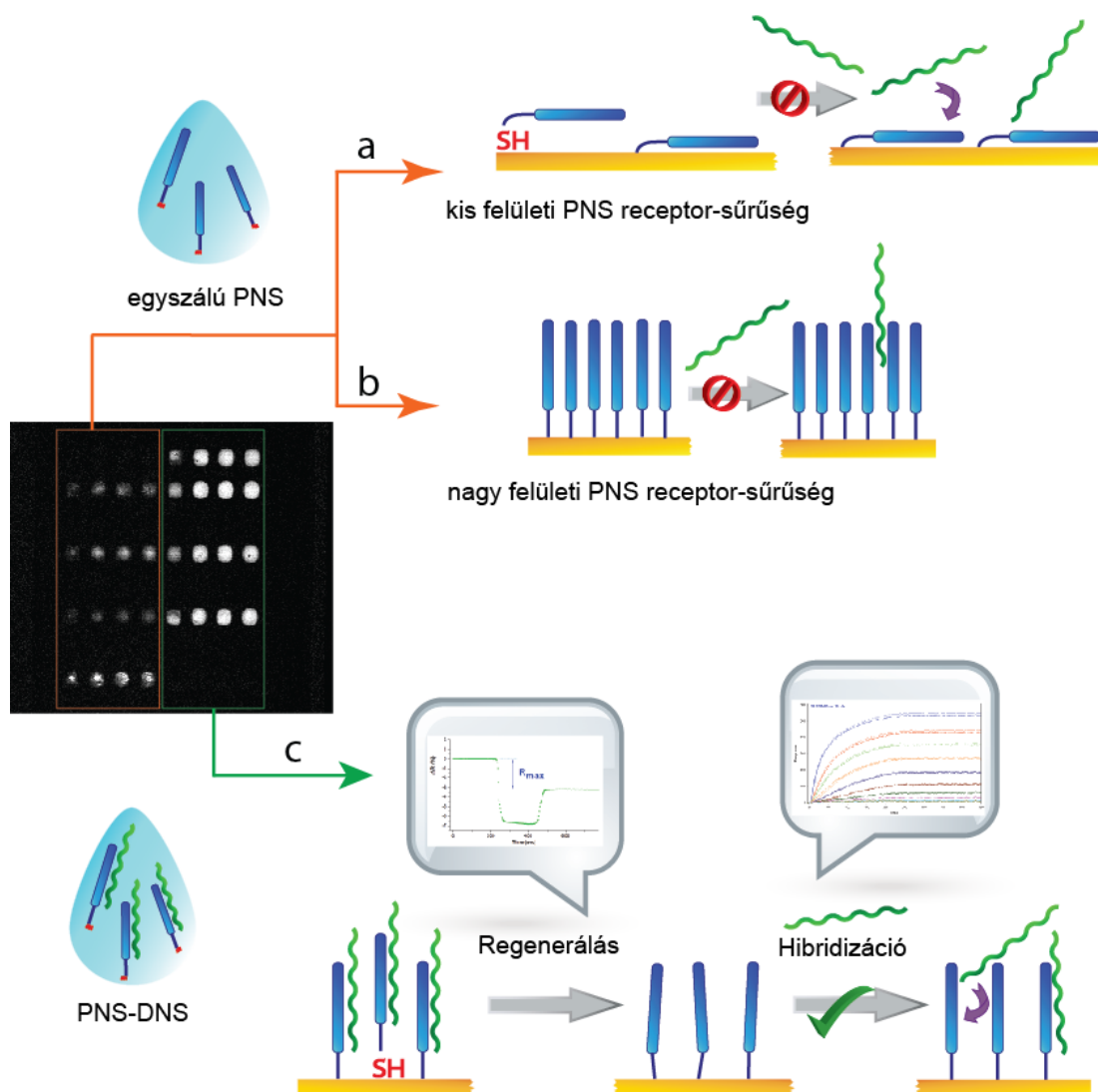
23. ábra – Az SPRi készülék cellája a szenzorhippellel (1,2cm X 2,8cm), kék színnel jelölve a műanyag tömítőgyűrű, sárga színnel a cseppentési felület.

A különböző koncentrációjú DNS-, vagy miRNS-oldatokat 180 μL térfogatban injektáltam a vivőoldatba egy kétállású, hat utas injektor segítségével. Az eltérő pufferek törésmutató-különbsége által okozott jelváltozást elkerülendő a DNS-, illetve mikroRNS-oldatokat is PBS pufferben állítottam elő tisztaterű fülkében. Az SPR mérést az alapvonal korrekcióhoz szükséges háttér felvételével kezdtem azaz PBS puffer injektálásával. A következő lépésben történt a vizsgált nukleinsavak injektálása és az asszociációs szakasz felvétele (3,6 perc), illetve a vivőoldatra való visszaváltás után a disszociációs szakasz felvétele (tipikusan 8-20 perc). A különböző minták injektálása között a felületet 100 mM NaOH-oldattal regeneráltam. Ekkor a pH megváltoztatásával az immobilizált PNS szálakhoz kötődő nukleinsavakat eltávolítottam és ezáltal a felületet alkalmassá tettem egy újabb kölcsönhatás vizsgálatára. A meghatározandó mikroRNS molekulák kötődése tehát valós időben követhető nyomon (24. ábra).



24. ábra – Az SPRi berendezés differenciális képén a mikroRNS molekulák hibridizációja a PNS felismerő szálakkal valós időben követhető nyomon (felvételek között eltelt idő 9 másodperc).

Kísérleti munkám egyik lényegi pontja volt, hogy teszteljem hipotézisünket miszerint az előhibridizált formában immobilizált PNS szálak esetében a hibridizációs hatékonyság megnő. Ehhez természetesen a mérések előtt a DNS szálakat el kell távolítani a felismerő molekulákról, hogy az immobilizált PNS szálak alkalmasak legyenek a vizsgált nukleinsavakkal való kötődésre. Ennek megfelelően kétféleképpen immobilizáltam a PNS felismerő szálakat (25. ábra). Egyrészt egyszálú formában (ssPNS – single-stranded PNA), másrészt pedig a komplementer szekvenciájú DNS szállal előhibridizálva (phPNS – pre-hybridized PNA).



25. ábra – Egyszálú és előhibridizált PNS immobilizálása. Az egyszálú PNS esetében a PNS-oldat koncentrációjától függően (a) túl kis felületi receptor-sűrűségű réteg alakulhat ki, vagy (b) túl kompakt réteg jöhet létre, így mindkét esetben gátolva a komplementer mikroRNS hibridizációját. Előhibridizált formában (c) történő cseppentés esetében a hibridizációhoz optimális felületi receptor-sűrűség tud kialakulni.

Látható a 25. ábrán összefoglalt lehetőségek alapján, hogy az egyszálú PNS immobilizálása esetében kis PNS koncentrációk alkalmazásakor a PNS szálak a bázisaikon keresztül nem-specifikusan kötődhetnek a felületen (*a*-eset), így drasztikusan lecsökken hibridizációs hatékonyságuk. Ugyanakkor, ha a PNS-oldat koncentrációját megnöveljük (*b*-eset), akkor könnyebben kialakulhat egy kompakt réteg, amely megint csak nem optimális a hibridizáció szempontjából, ugyanis a nukleinsavak kötődése szterikusan gátolt lesz az analát molekulák elektrosztatikus taszítása miatt.

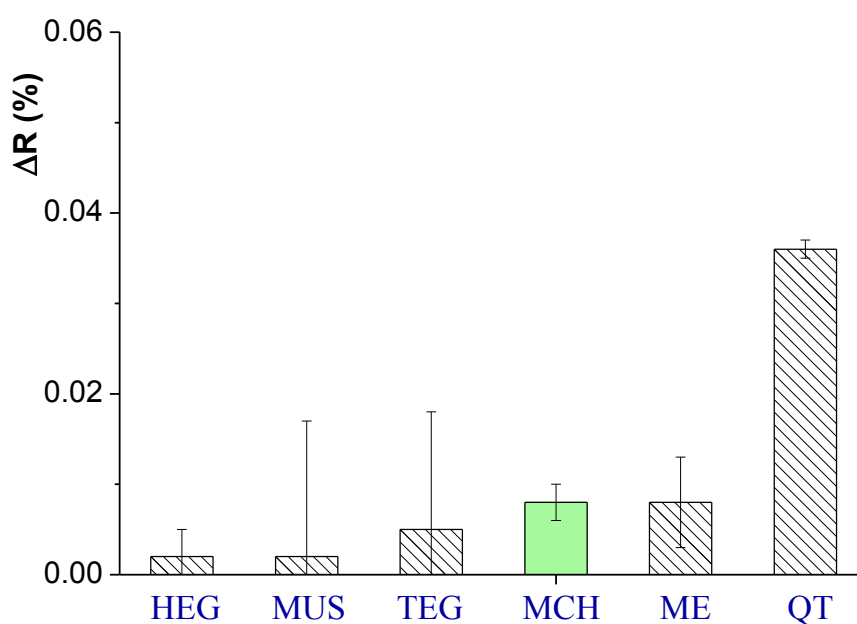
Az általunk javasolt módszer esetében (*c*-eset), nevezetesen, hogy a komplementer szekvenciájú DNS szállal előhibridizált formában immobilizálunk, az előhibridizált PNS egyrészt kevésbé adszorbeálódik a felületen, amely annak köszönhető, hogy az ezt kiváltó funkciós csoportok a komplementer szekvenciával kialakított nem kovalens kötésekben vesznek részt. Másrészt nagy PNS koncentrációk esetében sem alakulhat ki túl kompakt monoréteg tekintettel a PNS szálakhoz hibridizált nukleinsav szálak távtartó szerepére. A kettős szál negatív töltésének köszönhetően egymástól optimális távolságban tudnak csak a felületre kötödni a PNS szálak, így a későbbi hibridizáció során sem okoz problémát a DNS-, illetve mikroRNS szálak elektrosztatikus taszítása.

A prehibridizált PNS immobilizálása után a felületet 100mM-os NaOH-oldattal kezeltem, hogy a komplementer nukleinsav eltávolítása után a felismerés szempontjából aktív, egyszálú PNS molekulák legyenek csak a felületen. Ekkor információt nyerhetünk az R_{max} értékére vonatkozólag, amely a PNS réteg telítettségét jellemzi a komplementer nukleinsav szálakra nézve. Ennek pontos ismerete a PNS-nukleinsav komplex stabilitási állandójának meghatározásához nélkülözhetetlen. A PNS felület aktiválást követően méréseim során első körben a hsa-miR-208a mikroRNS-sel megegyező szekvenciájú DNS szálakat használtam, majd az optimált körülmények között vizsgáltam a mikroRNS modellvegyületet, ezek kötődésének hatékonyságát a felismerő szálakhoz, valamint kinetikájukat. Erre azért volt szükség, mert a DNS szálak sokkal kevésbé érzékenyek a nukleázok katalizálta bomlásra, mint az RNS szálak.

A CCD kamera differenciális képén szemmel is jól látható (24. ábra és 25. ábra), hogy a chip melyik pontjain kötődik több nukleinsav szál (ez esetben ugyanis a nagyobb törésmutató változás miatt a folt világosabb lesz).

4.1.1 A nem-specifikus adszorpciónak ellenálló referencia felületek kialakítása

A nukleinsav-oldatok injektálásakor a nem-specifikus adszorpció elkerülése érdekében a cseppentett PNS foltok között szabadon maradt arany felületet blokkolni kell. Ennek megvalósítására különböző funkciós csoportokkal rendelkező tiol-származékokat vizsgáltam: HEG; MUS; TEG; MCH; ME; QT. A megfelelő vegyület kiválasztásához ezek PBS pufferben oldott, 1 mM koncentrációjú oldatait cseppentettem, majd az így elkészített szenzorchipen 100 nM-os koncentrációjú DNS-oldat injektálásakor határoztam meg a nem-specifikus kötődést. A mérési eredményeket a 26. ábra mutatja be.



26. ábra – DNS szálak nem-specifikus adszorpciójának vizsgálata SPRi módszerrel. A mérés során 100 nM-os koncentrációjú DNS-oldatot injektáltam különböző tiol-származékokkal blokkolt arany felületen.

HEG: (11-merkaptoundecil)-hexa(etilénglikol); MUS: 11-merkaptoundekán sav;

TEG: (11-merkaptoundecil)-tetra(etilénglikol); MCH: 6-merkaptó-1-hexanol;; ME: 2-merkaptó-etilamin;

QT: (11-merkaptoundecil)-N,N,N-trimetilammónium-bromid.

Az ábrán jól látható, hogy egyik tiol-származék esetében sem mérhető szignifikáns (0,05%-nál nagyobb mértékű) törésmutató változás, így tulajdonképpen mindegyik tiol alkalmas a felület blokkolására. A (11-merkaptoundecil)-N,N,N-trimetilammónium-bromid (QT) esetében azért mérhetünk nagyobb jelet, mert a pozitív töltésű kvaterner ammónium vegyület és a negatív

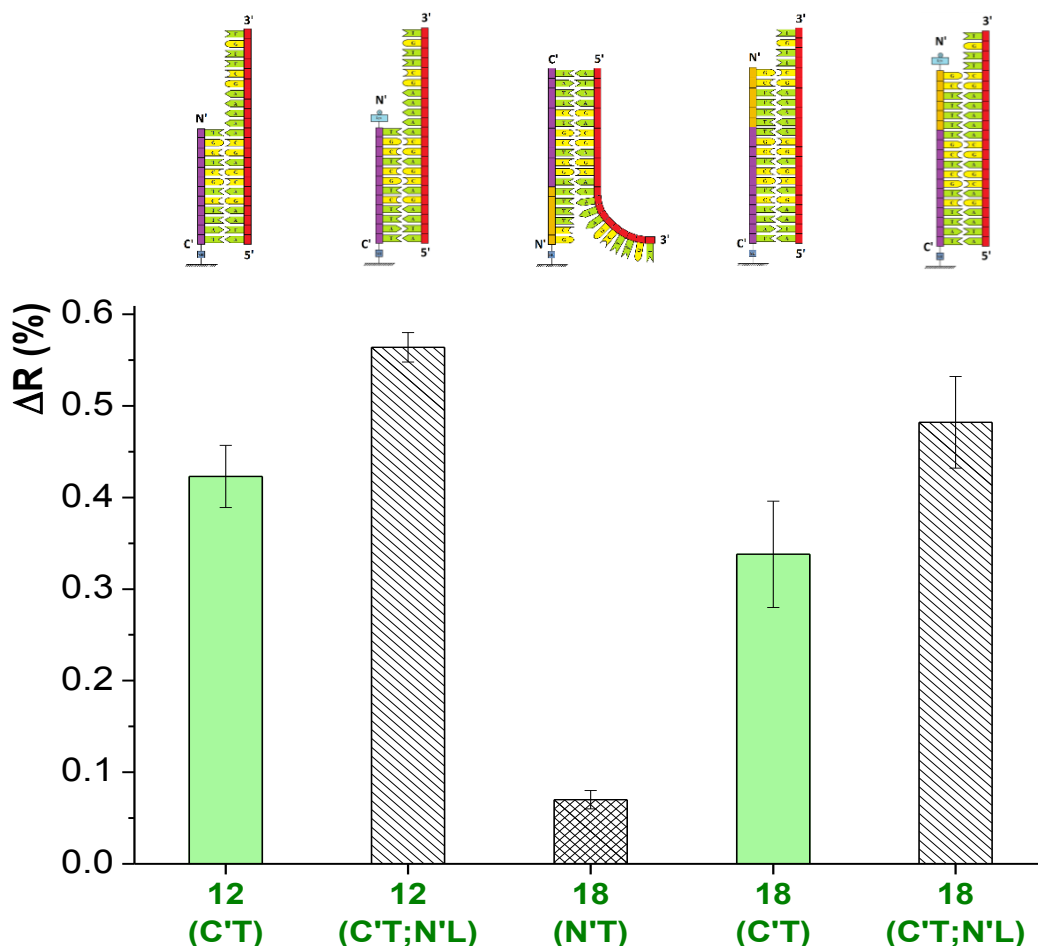
töltésű DNS szál között elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel, így nagyobb nem-specifikus kötődést idéznek elő. A vizsgált tiolok közül a későbbi blokkolási kísérletekhez a 6-merkaptó-1-hexanolt (MCH) választottam (1 mM-os koncentrációban, PBS pufferben oldva), mint a legköltséghatékonyabb és legjobb reprodukálhatóságot biztosító alternatívát. Ezen felül a többi tiollal a tapasztalataink szerint stabilitási problémák vannak, a levegő oxigénjének hatására néhány hónap tárolás alatt a tiol-csoport oxidálódik, így alkalmatlanná válik az arany felületre történő kikötésre, ezáltal a blokkolásra.

4.1.2 Különböző PNS szálak előzetes vizsgálata

Az immobilizálás körülményeinek a vizsgálatához egy rövidebb, 12 bázis, és egy hosszabb, 18 bázis hosszúságú PNS szálát vizsgáltam (a pontos szekvenciák a kísérleti részben). Ezek közül mindkét hosszúságban volt olyan PNS szál, amelynek N'-terminális része egy pozitív töltésű lizin molekulával volt módosítva (N'L). Ilyen lizin végcsoporttal gyakran módosítják a PNS szálakat, hogy növeljék vízdékonyságukat, vagy, hogy további kémiai módosításokra adjanak lehetőséget. A PNS szálak elvileg az antiparallel nukleinsav szekvencia mellett képesek a paralel szekvenciákat is felismerni, ezért vizsgálataimat kiterjesztettem egy ilyen 18 bázis hosszúságú szálra is, amelyet az N'-terminálisán keresztül immobilizáltam az Au felületre (N'T), szemben az összes többi PNS szállal, amelyek a C'-terminálisán keresztül lettek immobilizálva (C'T). A cseppentés során 10 μ M koncentrációjú, PBS-ben feloldott, különböző anyagi minőségű, egyszálú PNS felismerő molekulákat immobilizáltam kontakt tű segítségével az aranyozott chip felületére 19 órán keresztül. A 18 bázis hosszú, N'-terminálisán kikötött PNS szálon (18 N'T) éppen csak szignifikáns a törésmutató változás (27. ábra). Fontos megemlíteni a kismértékű hibridizáció megértéséhez, hogy a PNS felismerő szál 18 bázis hosszú, míg a DNS szál 22 nukleotidból áll. Hibridizáció során a DNS szál 4 db. nukleotidból álló szegmense, amely nem vesz részt a hibridizációban, a felület felé néz sztérikusan gátolva a hibridizációt (lásd az 1.sz. melléklet).

Jól látható, hogy a 12 bázis hosszú felismerő szálakon nagyobb törésmutató változás mérhető, mint a megfelelő módosítású hosszabb PNS szálakon. Ez nem várt eredmény, hiszen a 18 bázis hosszú PNS szálak esetében a PNS-DNS közti kölcsönhatás elméletig erősebb. Mint későbbi kinetikai kísérleteink kiderítették ez a PNS szálak nem megfelelő felületi sűrűsége miatt van. A rövidebb szálak könnyebben és gyorsabban tudnak a hibridizációhoz megfelelő orientációba kerülni. A lizin végű (N'L) PNS szálakon valamivel nagyobb törésmutató változás mérhető, mint a lizin módosítás nélküli, de azonos bázis hosszú PNS-ek esetében. Ez vélhetően a pozitív töltésű

felület a negatív töltésű DNS szálakra nézve nagyobb affinitásának köszönhető, de az is lehet, hogy a pozitív töltésű PNS-ek közötti elektrosztatikus taszítás optimálisabb felületi sűrűség kialakulásához vezet. Az előzetes mérések azt mutatják, hogy az antiparallel PNS szálon kívül mindegyik PNS alkalmas a további vizsgálatokra. A továbbiakban részletes vizsgálatokat a 18 bázis hosszúságú PNS szálakkal végeztem, mert várható volt, hogy optimált immobilizálás esetében ezek a szálak fogják a legnagyobb affinitást és szelektivitást biztosítani.

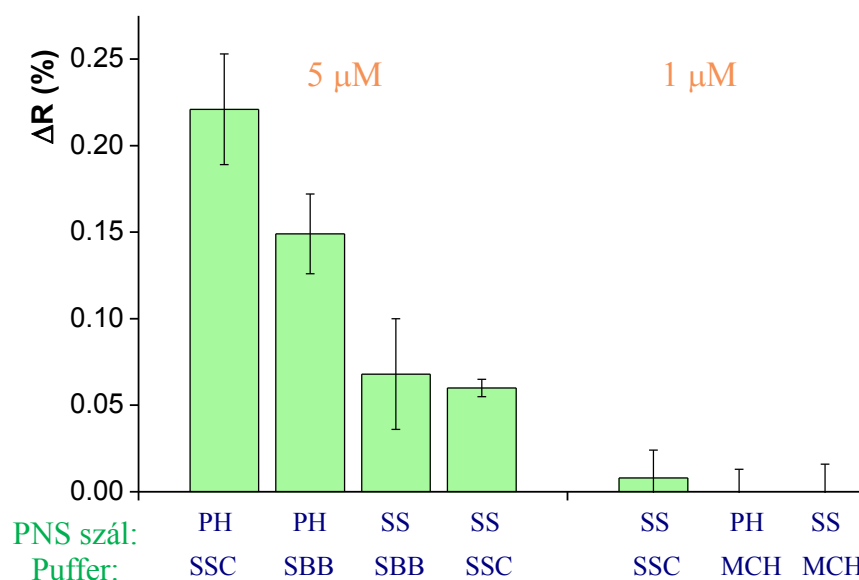


27. ábra – SPR válaszjel különböző PNS szálak esetében 100 nM koncentrációjú komplementer DNS-oldat hatására. (A felületre 10 μ M koncentrációjú PNS-oldatokat cseppentettem kontakt tűvel, amelyeket 19 óráig inkubáltam). Jelmagyarázat: 12, 18 a PNS szál bázis hosszúsága; C'T=C' terminális tiol-végcsoportján keresztül immobilizáltam; N'T=N' terminális tiol-végcsoportján keresztül immobilizáltam; N'L=N' terminális lizin.

4.1.3 PNS szálak immobilizációjának vizsgálata

További méréseim során tehát 18 bázis hosszú, C'-terminálisán keresztül felületre immobilizált PNS szálak hibridizációs tulajdonságait vizsgáltam. A felületi receptor-sűrűség optimalizálásának érdekében 10 μ M helyett 5 μ M-os koncentrációban cseppentettem PNS-oldatokat

különböző pufferekben. Elméletünk igazolására, miszerint előhibridizált formában érdemes a felismerő szálakat immobilizálni, a PNS szálakat az egyszálú (SS) formán felül a komplementer szekvenciájú DNS szállal előhibridizált (PH) formában is immobilizáltam, illetve az irodalomban leírtak alapján vizsgáltam a hígabb PNS-oldatok cseppentésének lehetőségét 1 mM-os koncentrációjú 6-merkaptó-1-hexanol (MCH) oldattal történő együtt-immobilizálás során (PBS pufferben oldva).

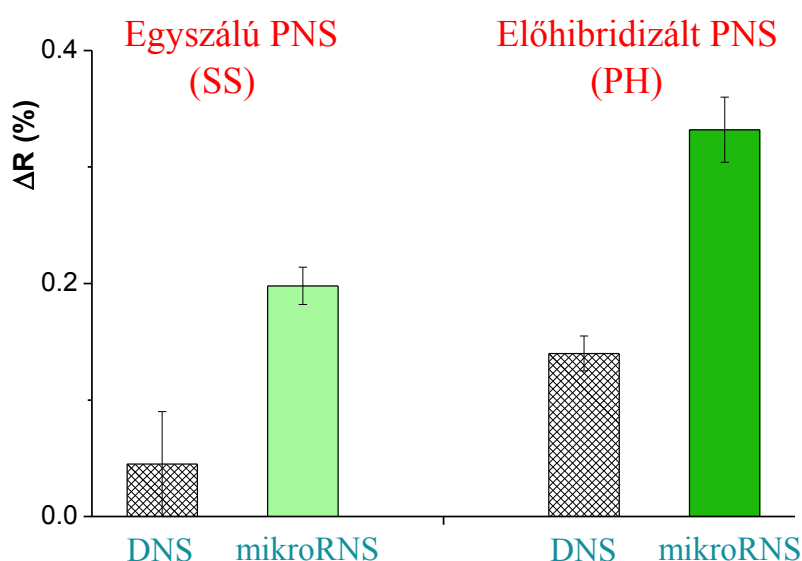


28. ábra - Hibridizációs hatékonyság összehasonlítása 18 bázis hosszú, kontakt tűvel cseppentett, 19 órán keresztül immobilizált egyszálú (SS), előhibridizált (PH) és 6-merkaptó-1-hexanollal együtt-immobilizált (MCH, PBS-ben oldva) PNS foltokon. A kikötési technikákat 100 nM koncentrációjú DNS-oldat injektálásakor mérhető relatív törésmutató változással vizsgáltam. SSC: citrát puffer; SBB: borát puffer.

Az eredményekből jól látható (28. ábra), hogy MCH-al együtt-immobilizált egyszálú-, és előhibridizált PNS szálak esetében sem mérhető a DNS kötődése, annak ellenére, hogy gyakran alkalmazzák ezt az eljárást tiol-jelölésű nukleinsavak immobilizálására. Az eredmény nem meglepő, ha tudatosítjuk, hogy a tiol-származékok kötődése az arany felülethez kompetitív jellegű. A kisebb méretű és kétszázszoros feleslegben alkalmazott MCH mellett a PNS szálak kötődése az Au felületre elhanyagolható mértékű. Ami fontos viszont, hogy az előhibridizált formában cseppentett PNS szálaknál a várakozásainknak megfelelően sokkal nagyobb hibridizációs határfok érhető el. Így tehát érdemes tovább vizsgálni a kétféle formában történő immobilizációs módszert különböző pufferekben az eltérő hosszúságú PNS felismerő szálak esetében is.

Megvizsgáltuk az azonos hosszúságú és szekvenciájú DNS és mikroRNS szálak kötődését a különböző módszerekkel optimált PNS szálak esetében. Ennek érdekében meghatároztuk a

100 nM-os DNS-, illetve mikroRNS injektálásakor bekövetkezett törésmutató változás értékeit. Mérési eredményeimet a citrát pufferben immobilizált 12 és 18 bázis hosszú PNS szálakra a 29. ábra mutatja be. Jól látható, hogy egyszálú-, és előhibridizált formában immobilizált felismerő szálak foltjain egyaránt nagyobb törésmutató változások mérhetőek a mikroRNS szálak esetében azonos koncentrációjú DNS-oldattal összehasonlítva. A jelenséget a későbbiekben könnyebben megérthetjük majd a PNS-DNS illetve a PNS-mikroRNS kölcsönhatás egyensúlyi állandójának vizsgálatával. A továbbiakban tehát mikroRNS-oldatok injektálásával vizsgáltam a felismerő szálak hibridizációs tulajdonságait, melynek köszönhetően a különböző módszerek közötti különbségek nagyobb érzékenységgel követhetőek nyomon.

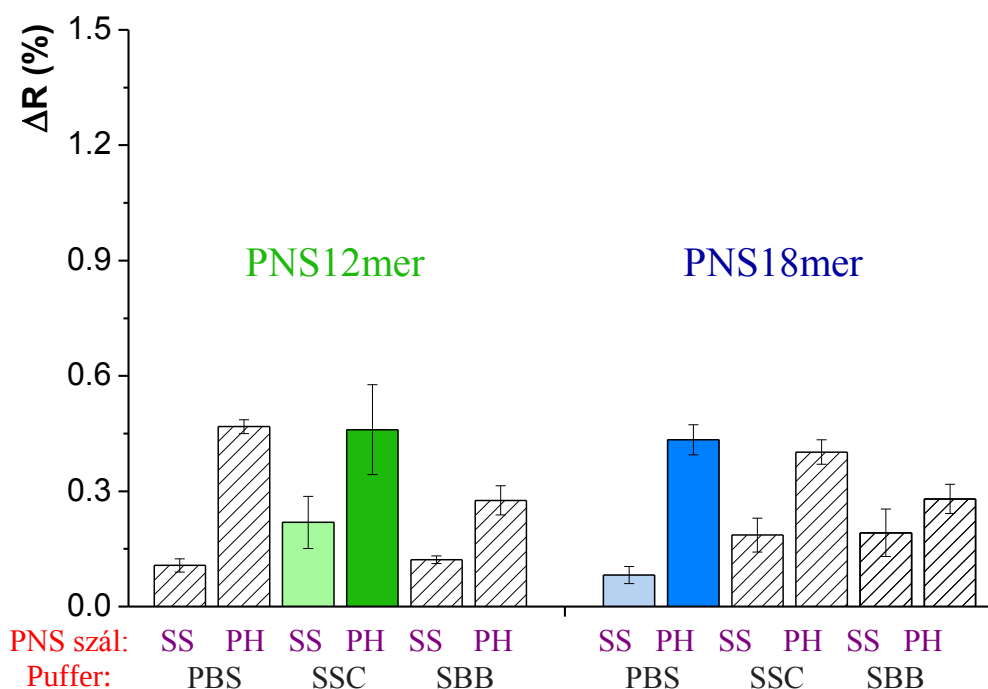


29. ábra - Hibridizációs hatékonyság vizsgálata 100 nM koncentrációjú DNS-, és mikroRNS-oldatok injektálásakor. A kötődést 18 bázis hosszú PNS szálakon vizsgáltam, melyeket citrát pufferben kontakt tűvel cseppentettem, és 19 órán keresztül immobilizáltam.

A további vizsgálatok során célom volt, hogy megtaláljam azt az oldatösszetételt, és immobilizációs technikát, amellyel az immobilizált PNS felismerő szálak felületi sűrűsége a legoptimálisabb, és a mikroRNS-sel megvalósuló hibridizáció hatásfoka maximális. Ennek céljából különböző pH-jú és ionerősségű pufferekben cseppentettem fel a felismerő szálakat egyszálú-, és előhibridizált formában. Az 5 μ M koncentrációjú PNS-oldatok cseppentéséhez kontakt tűt használtam, és 19 órán keresztül hagytam immobilizálni a felismerő szálakat. A mérési eredményeimet a 30. ábra mutatja be.

Jól látható, hogy az előhibridizált formában cseppentett felismerő szálak foltjain érhető el optimális felületi receptor-sűrűség, hiszen itt mértünk nagyobb törésmutató változásokat a

100 nM-os koncentrációjú DNS-oldat injektálásakor a 12-, és 18 bázis hosszú PNS szálak esetén egyaránt.



30. ábra - Hibridizációs hatékonyság összehasonlítása 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor, eltérő hosszúságú (12 vagy 18 bázis), 5 μ M koncentrációjú, különböző pufferekben elkészített (foszfát-, citrát-, illetve borát pufferek) oldatokból kontakt tűvel cseppentett, 19 óra immobilizációs idő után kialakult PNS foltokon. Az egyszálú formában cseppentésnél minden esetben egyértelműen jobbnak bizonyult az előhibridizált formában történő immobilizációs technika. A zöld és kék színű kiemelés a különbségek szemléltetésére szolgál.

A foszfát-, és citrát pufferekben előhibridizált formában immobilizált PNS pontok között nincsen szignifikáns különbség a hibridizációs hatásfokot vizsgálva, azonban borát pufferben kisebb törésmutató változások mérhetőek. Ennek valószínűleg az lehet az oka, hogy 10,0-es pH-n a PNS gyengén negatív töltésű, így a felületre kötődéskor egymástól távolabb helyezkednek el, így kisebb a felületi receptor-sűrűségük. Egyszálú formában immobilizálva őket azonban a negatív töltésüknek köszönhetően kevésbé hajlamosak a felületen elfeküdni, így a PBS-ben mérhető értékeknél nagyobb lesz a felismerő réteg hibridizációs hatékonysága. Citrát pufferben cseppentve az egyszálú PNS szálaknál azért mérhető javulás, mert az SSC puffer 300 mM koncentrációjú NaCl-ra nézve, így az immobilizáció során az elektrosztatikus kölcsönhatások a nagyobb ionerősség miatt nem érvényesülnek, tehát a PNS gyengén pozitív töltése és az arany negatív töltése közötti elektrosztatikus vonzást a nagyobb ionerősség leárnyékolja.

Az egyszálú (SS) és prehibridizált (PH) formák között a legnagyobb különbség PBS pufferben mérhető. A 10 mM-os PBS puffer pH-ja (7,4) és ionerőssége (137 mM NaCl,

2,7 mM KCl) áll a legközelebb a fiziológias körülményekhez. Ennek alapján érdemes ilyen körülmények között tovább optimalni a szenzorchipet, hogy valós, klinikai minták vizsgálatára a legalkalmasabb immobilizációs és hibridizációs körülményeket teremtsük meg.

4.1.4 A mikrocseppentésre alkalmazott tű hatása a PNS szálak hibridizációs hatékonyságára

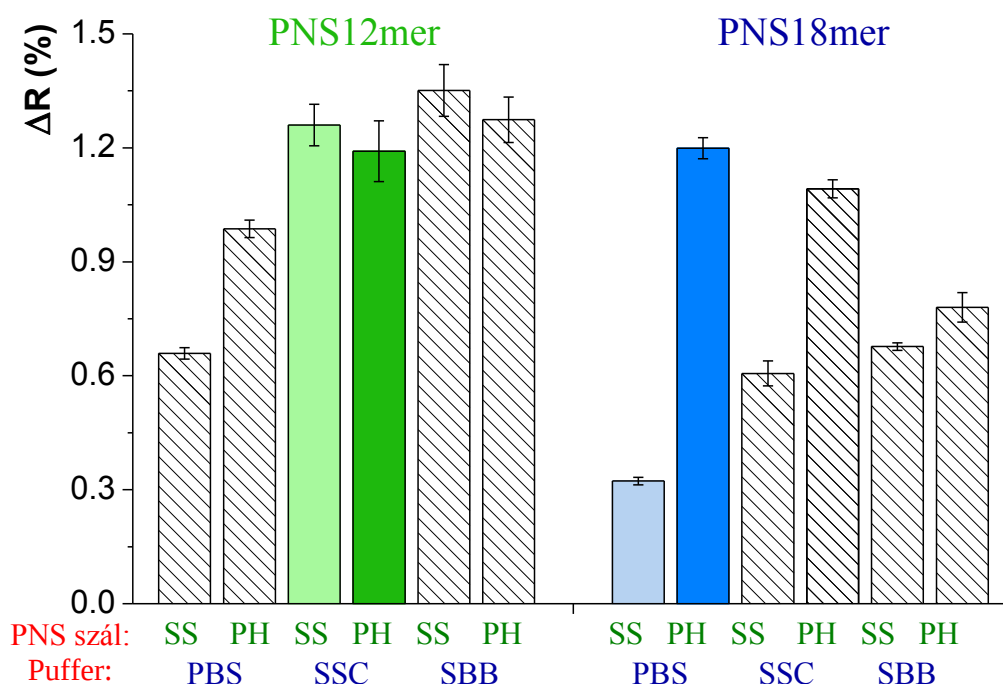
A kontakt tű segítségével az arany felületre viszonylag kis mennyiségű PNS-oldat cseppenthető, így felmerül annak a veszélye, hogy az immobilizáció során a kis térfogatú cseppek beszáradnak, így nem tud lejátszódni a folyadékfázishoz kötött immobilizáció, illetve előfordulhat, hogy az immobilizáció hatásfokát a cseppentett oldatban található PNS szálak mennyisége limitálja. A továbbiakban tehát célom volt a cseppentett oldatok térfogatának növelése, így a kontakt tű helyett egy mikrocsonát tartalmazó tűvel készítettem el a szenzorchipeket.

Cseppentéskor, a mikrocsonát tű (MSP – *micro spotting pin*) oldatba érintése során, a benne található vékony furatba a kapilláris erő következtében nagyjából 250 nL térfogatú oldat kerül. Ennek következtében nagyobb térfogatú PNS-oldat cseppenthető le, amelytől egy optimálisabb felületi borítottság kialakulását vártam. Ezt a feltételezést részben bizonyítja a 31. ábra.

Jól látható, hogy a korábbi mérésekhez képest ($\Delta R < 0,5\%$) sokkal nagyobb (kb. kétszeres), törésmutató változások mérhetőek a 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor, ami egyértelműen annak köszönhető, hogy a felületre nagyobb térfogatban cseppentettük a felismerő szálakat tartalmazó oldatokat.

A vizsgálat első ránézésre azonban meglepő eredményeket is szolgáltat, miszerint a 12 bázis hosszú felismerő szálak pontjain, a PBS pufferben cseppentett esetet leszámítva, jóformán nincsen szignifikáns különbség az egyszálú-, illetve előhibridizált formában cseppentett pontok között, míg a 18 nukleotidból álló PNS szálak esetében van. A jelenséget magyarázná, hogy a rövidebb PNS szálak rendeződése a felületen gyorsabban végbemegy a molekulaméretnek köszönhetően, hiszen az immobilizáció során az elfekvés (*lying-down*) szakaszából könnyebben kerülnek a felismerő szálak a felületre merőleges pozícióba. Ennek oka, hogy az arany réteghez gyengébben kötődnek, hiszen kevesebb szerves bázis adszorbeálódik a felületre. Ez a rendeződés a 18 bázis hosszú, szelektívebb felismerést biztosító PNS szálak esetében kisebb mértékben következik be. Ezt

alátámasztani látszik, hogy a 18 bázis hosszú PNS szálak esetében jelentős különbség van a két különböző formában immobilizált PNS szálak esetében a prehibridizált forma javára.

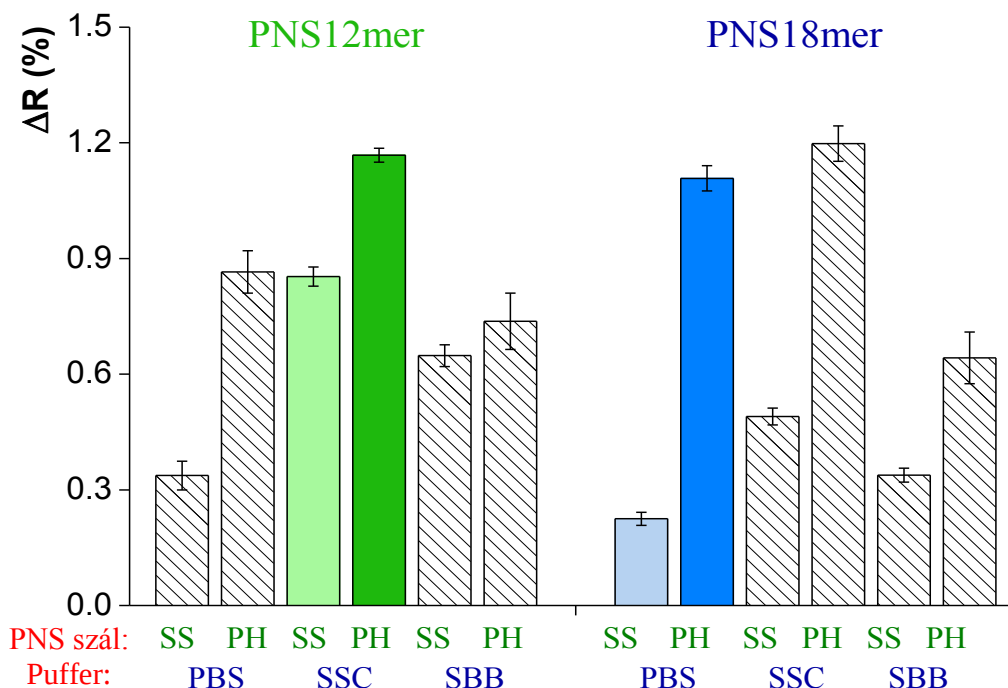


31. ábra – A mikrocsatornás tű segítségével cseppentett felismerő réteg hibridizációs hatékonyságának összehasonlítása 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor, eltérő hosszúságú (12 vagy 18 bázis), 5 μM koncentrációjú, különböző pufferekben elkészített (foszfát-, citrát-, illetve borát pufferek) oldatokból, 19 óra immobilizációs idő után kialakult PNS foltokon. Csak a 18 bázis hosszú felismerő szálak esetében (kék oszlopok) bizonyult jobbnak az előhibridizált formában történő immobilizációs technika, a 12 bázis hosszú PNS szálaknál (zöld oszlopok) nem.

Tekintettel arra, hogy a rendeződés a felületen egy időfüggő folyamat, amely jelen esetben 19 órán keresztül zajlott le, felmerül a kérdés, hogy mi történik akkor, ha csökkentjük az inkubálás időtartamát?

4.1.5 Inkubálási idő vizsgálata

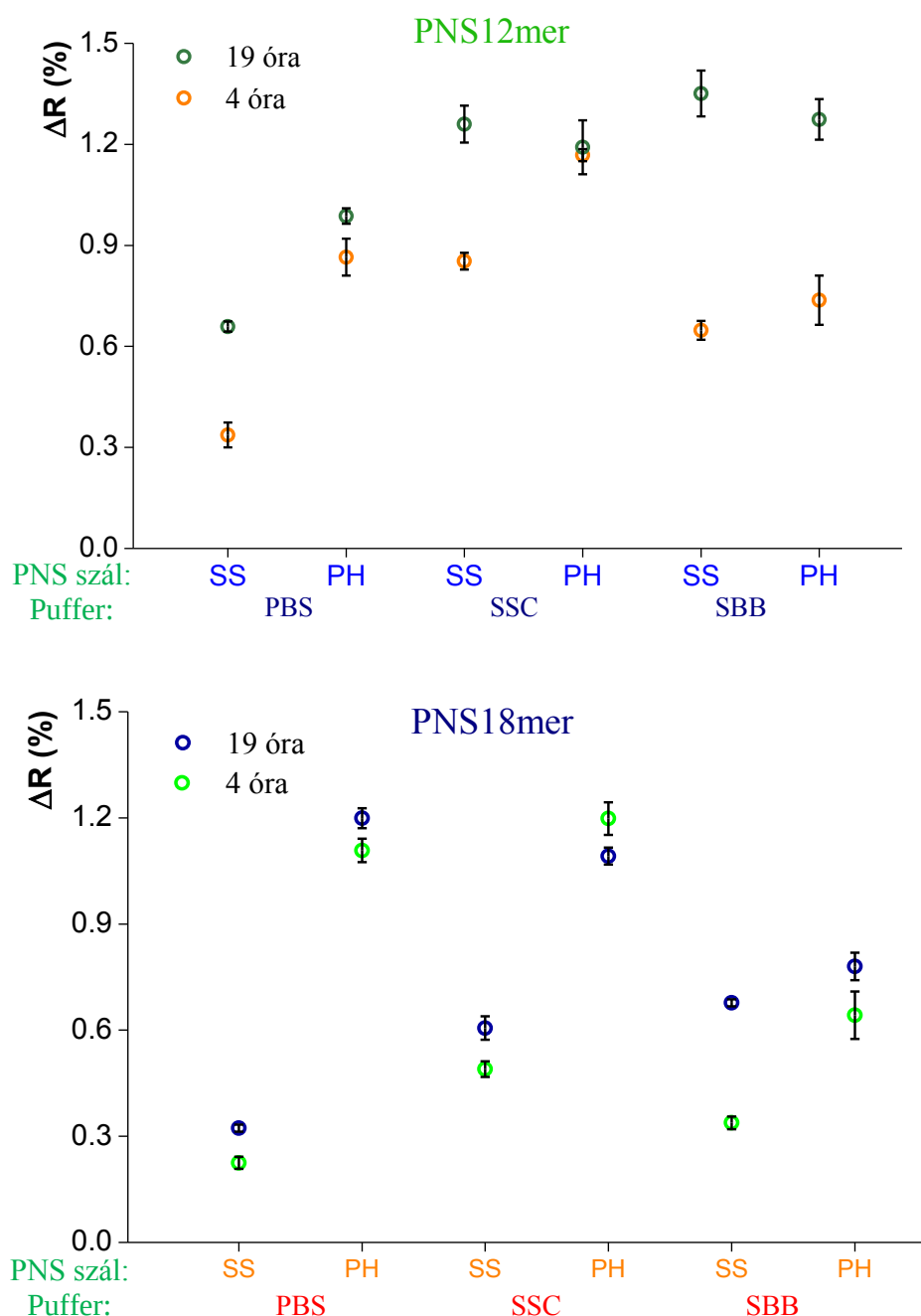
Következő szenzorchipem elkészítése során már csak 4 órán keresztül inkubáltam a biochipet a cseppentést követően. Vizsgálatom célja az előző pontban kifejtett feltételezés bizonyítása. Kérdés, hogy az immobilizációs idő csökkentésével sikerül-e differenciálni az egyszálú-, és előhibridizált formában kikötött, 12 bázis hosszú PNS szálak pontjai között. A mérési eredményeiket a 32. ábra mutatja be.



32. ábra – A mikrocsatornás tű segítségével cseppentett felismerő réteg hibridizációs hatékonyságának összehasonlítása 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor, eltérő hosszúságú (12 vagy 18 bázis), 5 μM koncentrációjú, különböző pufferekben elkészített (foszfát-, citrát-, illetve borát pufferek) oldatokból, 4 óra immobilizációs idő után kialakult PNS foltokon. A 12 bázis hosszú (zöld oszlopok), és a 18 bázis hosszú (kék oszlopok) felismerő szálak esetében is jobbnak bizonyult az előhibridizált formában történő immobilizációs technika.

A diagramon látható, hogy rövidebb inkubációs idő esetében van különbség az egyszálú-, és előhibridizált formában cseppentett 12 bázis hosszú felismerő szálak hibridizációja között. Ez alátámasztja a feltételezésünket, hogy a PNS szálak rendeződése a felületen egy időfüggő folyamat. A rendeződés növeli a hibridizációs hatékonyságot, de az időtartam növelése csak a rövidebb, 12 bázis hosszú PNS szálak esetében okoz jelentős hibridizációs hatékonyság növekedést az egyszálú PNS szálak immobilizálásakor. A PNS szálak előhibridizált formában való cseppentése viszont lecsökkenti ezt az időfüggőséget, hiszen sokkal hosszabb immobilizációs időt választva (19 óra) sem érhetünk el jelentős hibridizációs hatásfok növekedést. Ennek megfelelően a továbbiakban elegendő 4 órán keresztül inkubálni a szenzorchipet a cseppentést követően.

Az egyszálú formában cseppentett, 12 bázis hosszú PNS felismerő szálaknál az immobilizációs idő növelésével nagymértékben javítható a foltok hibridizációs hatékonysága, a 18 nukleotidból álló PNS szálak esetében azonban egyszálú és előhibridizált formák között sincsen nagy különbség a hibridizációs hatékonyság tekintetében. Ezen megállapítások bemutatására szolgál a 33. ábra.



33. ábra - A mikrocsonnás tű (MSP) segítségével cseppentett felismerő szálak hibridizációs hatékonyságának vizsgálata 4 órás illetve 19 órás immobilizációs időt követően 100 nM-os mikroRNS-oldat injektálásakor 5 μ M koncentrációjú oldatokból cseppentett, 12 és 18 bázis hosszú PNS foltokon.

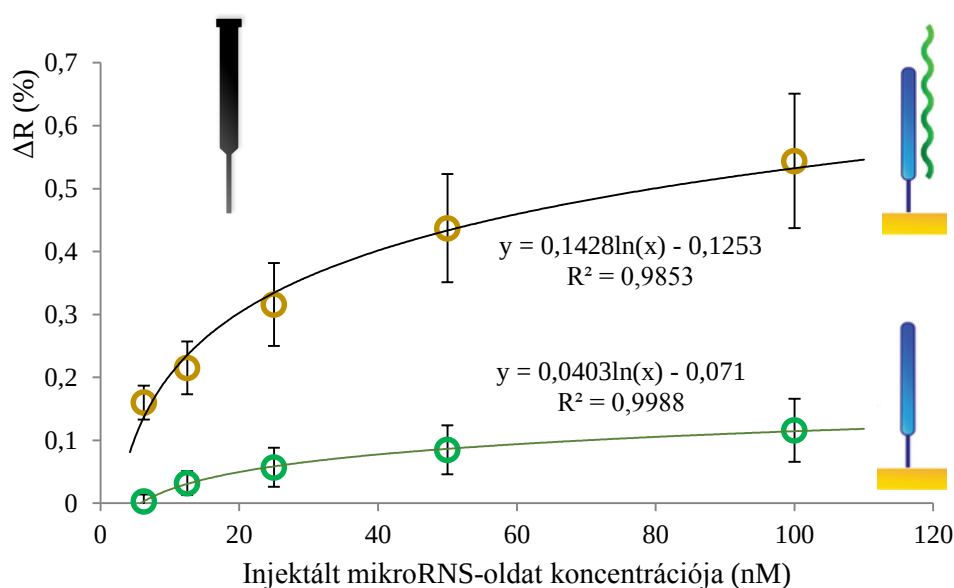
A 12 nukleotid hosszú PNS szálak egyszálú formában (SS) cseppentett pontjain, az immobilizációs idő növelésével nagyobb törésmutató változás mérhető a 100 nM-os mikroRNS-oldat injektálásakor, ami egyértelmű bizonyíték a korábban már leírt, felületen lejátszódó immobilizációs mechanizmus igazolására. Az előhibridizált (PH) foltokon azonban foszfát-, és citrát pufferek esetén sem tapasztalható nagymértékű hibridizációs hatékonyság növekedés. A legnagyobb javulás a borát pufferben immobilizált pontokon mérhető, ez esetben már az előhibridizált formában cseppentett foltokon is jelentős javulás érhető el az immobilizációs idő növelésével.

A PNS18mer felismerő szálak egyszálú-, és előhibridizált pontjain minden esetben kismértékben nőtt a 100 nM-os mikroRNS-oldat injektálásakor mérhető törésmutató változás értéke az immobilizációs idő növelésével. Jelentősebb növekedés szintén a pH=10,0 borát pufferben cseppentett egyszálú foltokon volt mérhető. A chip elkészítése során fontos szempont, hogy a gyorsan elkészíthetők legyenek, így tehát az immobilizációs időt érdemes 4 órára választani.

4.1.6 A módszerfejlesztés során elért kimutatási határ javulás

Ugyan méréseim során olyan modelloldatokkal dolgoztam, amelyek tisztán tartalmazták a meghatározni kívánt nukleinsav szálakat, az orvos-diagnosztikai gyakorlatban a meghatározandó nukleinsav molekulák nagyon komplex, és bonyolult mátrixban, igen kis mennyiségben vannak jelen, ennek következtében meglehetősen fontos szempont a szenzorchip elkészítésének optimalása olyan szempontból, hogy a lehető legkisebb kimutatási határokat érhesük el. A módszerfejlesztés során két paraméter megválasztásakor értem el jelentős kimutatási határ javulást, egyrészt kontakt tűről a mikrocsatornás türe való áttéréssel, másrészt pedig az előhibridizált formában való cseppentéssel.

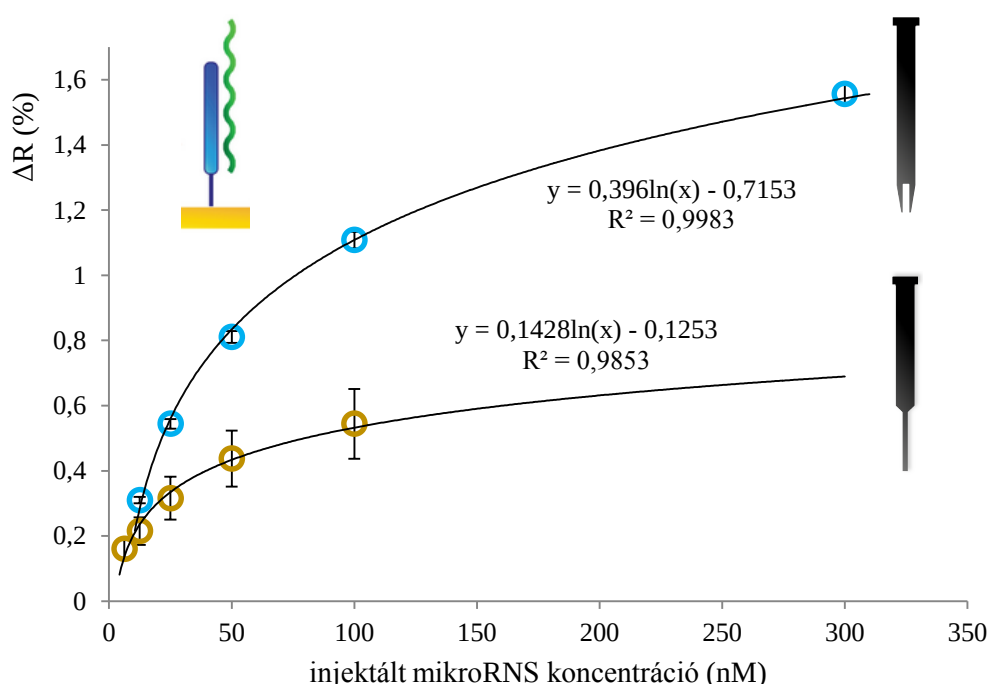
Abban az esetben, hogyha kontakt tűvel, egyszálú és előhibridizált formában cseppentett PNS foltokon vizsgálom a koncentráció függéseket (34. ábra), az illesztett görbék egyenleteit megoldva 1,7 nagyságrend kimutatási határ javulást tapasztalhatunk.



34. ábra – 5 μ M koncentrációjú, PBS pufferből, egyszálú-, és előhibridizált formában, kontakt tűvel cseppentett és 19 órán keresztül immobilizált PNS szálak pontjain mérhető hibridizációs hatékonyság a különböző koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor. Az illesztett görbék egyenletét megoldva megkapható a kimutatási határ javulás.

Ez azt jelenti tehát, hogy előhibridizált formában cseppentett PNS foltokon $10^{1,7}$ -szer (azaz ötvenszer) kisebb koncentrációjú mikroRNS-oldatok is szignifikáns törésmutató változásokat okoznak, ellentétben az egyszálú formában cseppentett PNS foltokkal, amelyeknél ilyen hígulást követően már nem mérhető szignifikáns jel.

Amikor kontakt tűről mikrocsonnás tű alkalmazására tértem át, akkor 0,64 nagyságrendű kimutatási határ javulás tapasztaltam, így mikrocsonnás tűt alkalmazva négyszer kisebb koncentrációjú mikroRNS-oldat is szignifikáns törésmutató változást okoz. Ennek bemutatására szolgál a 35. ábra.



35. ábra – $5 \mu\text{M}$ koncentrációjú, PBS-pufferből kontakt-, és mikrocsonnás tűvel cseppentett, 19 órán keresztül immobilizált PNS szálak pontjain mérhető hibridizációs hatékonyság a különböző koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor. Az illesztett görbék egyenletét megoldva megkapható a kimutatási határ javulás.

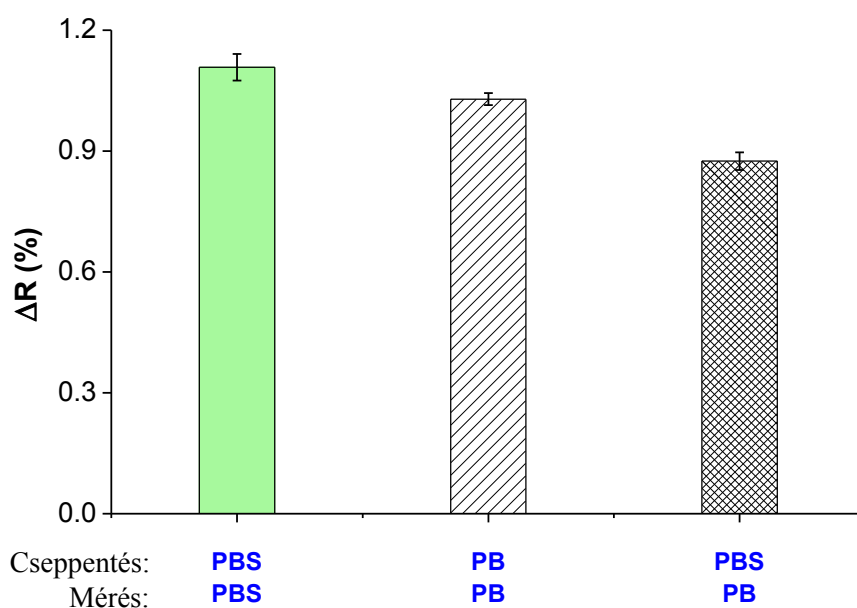
A kidolgozott immobilizációs módszereknek köszönhetően a kimutatási határ **4,5 pmol**-ról (180 μL , 25 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor mérhető szignifikáns törésmutató változás a kontakt tűvel cseppentett egyszálú PNS folton) **140 fmol**-ra (180 μL , 781 pM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor mérhető szignifikáns jel a mikrocsonnás tűvel cseppentett előhibridizált PNS folton) javult.

4.2 Mérési paraméterek meghatározása

4.2.1 Mérés során alkalmazott puffer ionerősségének hatása a hibridizációra

A korábbiakban a biochip előállításának optimalizálását mutattam be, a mérés során azonban nagyon fontos szempont a hibridizációs puffer kiválasztása, és az ionerősségének megválasztása. Ez leginkább azzal magyarázható, hogy, ugyan a felismerő szál és az analát molekulák között nem alakul ki elektrosztatikus taszítás a hibridizáció során, azonban a PNS szálak nagy felületi receptor-sűrűsége miatt a hibridizáló mikroRNS szálak egymáshoz közel helyezkedhetnek el, és egymás asszociációját gátolhatják a negatív töltésük taszítása miatt. A kialakuló elektrosztatikus taszítást a hibridizációs puffer ionerősségének növelésével leárnýékolhatjuk, így nagyobb felületi receptor-sűrűséget és hibridizációs hatékonyságot érhetünk el.

Ennek hatását kisebb-, és nagyobb ionerősségű foszfát pufferekben végzett vizsgálatokkal mutatom be (36. ábra). A foszfát puffer választásának oka – a korábbiakban már említettek alapján – a méréshez optimális fiziológiás körülményekre vezethető vissza.



36. ábra – A különböző ionerősségű, de azonos pH-jú (7,4) oldatokból cseppentett foltokon mérhető hibridizációs hatékonyság a különböző ionerősségű foszfát pufferekben történő mérések során, 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor. A chip elkészítéséhez 18 bázis hosszú PNS szálakat használtam, amelyeket mikrocsonnás tűvel cseppentettem 5 μ M-os PNS-oldatokból. Az immobilizációs idő 4 óra volt.

Amennyiben PBS pufferben, előhibridizált formában cseppentünk, úgy a kettős hélix negatív töltését a relatíve nagyobb ionerősséggel (150 mM) leárnýékoljuk, így PBS hibridizációs

puffert alkalmazva (36. ábra, 1. oszlop) a mérés során a felismerő PNS szál nagy hibridizációs hatékonysággal rendelkezik majd, tehát 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor relatíve nagy törésmutató változást mérhetünk. Hogyha azonban 10 mM-os foszfát hibridizációs puffert alkalmazunk jóval kisebb ionerősséggel (PB) a mérés során (36. ábra, 3. oszlop), úgy a PBS-ben cseppentett pontokon (ahol nagyobb felületi receptor-sűrűség alakult ki a nagyobb ionerősségnek köszönhetően) kisebb törésmutató változás mérhető majd, hiszen a mikroRNS szálak közötti elektrosztatikus taszítást kevésbé árnyékoljuk le a kisebb ionerősséggel.

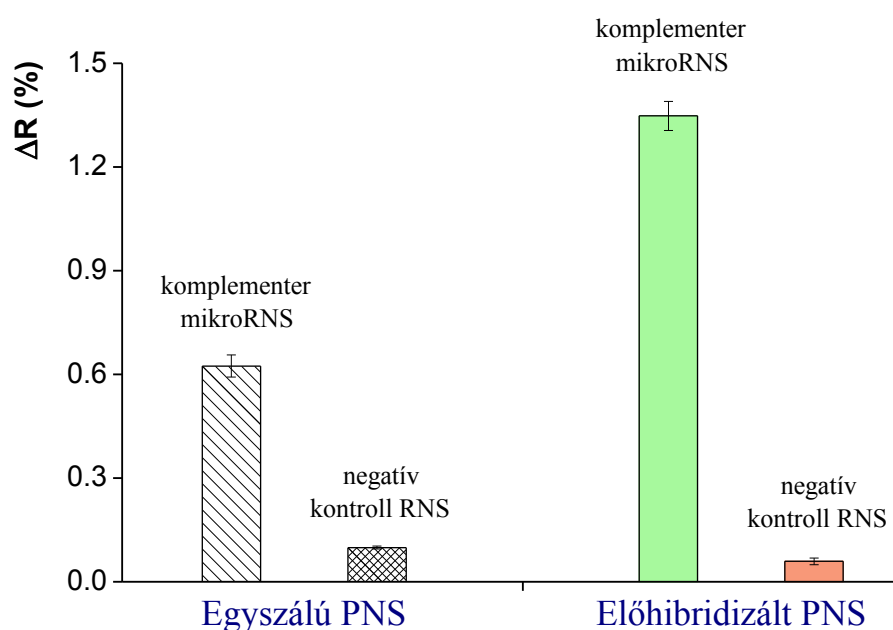
Ezt úgy küszöbölhetjük ki, hogy kisebb ionerősségű (10mM) PB puffert használunk cseppentéskor, és a mérés során is (36. ábra, 2. oszlop). Így a két korábbi érték közötti törésmutató változást mérünk a 100 nM koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor. Ez annak köszönhető, hogy már az immobilizáció során kisebb felületi receptor-sűrűség alakul ki a negatív töltésű kettős hélix szerkezetek elektrosztatikus taszítása miatt, hiszen a kis ionerősséggel a töltések taszítását nem árnyékoljuk le. Így a mérés során hiába dolgozunk az immobilizációs pufferrel azonos ionerősségű hibridizációs pufferben, nem lesz jobb a hibridizáció hatékonysága.

Amiért azonban fontos, hogy a kisebb hibridizációs határfok ellenére is vizsgáljuk az immobilizációs puffernél kisebb ionerősségű hibridizációs pufferekben történő méréseket, hogy segítségükkel javítható a felismerő szálak szelektivitása. A hibridizációs hatékonyságot vizsgálva az a jó számunkra, hogyha az analát molekulák elektrosztatikus taszítása nem befolyásolja negatív irányba az asszociációt, azonban a felismerő szálak szelektivitásának vizsgálatakor az az előnyös, hogyha csökkentjük a nem komplementer szekvenciák hibridizációjának valószínűségét. Kisebb ionerősségű hibridizációs pufferben mérve tehát azt várnánk, hogy a nem komplementer RNS szekvenciák sokkal kevésbé kötődnek a felismerő szálakhoz, hiszen könnyebben disszociálnak róla az elektrosztatikus taszítás miatt, mint a komplementer szekvenciák, amelyek esetében a 36. ábra eredményei alapján sem csökken jelentős mértékben a hibridizáció.

Mint korábban már többször említettem, mindenképpen érdemes a fiziológiás körülményeknek megfelelő hibridizációs puffert (PBS) alkalmazni a mérés során – már csak minta-előkészítési szempontokból is –, így a fentebb említettek alapján célszerű a cseppentéskor immobilizációs pufferként is ezt használni. Ez könnyen belátható, hogyha belegondolunk, hogy nagyobb ionerősségű (300 mM NaCl) citrát pufferben történő cseppentés során a PNS szálak közelebb helyezkednének el egymáshoz, így a kisebb ionerősségű PBS pufferben történő mérés során a hibridizációra és kinetikára egyaránt hatással lenne a nukleinsavak negatív töltése között kialakuló elektrosztatikus taszítás.

A szenzorchip előállítása, és optimalása során fontos volt, hogy a választott mikroRNS biomarkert szelektíven vizsgálhassam. Ezt egy modelloldat alkalmazásával könnyen megtehettem, azonban bonyolult biológiai mintákban az alakos elemeken és fehérjéken kívül rendkívül sok, különböző hosszúságú és eltérő szekvenciájú nukleinsav is található, amelyek közül meglehetősen nehéz kiválasztani a számomra érdekes, vizsgálni kívánt szekvenciát. A PNS szálak alkalmazásával ez mégis megvalósítható, amelyek szelektivitásának vizsgálata során egy nem komplementer szekvenciájú (*a vizsgált RNS adatait lásd a kísérleti részben*), szintén 22 bázis hosszú RNS injektálásakor határoztam meg a hsa-miR-208a-mikroRNS-re specifikus PNS szál megkülönböztető képességét.

A méréseim során kapott eredményekből jól látható (37. ábra), hogy előhibridizált formában cseppentett felismerő szálak foltjain kisebb a negatív kontroll RNS szál kötődése, mint az egyszálú PNS pontokon.



37. ábra – 5 μ M koncentrációjú, PBS pufferből mikrocsontról cseppentett és 4 órán keresztül immobilizált PNS felismerő szálak szelektivitásának vizsgálata 100 nM-os koncentrációjú, komplementer és nem komplementer szekvenciájú RNS-oldatok injektálásakor.

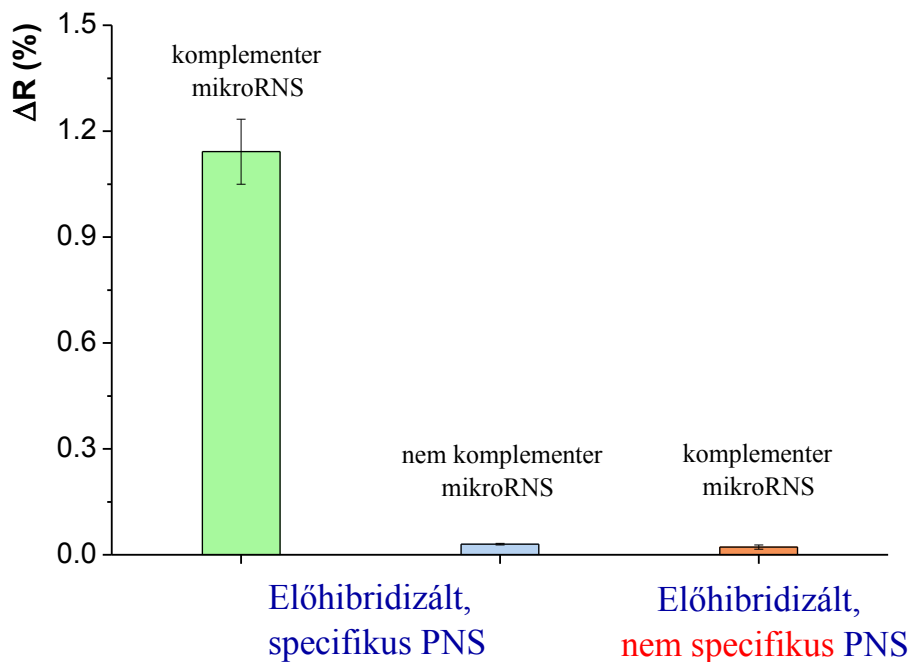
Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy az egyszálú formában cseppentett PNS foltjain az elfekvő felismerő szálak miatt a tiolokkal történő blokkolás nem tökéletes, így nagyobb a

nem-specifikus adszorpció valószínűsége. Azonban bármely formában történt is a felismerő szálak immobilizációja az arany felületre, elmondható, hogy mindkét esetben egyértelmű a PNS szál szelektivitása, hiszen nem mérhetünk jelentős kötődést a nem komplementer RNS szekvenciára.

A szelektivitás vizsgálatát egy másik oldalról is megközelíthetjük. Mi történik akkor, hogyha egy nem-specifikus PNS szál is megköti a meghatározandó hsa-miR-208a-mikroRNS biomarkert? Ez szintén problémát okozhat a mérés során, amely egyrészt arra vezethető vissza, hogy a szenzorchipek előállításakor a meghatározandó molekulára nem-specifikus PNS szálakat is szoktak a biochip felületére kötni, hogy egy olyan referenciafelületet kapjanak, amely anyagi minősége kémiaiilag azonos a felismerő foltokéval. A kinetikai vizsgálatok során ugyanis valóban a tiol háttér az egyik legalkalmasabb, de klinikai alkalmazásokkor érdemes egy másik, nem-specifikus PNS szállal módosított foltot választani referencia felületként, hogy minden kétséget kizárólag azonosítható legyen a biomarker. A problémát ekkor az okozhatja, hogyha a nem-specifikus PNS szálon is kötődik a meghatározandó nukleinsav szál, így nem lehetünk benne biztosak, hogy a specifikus szálhoz való „látszólagos kötődés” nem valamilyen interferencia következménye-e, amikor is fals jelet ad a minta valamely zavaró komponense.

Ezen felül hosszú távú célom az, hogy olyan szenzorchipet fejlesszek ki, amely nagy áteresztő képességű vizsgálatot tesz lehetővé (HTS – *High Throughput Screening*), így a felületére immobilizált nagyszámú, eltérő szekvenciájú PNS foltoknak köszönhetően lehetőséget biztosít rendkívül nagyszámú nukleinsav-típusú biomarker szimultán meghatározására. Ennek jelentősége abban áll, hogy a szenzorchip felületére a mai gyakorlatban akár több száz, különböző szekvenciájú PNS folt is cseppenthető, így egyetlen egy szenzorchip alkalmas lehet a legtöbb betegség szimultán, megbízható diagnosztizálására, amely forradalmi előretörést jelentene orvos-diagnosztikai területeken.

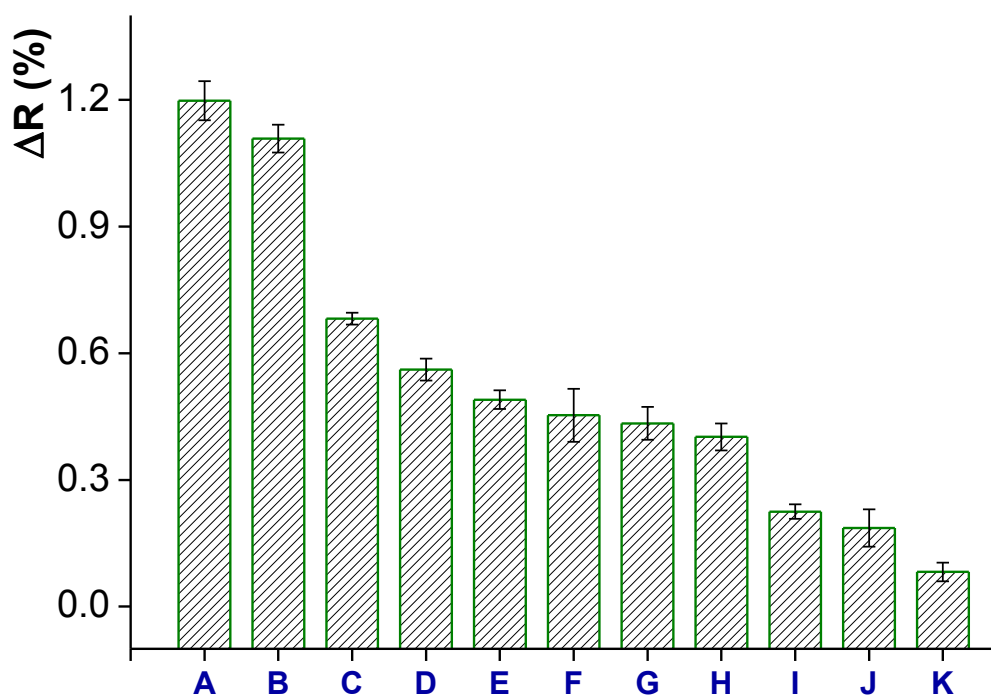
A korábbiakban már láttuk (37. ábra és 38. ábra, 2. oszlop), hogy a meghatározandó nukleinsavra specifikus PNS szál a nem komplementer RNS szálakat nem ismeri fel. Hasonló megállapításokat tehetünk a nem-specifikus PNS szálakra is, amik szintén nem hibridizálnak a meghatározni kívánt mikroRNS molekulákkal (38. ábra, 3. oszlop), így a negatív kontroll PNS foltokon nem mérhetünk szignifikáns törésmutató változást.



38. ábra – 5 μM koncentrációjú, PBS pufferből mikrocsatornás tűvel cseppentett és 4 órán keresztül immobilizált specifikus, és nem-specifikus PNS felismerő szálak szelektivitásának vizsgálata 100 nM-os koncentrációjú hsa-miR-208a mikroRNS-, és nem komplementer RNS-oldatok injektálásakor.

Az előállított szenzorcsipek szelektivitása tehát a mérés során használt PBS pufferben is kiváló, így a nagyfokú szelektivitás eléréséhez nincsen szükség kisebb ionerősségű hibridizációs oldatok használatára, amint azt a 4.2.1.-es pontban vizsgáltam.

Összefoglalva a felismerő szálak immobilizációjakor kapott eredményeket elmondható, hogy az immobilizációs paraméterek függvényében a mérhető hibridizációs hatékonyság rendkívül széles skálán mozog (39. ábra). Bármilyen körülmények között is történjen a PNS szálak immobilizációja, az előhibridizált formában történő cseppentés gyakorlatilag mindig jobb eredményt biztosít, mint az azonos körülmények között egyszálú formában történő cseppentés. A kidolgozott módszernek köszönhetően sokkal kisebb kimutatási határ érhető el. A felismerés szelektivitása lehetőséget ad a későbbi orvos-diagnosztikai alkalmazásra.



39. ábra - Az immobilizáció paramétereinek függvényében mérhető törésmutató változások széles spektruma az 5 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú felismerő szálakon. A rövidítéseknél először jelöltem az PNS felismerő szálak immobilizációjának formáját, ahol PH=előhibridizált, SS=egyszálú, majd a az immobilizációs puffert, ezt követi a cseppentéskor használt tű fajtája: SP=kontakt tű, MSP=mikrocsatornás tű, majd a mérés során alkalmazott hibridizációs puffer. **A** (PH SSC, MSP, PBS); **B** (PH PBS, MSP, PBS); **C** (PH SSC, MSP, PB); **D** (SS 0.005mM HEG (PBS), MSP, PBS); **E** (SS SSC, MSP, PBS); **F** (SS 0,1 mM MCP (PBS), MSP, PBS); **G** (PH PBS, SP, PBS); **H** (PH SSC, SP, PBS); **I** (SS PBS, MSP, PBS); **J** (SS SSC, SP, PBS); **K** (SS PBS, SP, PBS).

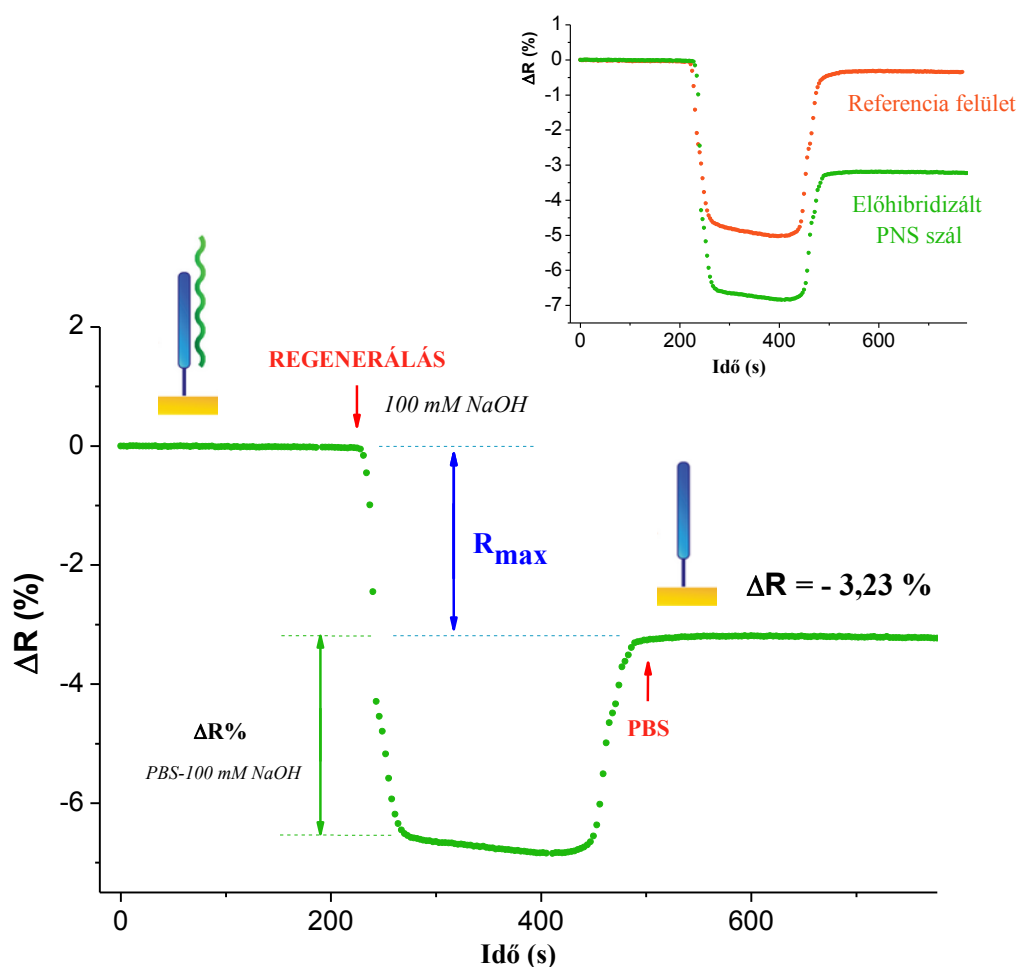
4.3 A módszer előnyeinek a bemutatása

4.3.1 Elérhető maximális törésmutató változás (R_{max}) értékének meghatározása

A kinetikai paraméterek meghatározásához nélkülözhetetlen adat az R_{max} értéke (lásd a kinetikai paraméterek meghatározásáról szóló elméleti bevezető részt). Ez tulajdonképpen az akkor mérhető relatív törésmutató változás, amikor a felületre kötött összes PNS szál a mikroRNS-sel hibridizált állapotban kerül. Ennek direkt meghatározása azonban meglehetősen nehézkes, hiszen rendkívüli analát mennyiséget igényel (akár több száz μM -os koncentrációkat), ami az esetek többségében nem áll rendelkezésre, ezen felül pedig nagyon időigényes és drága is. Ezért a kiértékelő szoftverek a *törésmutató változás – injektált analát koncentráció* görbének az extrapolálásával szokták meghatározni, amely azonban nem ad pontos értéket a nem tökéletes görbeillesztés miatt, így a kinetikai paraméterek meghatározása bizonytalan lesz.

Az előhibridizált formában való cseppentés egy igen hasznos módszert biztosít az R_{max} értékének, a korábbiakban alkalmazott módszereknél sokkal megbízhatóbb és pontosabb direkt meghatározására. Végiggondolva a PNS-DNS kölcsönhatás nagyon kicsi K_D (amit a későbbiek során a kinetikai paraméterek meghatározásakor be is bizonyítok) értékének jelentését, biztosak lehetünk benne, hogy cseppentéskor az összes PNS felismerő szál előhibridizált formában van jelen, tehát a felületre kötődött PNS szálak mindegyike hibridizált állapotban van.

A mérés során először az előhibridizált PNS szálakat hozom a felismerésre alkalmas formába oly módon, hogy a felismerő réteget 100 mM-os NaOH-oldattal kezelem. Ekkor csökken a mérhető törésmutató változás (40. ábra), hiszem az áramló PBS puffert egy kisebb ionerősségű, kisebb törésmutatójú regeneráló oldatra cserélem le.

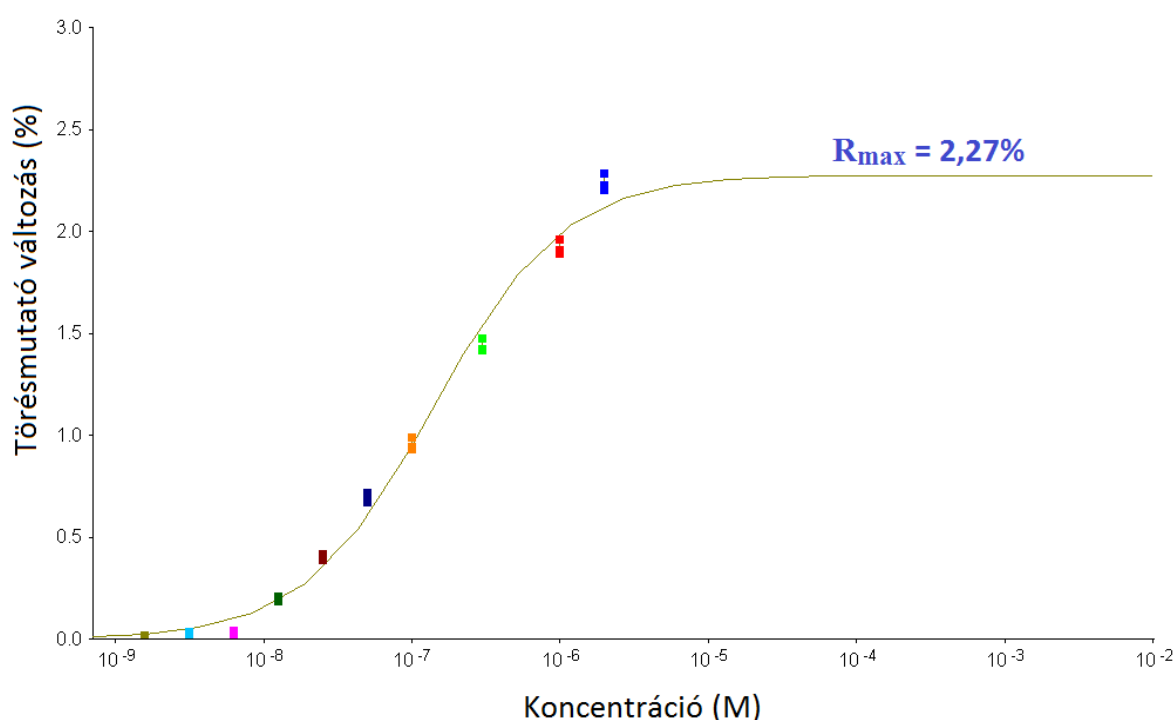


40. ábra – Az R_{max} értékének meghatározása az előhibridizált formában PBS pufferből cseppentett és 4 órán keresztül immobilizált, 18 bázis hosszú PNS folton, 100 mM-os NaOH-oldattal történő kezelés során.

Amikor a NaOH-oldat elhagyja a cellát, és újra PBS puffer áramlik a szenzorchip felett, úgy viszont csak a háttéren kapjuk vissza a 0% relatív törésmutató változáshoz tartozó eredeti

alapvonalat, hiszen az előhibridizált formában cseppentett PNS szálakról a pH eltolás következtében disszociáltak a DNS molekulák, így a felületen kisebb tömegű réteg maradt csak fent. Így tehát az injektáláskor mérhető jelenségek reverz folyamatként megkaphatjuk az akkor mérhető törésmutató változást, amikor a felületen elhelyezkedő összes PNS felismerő szál a vele komplementer szekvenciájú mikroRNS szállal hibridizált formában van jelen.

Az R_{max} meghatározása a *Scrubber* kiértékelő szoftver segítségével is történhet. Ekkor a kimért egyensúlyi izotermára illesztett görbének az extrapolálásával határozhatjuk meg az R_{max} értékét (41. ábra).



41. ábra - R_{max} meghatározása extrapolációval a *Scrubber* szoftver szerint. (Saját mérés)

Ez esetben az illesztés jóságához azonban fontos, hogy az egyensúlyi állapotban mért értékeket elég nagy koncentrációk esetében is meghatározzuk. Ennek egyrészt nagy az analít igénye, másrészt az egyensúlyi állapot eléréséhez hosszú ideig tartó asszociációs szakasz felvételére van szükség. Amennyiben nem használunk elegendően nagy koncentrációkat a mérés során, úgy szemmel látható módon az illesztett görbe nem illeszkedik jól (41. ábra), így az R_{max} meghatározása igen bizonytalan lesz.

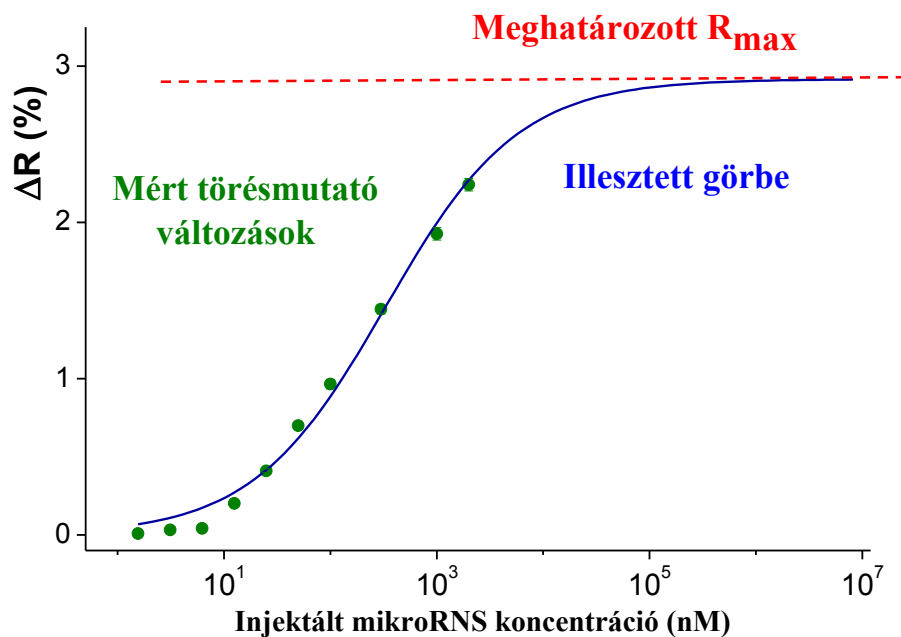
A 41. ábra szerint elérhető maximális törésmutató változás értéke a kiértékelő szoftver eredményei alapján 2,27%, és a legtöményebb (legnagyobb törésmutató változást okozó kék pont a görbén) koncentrációjú, 2000 nM-os mikroRNS-oldat injektálásakor a felületi PNS szálak 99,9790%-a hibridizált formában van jelen. Az ábrán jól látható, hogy a szoftver a görbét úgy illeszti, hogy a legtöményebb mikroRNS-oldat injektálásakor mérhető törésmutató változás után kvázi lineáris szakasszal extrapolál, így a kinetikai paraméterek számításához szükséges R_{max} értékének meghatározása nagyon bizonytalan lesz. Ezzel szemben a prehibridizált foltokon a regenerálás során meghatározott törésmutató változás értéke - 3,23 %, amiből az R_{max} értéke 3,23% következik (40. ábra). A módszer újdonságának következtében a kinetikai paraméterek meghatározására alkalmas szoftverekbe még nem illeszthető be az R_{max} értéke, így kinetikai vizsgálataim során nem tudtam az általam meghatározott R_{max} értékekkel számolni.

4.3.2 Kalibrációs görbének a meghatározása az R_{max} ismeretében

Az analitikai módszer kifejlesztésének fontos része a mennyiségi meghatározásra alkalmas kalibrációs görbe felvétele. Kvantitatív információk nyerésekor olyan koncentrációtartományokban szeretünk ugyanis dolgozni, ahol a koncentráció-jel görbe lineáris szakaszában vagyunk. Amennyiben ez nem lehetséges, úgy a mennyiségi információk nyeréséhez fontos ismernünk azt az összefüggést, amellyel számítható a meghatározandó molekula koncentrációja.

Méréseim során kis analát koncentrációknál nem tudom mérni a felismerő szálakkal hibridizáló mikroRNS molekulák által okozott nagyon kicsi törésmutató változásokat, nagyobb mikroRNS koncentrációknál pedig közel lineáris összefüggést kapok. A *mikroRNS koncentráció – jel* összefüggés a nagy mikroRNS koncentrációkra azonban a korábbiakban már említett okok miatt nem mérhető ki. A kalibrációs görbe felvétele során körülbelül 2 nagyságrendet átfogóan lineáris szakasszal rendelkező, a kis-, és nagy koncentrációknál elhajló „S-görbét” kapok.

Hogyha meghatározzuk az R_{max} értékét, és egy diagramon ábrázoljuk a különböző koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor kapott törésmutató változások értékével (42. ábra) úgy, hogy az illesztett görbe az R_{max} értékét közelítse a nagy mikroRNS koncentrációjánál, akkor tökéletesen illeszthető görbét kaphatunk egy széles koncentráció tartományon.



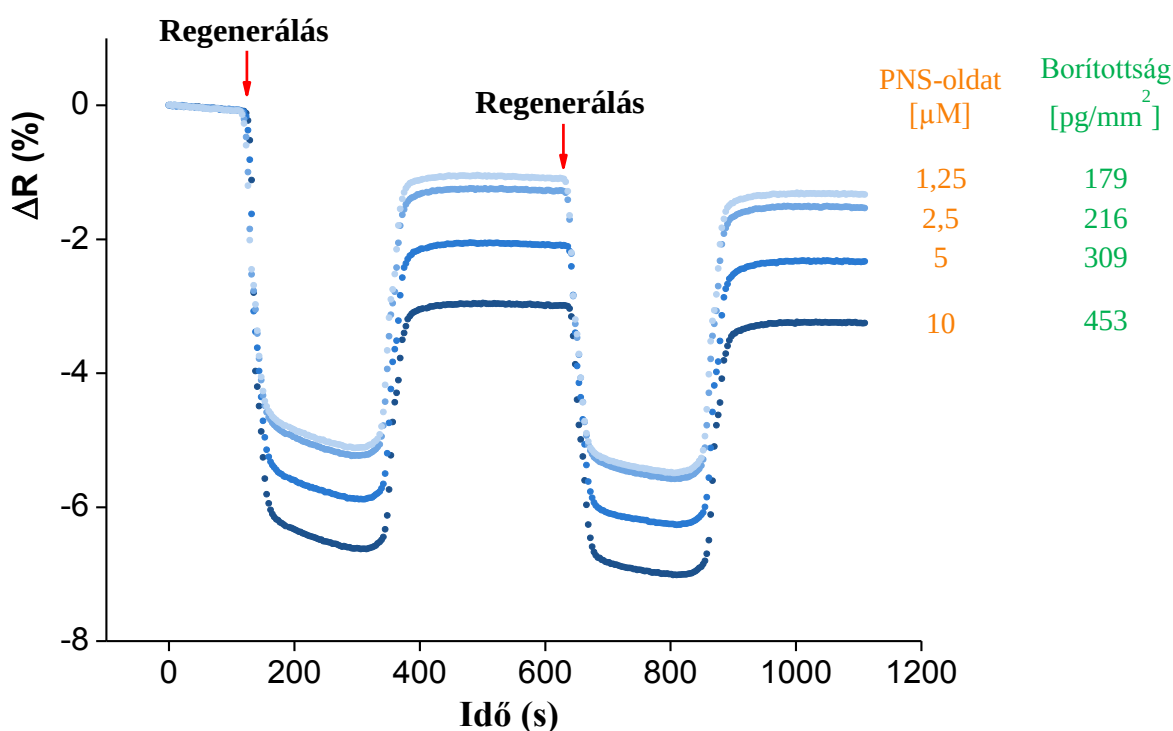
42. ábra – Kalibrációs görbe pontjai a kisebb mikroRNS koncentrációk esetében kimérhetők, az R_{max} értékének meghatározását követően pedig a mikroRNS koncentráció meghatározására alkalmas görbe illeszthető.

4.3.3 Felületi PNS sűrűség meghatározása

Ahogy az korábban már sokszor beláttuk, a nagy hibridizációs hatékonyság szempontjából az egyik legfontosabb paraméter az optimális felületi receptor-sűrűség. Ennek számszerűsítése azonban meglehetősen nehézkes, hiszen hogyan is tudnánk mérni ilyen kis tömegeket és felületeket? Kis tömeg mérése megoldható lenne kvarckristály mikromérleg alkalmazásával (QCM – Quartz Crystal Microbalance), és a PNS folt mérete is meghatározható akár egy egyszerű fénymikroszkóppal, ám meglehetősen bonyolult lenne ilyen módszereket alkalmazni, és valószínűleg igen nagy szórással rendelkező, megbízhatatlan eredményeket szolgáltatnának csak. Az általunk bevezetett módszerrel azonban lehetőség nyílik a felületi PNS receptor-sűrűség nagyon pontos meghatározására is.

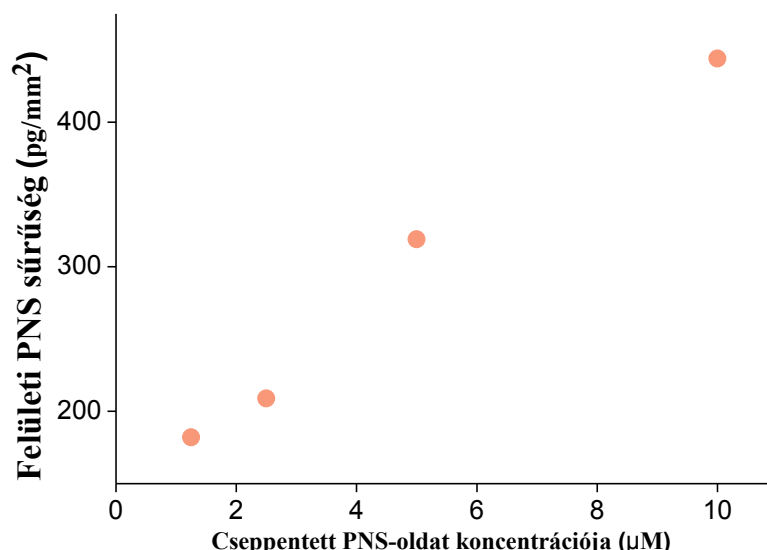
Mint korábban már láttuk, az előhibridizált PNS foltokon a regenerálás során meghatározható az R_{max} értéke, amiből kiszámítható, hogy az egységnyi felületre mennyi mikroRNS molekula kötődött. Mivel az SPR mérés során tulajdonképpen a felületen bekövetkező tömegváltozással arányos jelet (az eredeti törésmutatóhoz képest adódó törésmutató változást) mérjük, így tulajdonképpen csak az a kérdés számunkra, hogy a mérhető törésmutató változás értéke milyen felületi mikroRNS koncentrációnak felel meg. Mivel 1% törésmutató változás a biomolekulák esetében tipikusan 185 pg/mm²-es felületi sűrűség változással egyenértékű, így a

moláris tömegük ismeretében (hsa-miR-208a mikroRNS molekulatömege 7098 Da) kiszámítható, hogy ez mekkora anyagmennyiséget jelent egységnyi felületen. Feltételezve tehát, hogy az összes PNS szál hibridizált formában van, adódik, hogy a kiszámított mennyiséggel azonos anyagmennyiségű felismerő szál van az egységnyi felületen, így a felületi receptor-sűrűség kiszámítható a PNS szálak moláris tömegének ismeretében (5237 Da). Az eredmények bemutatására szolgál a 43. ábra.



43. ábra - Felületi receptor-sűrűség meghatározása a PBS pufferben oldott 10; 5; 2,5; 1,25 μM-os koncentrációjú PNS-oldatból cseppentett foltokon.

A felületi receptor-sűrűségeket ábrázolva a cseppentett PNS-oldatok koncentrációjának függvényében (44. ábra) jól látható, hogy a legnagyobb felületi receptor-sűrűség növekedés az 5 μM koncentrációjú PNS-oldat cseppentésekor érhető el. Hígabb koncentrációk (1,25 és 2,5 μM) esetében a felismerő szálak kikötődését egyrészt a diffúzió limitálja, hiszen csak akkor kerülnek az oldatból közvetlenül az arany felületére, hogyha odadiffundálnak, másrészt pedig a PNS szálak elfeksznek a felületen, és mivel híg oldatként cseppentettem őket a szenzorchipre, így nem kerülnek a felületre merőleges pozícióba, tehát gátolják egymás immobilizációját. Töményebb koncentrációnál (10 μM) azonban a felület valószínűleg hamarabb telítődik, így anyagtakarékossági szempontból nem érdemes növelni a felcseppentett PNS-oldat koncentrációját. Kinetikai meghatározásoknál tehát 5 μM koncentrációjú PNS-oldatokból cseppentett foltokon érdemes meghatározni az egyensúlyi paramétereket.



44. ábra – A meghatározott felületi receptor-sűrűség a különböző koncentrációjú PNS-oldatokból cseppentett foltokon.

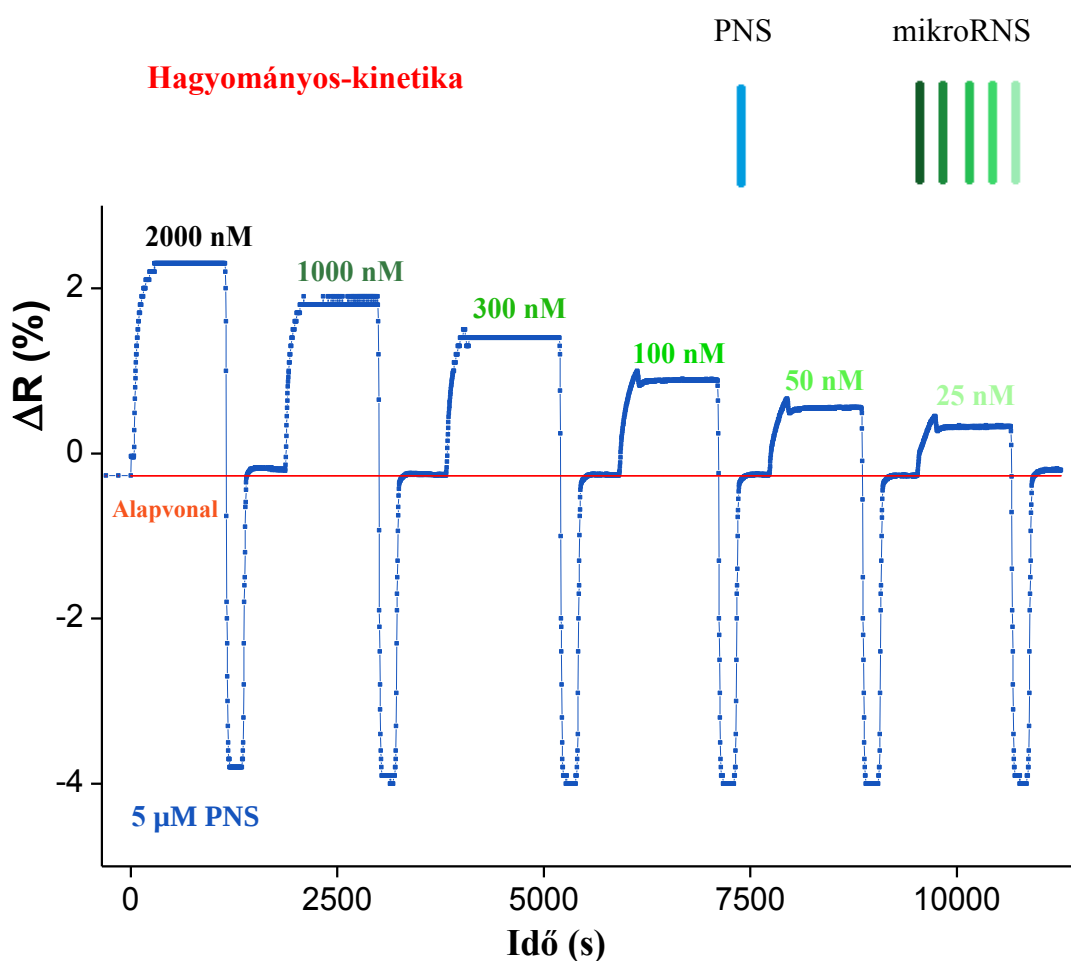
Összefoglalva az előhibridizált formában történő immobilizációs módszer további előnyeit – az optimális felületi receptor-sűrűség kialakulásán felül – elmondható, hogy a korábbi módszereknél sokkal megbízhatóbban, és pontosabban sikerült direkt módon meghatározni az R_{max} értékét, aminek köszönhetően (nagy koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásának elkerülésével) felvehető a koncentráció-dependencia a hibridizáció során mérhető törésmutató változásra, illetve a kinetikai paraméterek pontosabb meghatározására nyílik lehetőség, továbbá más módszereknél sokkal pontosabban meghatározható a PNS szálak felületi receptor-sűrűsége is.

4.4 Kinetikai paraméterek meghatározása hagyományos módszerrel

Kutatómunkám eredményeinek kiértékelésekor számos esetben éltem azzal a feltételezéssel, miszerint az előhibridizált formában felcseppentett PNS szálak mindegyike valóban hibridizált formában van. Többek között ezen feltevésem bizonyítására, és kinetikai információk nyerése céljából is meghatároztam az asszociációs-, és disszociációs sebességi állandók értékét, és a hányadosukként számítható K_D értéket egyaránt. Kinetikai paraméterek meghatározásának fontossága abban rejlik, hogy ismerve őket pontos információk nyerhetők a biomolekulák affinitásáról, a közöttük kialakuló kölcsönhatás erősségéről.

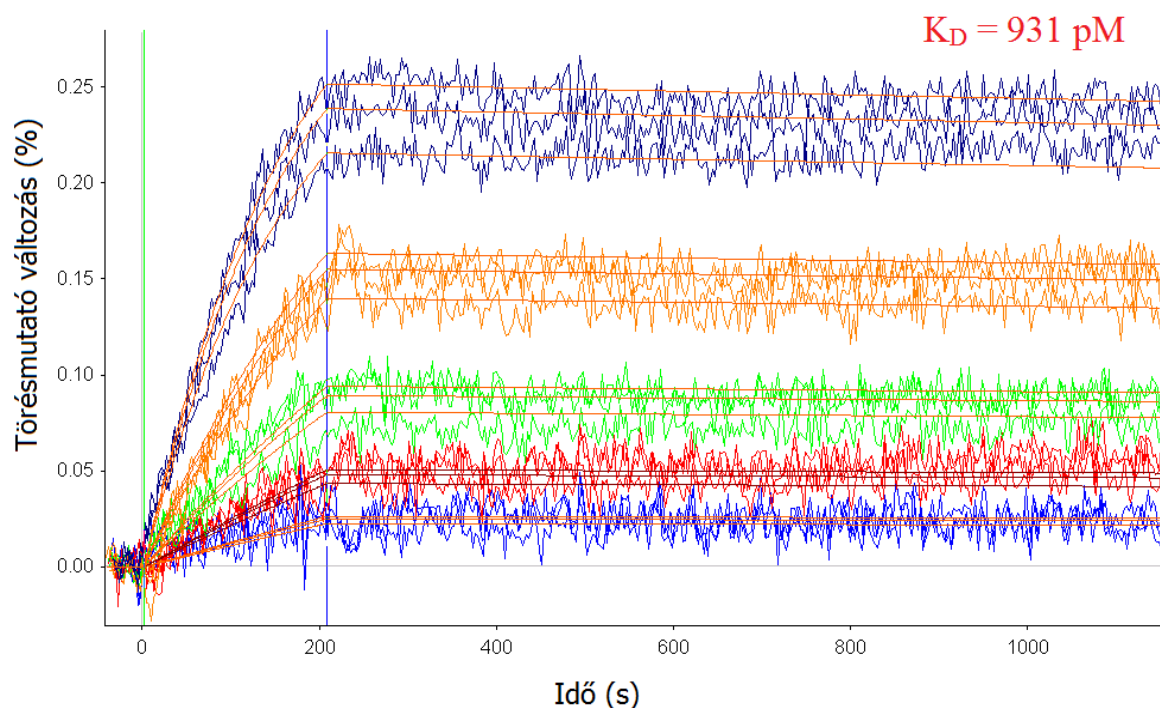
Kinetikai vizsgálatok során különböző koncentrációjú DNS-, és mikroRNS-oldatokat injektáltam a szenzorchip felületére, majd a kinetikai adatsorra illesztett görbék segítségével meghatároztam az asszociációs-, és disszociációs sebességi állandókat, melyek hányadosaként nyerhető a disszociációs sebességi állandó (K_D) értéke (3. számú mellékletben tájékoztató jelleggel láthatóak a különböző PNS szálakra meghatározott kinetikai paraméterek).

A 45. ábra a különböző koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor kapott görbéket mutatja be. A hagyományos-kinetikai meghatározás során egy adott felületi receptor-sűrűségű PNS folton határoztam meg a kinetikai paramétereket a különböző koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor. A nagy negatív értékű törésmutató változás a regenerálás során injektált 100 mM-os NaOH-oldatnak köszönhető. Az ábrán behúzott piros vonal jól szemlélteti, hogy a szenzorchip a regenerálását követően továbbra is kiválóan alkalmas az analát nukleinsav szálak felismerésére, mivel a felismerő PNS szálak az arany felületen nem sérülnek a regenerálás során, hiszen visszakapjuk az eredeti alapvonalat.



45. ábra - Különböző koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor mérhető törésmutató változások a 18 bázis hosszú, 5 μM-os koncentrációban, PBS pufferben előhibridizált formában, mikrocsatornás tűvel cseppentett foltokon. A mérés bizonyítja a felismerő réteg stabilitását a regenerálás során.

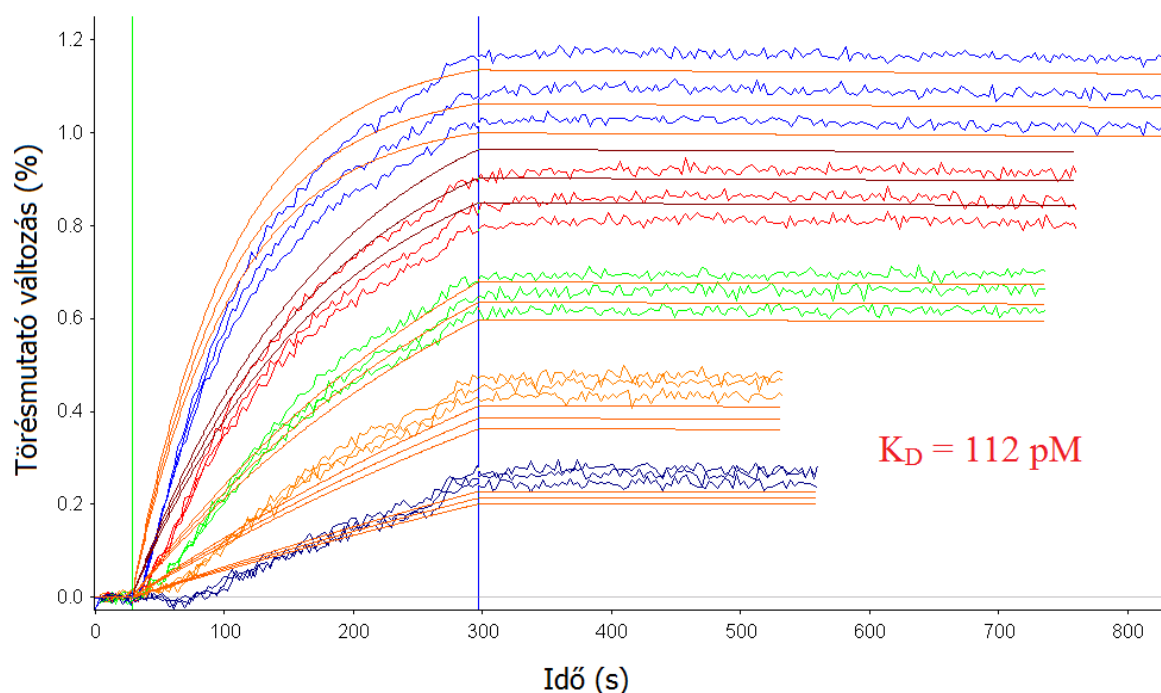
Az 5 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú PNS-oldatból, PBS pufferben előhibridizált formában, mikroszatornás tűvel cseppentett folton, különböző koncentrációjú DNS-oldatok injektálásakor meghatározott disszociációs egyensúlyi állandó értéke 931 pM, amely nagy affinitású, erős kölcsönhatásra utal (46. ábra).



46. ábra - Disszociációs egyensúlyi állandó értékének meghatározása 5 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú, PBS pufferből előhibridizált formában, mikroszatornás tűvel cseppentett PNS folton 100 (sötétkék); 50 (narancssárga); 25 (zöld); 12,5 (piros); 6,25 nM (világoskék) koncentrációjú DNS-oldatok injektálásakor.

Így tehát bizonyítottá válik a korábbiakban csak erőteljes feltételezésként bevezetett gondolat, miszerint előhibridizált formában immobilizált PNS szálak mindegyike negatív töltésű kettős szálként kötődik az arany felületre, tehát a regenerálás során valóban meghatározható az R_{max} , és a felületi receptor-sűrűség értéke.

Megvizsgálva a PNS – mikroRNS molekulák kinetikáját (47. ábra) elmondható, hogy sokkal erősebb kölcsönhatás alakul ki a mikroRNS–PNS, mint a DNS–PNS szálak között. Ez esetben a K_D értéke 112 pM. Ez köszönhető egyrészt a nagyobb asszociációs-, valamint a kisebb disszociációs sebességi állandó értékeknek is. A mért érték magyarázatául szolgál továbbá a méréseim során tapasztalt jelenségnek is, miszerint sokkal nagyobb hibridizációs hatékonyság érhető el a mikroRNS szálak felismerése során, mint a megegyező szekvenciájú DNS szálak esetében.

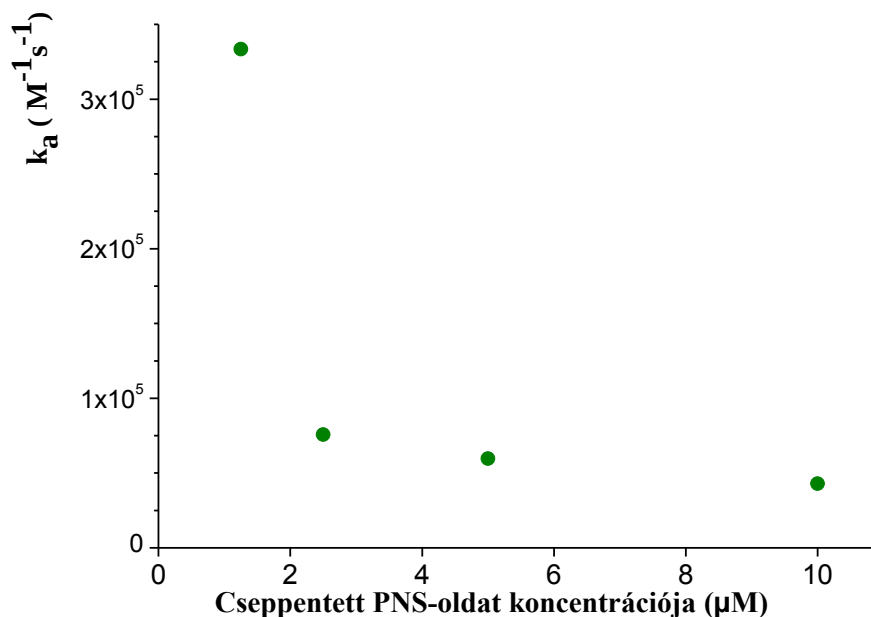


47. ábra - Disszociációs egyensúlyi állandó értékének meghatározása $5 \mu\text{M}$ koncentrációjú, 18 bázis hosszú, PBS pufferból előhibridizált formában, mikrocsatornás tűvel cseppentett PNS folton 100 (világoskék); 50 (piros); 25 (zöld); 12,5 (narancssárga); 6,25 nM (sötétkék) koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor.

Az asszociációs sebességi együtthatókat tovább vizsgálva (48. ábra) megállapítható, hogy a kisebb felületi receptor-sűrűségek esetén sokkal nagyobb asszociációs sebességi állandó értékek mérhetőek, mint a nagyobb koncentrációjú PNS szálak foltjain.

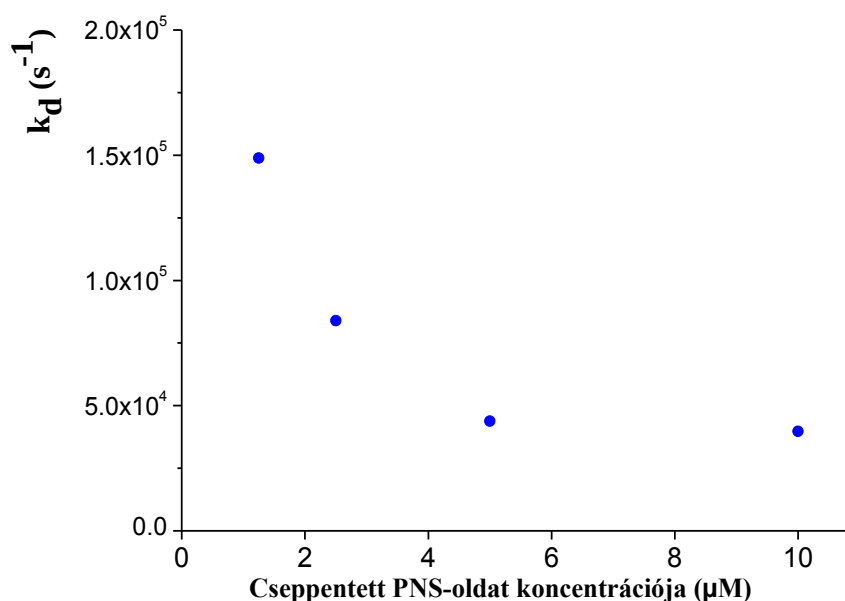
Ez kismértékben annak köszönhető, hogy a nagy felületi receptor-sűrűség miatt a biochip feletti lamináris áramlású határréteg az analát molekulákat tekintve könnyebben elszegényedik, és csak diffúzió útján, nehezebben tud pótlódni, így kismértékben diffúziólimitálttá válhat az asszociáció folyamata, tehát kisebb asszociációs sebességi állandó érték mérhető.

Kisebb felületi receptor-sűrűségek esetén azonban az egységnyi szenzorchip-felületre kikötődött felismerő szálakra fajlagosan több mikroRNS jut, mint nagy felületi PNS sűrűség esetén, így a felismerő réteg nagyobb affinitással köti meg az analát molekulákat, tehát nagyobb asszociációs egyensúlyi állandó érték lesz mérhető.



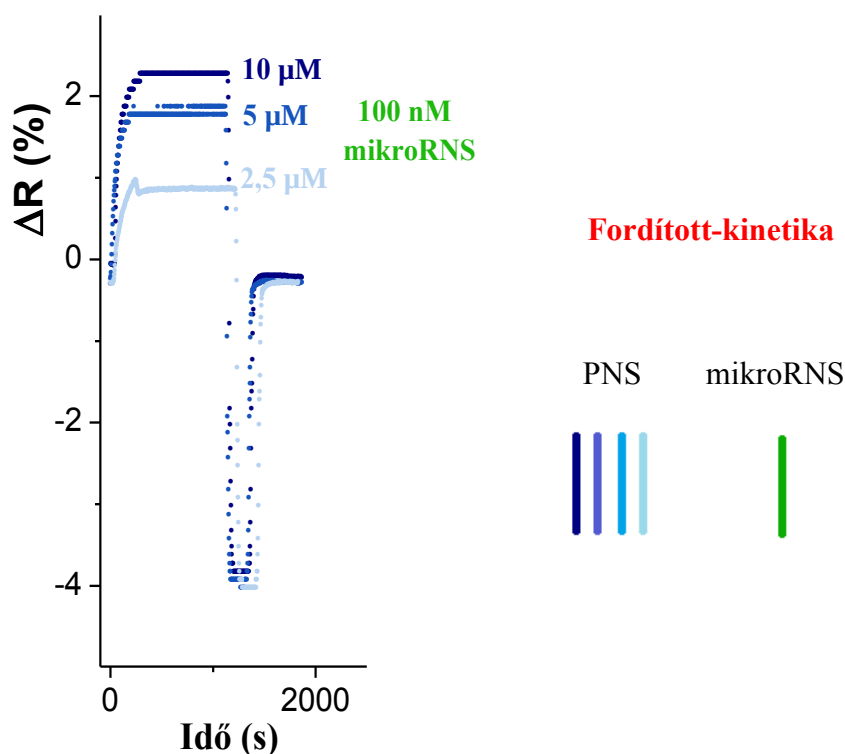
48. ábra - Asszociációs sebességi állandók értékének meghatározása 10; 5; 2,5; 1,25 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú, PBS pufferből előhibridizált formában, mikrocsatornás tűvel cseppentett PNS foltokon 100 nM-os koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor.

Hasonló jelenség figyelhető meg a disszociációs sebességi állandók vizsgálatokor (49. ábra), ahol az 5 és 10 μM koncentrációjú mikroRNS-oldatokból cseppentett foltokon nagyjából azonos értékű k_d érték mérhető, így tehát a kinetikai paraméterek meghatározásakor megválasztott 5 μM koncentrációjú oldatokból cseppentett foltok valóban alkalmasak a kinetikai paraméterek valós leírására. Kisebb PNS sűrűségű felületeken ugyanis nagy disszociációs sebességi állandó értékek mérhetőek, tehát a felismerő szál könnyebben elengedi az analát molekulát.



49. ábra - Disszociációs sebességi állandók értékének meghatározása 10; 5; 2,5; 1,25 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú, PBS pufferből előhibridizált formában cseppentett PNS foltokon 100 nM-os koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor.

Míg a hagyományos-kinetikai vizsgálathoz szükséges volt két nagyságrendet átfogó koncentrációjú analát-oldat injektálása, addig a reverz-, vagy fordított-kinetikai kiértékelés során meghatározhatóak a sebességi együtthatók és az egyensúlyi állandó értéke egyetlen koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásából anélkül, hogy regenerálnunk kellene a felületet [71] (50. ábra).



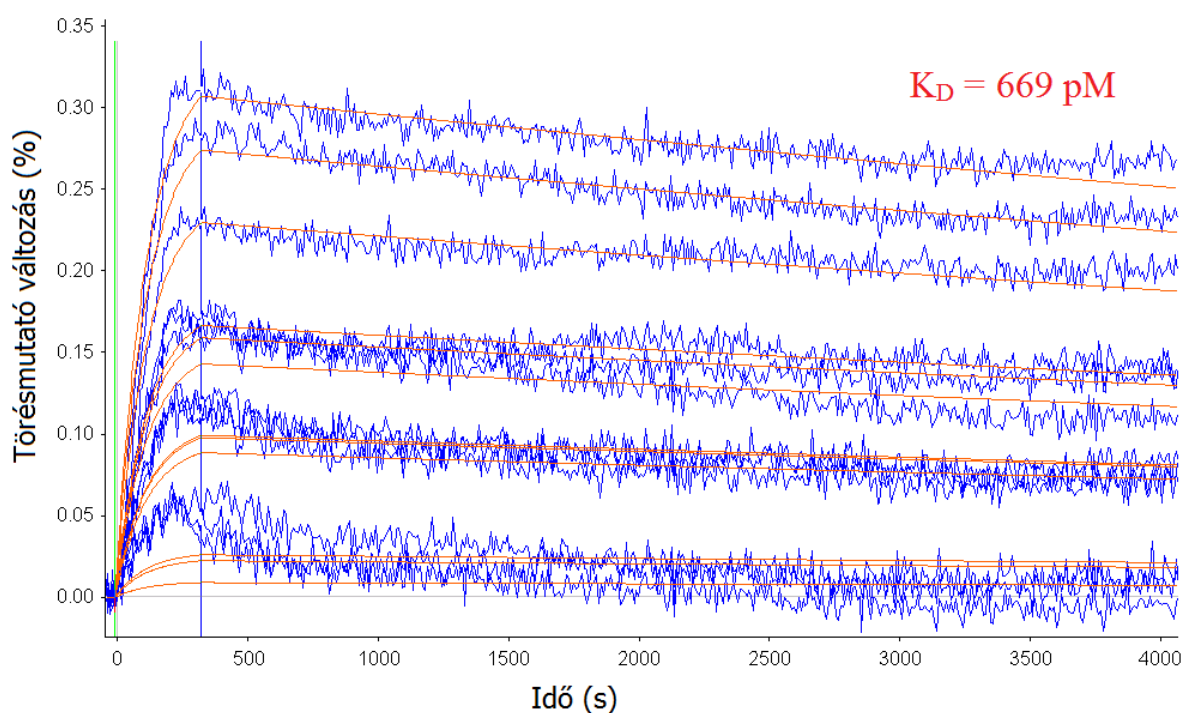
50. ábra – Fordított-kinetikai paraméterek meghatározásának elve. A színárnyalatok az oldatok töménységére utalnak.

Ezek igen fontos szempontok azokban az esetekben, amikor kevés analát áll rendelkezésünkre, vagy gyenge a kölcsönhatás erőssége a felület és az immobilizált felismerő szál között, valamint ha multiplált biomolekuláris kölcsönhatásokat szeretnénk tanulmányozni. A k_d meghatározása ebben az esetben sem igényel információt a mikroRNS koncentrációra nézve (hiszen független tőle), a k_a meghatározásához pedig elegendő az egyetlen injektált koncentráció ismerete. Ekkor egy, a választott koncentrációjú mikroRNS-oldat injektálásakor vizsgálható a fordított-kinetika a különböző felületi receptor-sűrűségű PNS felismerő szálak pontjain, míg a hagyományos kinetikai meghatározások során az analát hígítási sorának injektálásakor határozható meg a kinetika az adott felületi borítottságú PNS foltokon.

Ez, az újfajta, kinetikai paraméterek vizsgálatára kifejlesztett módszer még nem teljesen bizonyítottan alkalmas az egyensúlyi paraméterek meghatározására, így méréseim során célom az volt, hogy a fordított-kinetikai meghatározás jogosultságát vizsgáljam a PNS-DNS, illetve a PNS-mikroRNS kinetikai információk nyerése kapcsán.

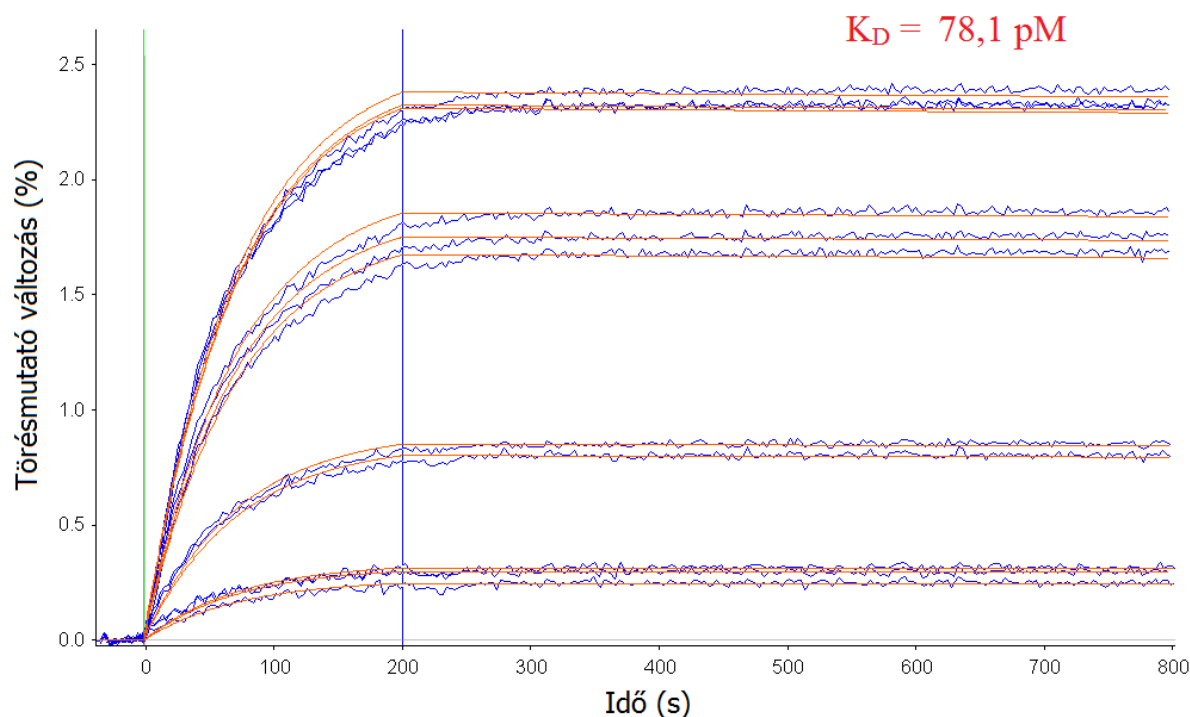
A fordított-kinetikai meghatározás során 100 nM-os koncentrációban injektáltam nukleinsav-oldatot, és a különböző felületi borítottságú PNS foltokon határoztam meg a kinetikai paramétereket úgy, hogy az eltérő borítottságú PNS foltok között nem tettem különbséget a görbék illesztésekor.

A 51. ábra a 100 nM-os DNS-oldat injektálásakor mért eredményeket mutatja be. A PNS-DNS kölcsönhatás, fordított-kinetikai módszerrel meghatározott K_D értéke 669 pM, amely közel megegyezik a hagyományos-kinetikai módszerrel meghatározott 931 pM-os disszociációs egyensúlyi állandóval.



51. ábra - Disszociációs egyensúlyi állandó értékének meghatározása fordított-kinetikai módszerrel a 10; 5; 2,5; 1,25 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú, PBS pufferből előhibridizált formában, mikrocsonnás tűvel cseppentett PNS foltokon 100 nM-os koncentrációjú DNS-oldat injektálásakor.

Megvizsgálva a mikroRNS-PNS kölcsönhatás fordított-kinetikai paramétereit (52. ábra) elmondható, hogy ez esetben is a hagyományos-kinetikai módszerrel meghatározott értékhez (112 pM) közeli K_D -t értéket kaptam, amely 78,1 pM.



52. ábra - Disszociációs egyensúlyi állandó értékének meghatározása fordított-kinetikai módszerrel a 10; 5; 2,5; 1,25 μM koncentrációjú, 18 bázis hosszú, PBS-pufferből előhibridizált formában cseppentett PNS foltokon 100 nM-os koncentrációjú mikroRNS-oldatok injektálásakor.

A fordított-kinetikai vizsgálatok kapcsán elmondható tehát, hogy mind a DNS-PNS, mind pedig a mikroRNS-PNS kölcsönhatások vizsgálatakor hasonló értékeket kaptam a hagyományos-kinetikai módszerrel meghatározott K_D értékekre, így bebizonyítottam a fordított-kinetikai módszer alkalmazhatóságát a kinetikai paraméterek meghatározása során. Ennek köszönhetően a kinetikai paraméterek egy lépésben meghatározhatóak a felismerő molekulák regenerálása nélkül. A módszernek köszönhetően bonyolultabb, multipllett biomolekuláris kölcsönhatások egyensúlyi paraméterei is vizsgálhatóak, jóval gyorsabb meghatározást tesz lehetővé, ezen felül kevesebb célvegyület szükséges, így a módszer sokkal költséghatékonyabb.

Kutatómunkám célja az volt, hogy kidolgozzak egy olyan immobilizációs módszert, amelynek köszönhetően a mikrocseppentéssel előállított SPRi-szenzorchippek felületén elhelyezkedő PNS felismerő szálak optimális távolságra helyezkednek el egymástól. Erre a célra a PNS szálakat a komplementer szekvenciájú DNS szálakkal előhibridizált formában kötöttem ki az aranyozott szenzorchip felületére, amely során a tiol-végcsoporttal ellátott PNS szálak önrendeződő módon, közel kovalens erősségű Au-S kötés kialakításával kötődtek ki. Hipotézisünk az volt, hogy a hibridizált PNS bázisai kisebb mértékben tudnak nem-specifikus kölcsönhatással az arany felülethez kötődni és az előhibridizált PNS alkalmazásával spontán módon alakul ki az optimális felületi PNS receptor-sűrűség is, így biztosítva a nagyobb hibridizációs hatékonyságot.

Vizsgálataim elvégzéséhez több receptor szál szimultán vizsgálatára alkalmas képalkotó felületi plazmon-rezonanciás (SPRi - *Surface Plasmon Resonance Imaging*) módszert dolgoztam ki. Munkám során vizsgáltam a különböző PNS szálak hibridizációs hatékonyságát, meghatároztam a hibridizáció során elérhető maximális törésmutató változás (R_{max}) értékét és a felismerő szál felületi receptor-sűrűségét. Hipotézisünk igazolására komplementer szekvenciájú peptid-nukleinsav – mikroRNS szálak kötődési kinetikáját és a kötődés erősségét jellemző disszociációs egyensúlyi állandókat határoztam meg, valamint megvizsgáltam egy újfajta, úgynevezett fordított-kinetikai módszer alkalmazhatóságát az egyensúlyi paraméterek meghatározására.

Munkám eredményeit összefoglalva elmondható, hogy kidolgoztam egy újfajta immobilizációs módszert a peptid-nukleinsav felismerő szálak SPRi-szenzorchipre történő kikötésére, amelynek köszönhetően sikerült a szelektív felismerésre legalkalmasabb, optimális felületi receptor-sűrűséget önrendeződő (*self-assembly*) módon kialakítanom. A módszer számos további előnnyel bír a kinetikai vizsgálatok során és a koncentráció-dependencia meghatározásakor.

További terveim között szerepel, hogy a kidolgozott immobilizációs technikát alkalmazva nanopórusokat is módosítsak PNS szálakkal, és potenciometriás, valamint impedancia-spektroszkópiás módszerekkel is meghatározzam a mikroRNS biomarkereket. Az orvos-diagnosztikai módszerként történő alkalmazásnak feltétele, hogy rendkívül kis koncentrációban mérhessük a mikroRNS biomarkereket, így egy jelerősítési módszert kidolgozva szeretném megfelelően alacsony koncentrációra csökkenteni a kimutatási határt. Ennek során

1,4 nm nagyságú, a felületén 6 darab parciálisan pozitív töltésű primer-amin csoportot tartalmazó arany nanorészecskéket szeretnék elektrosztatikusan a negatív töltésű mikroRNS szálakhoz kötni, majd az arany katalitikus hatását kihasználva fém ezüstöt leválasztani a PNS foltokra. Reményeim szerint a módszerrel sikerül több nagyságrendnyi kimutatási határ javulást elérni, így kimutatni a keringésben néhány aM-os (attomólos) koncentrációban jelenlévő mikroRNS biomarkereket. Az ezzel kapcsolatos eddigi kísérleteim biztató eredményeket mutatnak.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy mérési eredményeim, és jövőbeli kutatási terveim kiváló kiindulópontjai olyan szenzorchip kifejlesztésének, amelyek orvos-diagnosztikai szempontokból is alkalmas a legtöbb mikroRNS biomarker szimultán (egyszerre akár több száz különböző szekvencia), szelektív, gyors, megbízható, betegágy melletti (POC – *Point of Care*) diagnosztizálására a jövő szenzoraiban (hasonlóképpen a napjainkban használt vércukorszint mérő szenzorokhoz vagy a terhességi tesztekhez).

6 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Gyurcsányi Ervin Róbert témavezetőmnek, hogy lehetőséget nyújtott OTDK dolgozatom megírásához, és biztosította számomra az ehhez szükséges modellvegyületeket és műszereket. Köszönettel tartozom a szakmai fejlődésem elősegítéséért.

Köszönöm Dr. Lautner Gergely konzulensemnek, hogy számos hasznos tanáccsal látott el, felkészített az alkalmazott műszerek és szoftverek kezelésére, bemutatta azok működését, és hogy szakmai kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzá.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a csoport minden egyes tagjának, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam feléjük, és hogy minden alkalommal készségesen segítettek munkámban.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, és barátaimnak a sok biztatást és támogatást.

- [1] C. Briones and M. Moreno, “Applications of peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs) in biosensor development.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 10, pp. 3071–89, Apr. 2012.
- [2] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, and T. Imanishi, “Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar puckering,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, no. 50, pp. 8735–8738, Dec. 1997.
- [3] C. Avitabile, L. Moggio, G. Malgieri, D. Capasso, S. Di Gaetano, M. Saviano, C. Pedone, and A. Romanelli, “ γ Sulphate PNA (PNA S): highly selective DNA binding molecule showing promising antigene activity.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e35774, Jan. 2012.
- [4] B. Hyrup and P. E. Nielsen, “Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, properties and potential applications,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 4, no. 1, pp. 5–23, Jan. 1996.
- [5] L. Zhang, D. Hou, X. Chen, D. Li, L. Zhu, Y. Zhang, J. Li, Z. Bian, X. Liang, X. Cai, Y. Yin, C. Wang, T. Zhang, D. Zhu, D. Zhang, J. Xu, Q. Chen, Y. Ba, J. Liu, Q. Wang, J. Chen, J. Wang, M. Wang, Q. Zhang, J. Zhang, K. Zen, and C.-Y. Zhang, “Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA.,” *Cell Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 107–26, Jan. 2012.
- [6] Y.-F. Xiao, X. Yong, Y.-H. Fan, M.-H. Lü, S.-M. Yang, and C.-J. Hu, “microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening (Review).,” *Oncol. Rep.*, vol. 30, no. 2, pp. 535–44, Aug. 2013.
- [7] E. M. Small and E. N. Olson, “Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology.,” *Nature*, vol. 469, no. 7330, pp. 336–42, Jan. 2011.
- [8] V. Oliveira-Carvalho, V. O. Carvalho, and E. A. Bocchi, “The emerging role of miR-208a in the heart.,” *DNA Cell Biol.*, vol. 32, no. 1, pp. 8–12, Jan. 2013.
- [9] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, “Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 2, pp. 102–14, Feb. 2008.
- [10] J. Homola, “Present and future of surface plasmon resonance biosensors.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, no. 3, pp. 528–39, Oct. 2003.
- [11] S. D. Evans and A. Ulman, “Surface potential studies of alkyl-thiol monolayers adsorbed on gold,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 170, no. 5–6, pp. 462–466, Jul. 1990.
- [12] G. Jágerszki, R. E. Gyurcsányi, L. Höfler, and E. Pretsch, “Hybridization-modulated ion fluxes through peptide-nucleic-acid- functionalized gold nanotubes. A new approach to quantitative label-free DNA analysis.,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 1609–12, Jun. 2007.

- [13] H. Li and L. Rothberg, "Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 39, pp. 14036–9, Sep. 2004.
- [14] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, and P. E. Nielsen, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules.," *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 566–8, Oct. 1993.
- [15] R. S. Varma, "Synthesis of Oligonucleotide Analogues with Modified Backbones," *Synlett*, vol. 1993, no. 09, pp. 621–637, 1993.
- [16] E. T. Kool, "Preorganization of DNA: Design Principles for Improving Nucleic Acid Recognition by Synthetic Oligonucleotides," *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 5, pp. 1473–1488, Aug. 1997.
- [17] S. Sforza, R. Corradini, G. Galaverna, A. Dossena, and R. Marchelli, "The chemistry of peptide nucleic acids," *MINERVA Biotechnol.*, vol. 11, no. 3, pp. 163–174, Sep. 1999.
- [18] K. A. Lennox and M. A. Behlke, "Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides.," *Gene Ther.*, vol. 18, no. 12, pp. 1111–20, Dec. 2011.
- [19] C. Leumann, "DNA Analogues: From Supramolecular Principles to Biological Properties," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 10, no. 4, pp. 841–854, Apr. 2002.
- [20] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, and P. E. Nielsen, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules.," *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 566–8, Oct. 1993.
- [21] A. RAY and B. NORDEN, "Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future," *FASEB J*, vol. 14, no. 9, pp. 1041–1060, Jun. 2000.
- [22] "Locked Nucleic Acid (LNA™)." [Online]. Available: <http://www.exiqon.com/lna-technology>.
- [23] A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, B. M. Frezza, C. Gayathri, R. R. Gil, and D. H. Ly, "A simple gamma-backbone modification preorganizes peptide nucleic acid into a helical structure.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 31, pp. 10258–67, Aug. 2006.
- [24] C. Briones, E. Mateo-Marti, C. Gómez-Navarro, V. Parro, E. Román, and J. Martín-Gago, "Ordered Self-Assembled Monolayers of Peptide Nucleic Acids with DNA Recognition Capability," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 93, no. 20, p. 208103, Nov. 2004.
- [25] A. Upadhyay, N. M. Ponzio, and V. N. Pandey, "Immunological response to peptide nucleic acid and its peptide conjugate targeted to transactivation response (TAR) region of HIV-1 RNA genome.," *Oligonucleotides*, vol. 18, no. 4, pp. 329–35, Dec. 2008.
- [26] G. N. Forrest, M.-C. Roghmann, L. S. Toombs, J. K. Johnson, E. Weekes, D. P. Lincalis, and R. A. Venezia, "Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 10, pp. 3558–63, Oct. 2008.
- [27] T. Ly, J. Gulia, V. Pyrgos, M. Waga, and S. Shoham, "Impact upon clinical outcomes of translation of PNA FISH-generated laboratory data from the clinical microbiology bench to bedside in real time.," *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 4, no. 3, pp. 637–40, Jun. 2008.
- [28] "PNA FISH tests identification of bacteria & yeast from blood | AdvanDx." [Online]. Available: <http://www.advandx.com/products/pna-fish-tests>. [Accessed: 11-Oct-2014].

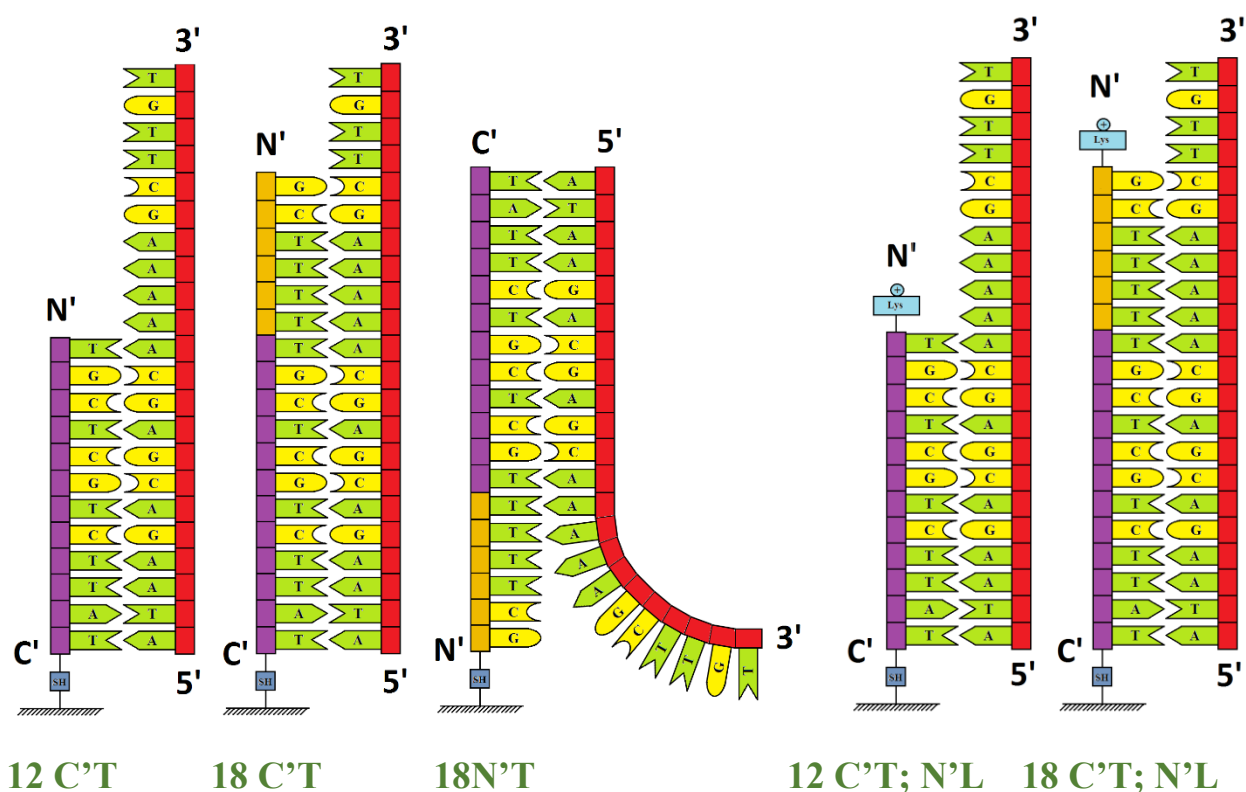
- [29] J. W. Kim, Y. J. Choi, H. J. Kim, J. S. Park, H. S. Nam, Y. Hwangbo, D. U. Kim, and K. S. Park, "Comparison of PNA probe-based real-time PCR and Cobas TaqMan MTB for detection of MTBC," *BioChip J.*, vol. 7, no. 2, pp. 85–88, Jun. 2013.
- [30] Y. J. Choi, H. J. Kim, H. B. Shin, H. S. Nam, S. H. Lee, J. S. Park, K. S. Park, and K. A. Baek, "Evaluation of peptide nucleic acid probe-based real-time PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens.," *Ann. Lab. Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 257–63, Jul. 2012.
- [31] M. González, C. E. Argaraña, and G. D. Fidelio, "Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding," *Biomol. Eng.*, vol. 16, no. 1–4, pp. 67–72, Dec. 1999.
- [32] "Custom PNA Oligomer." [Online]. Available: http://www.panagene.com/hp_yeh/eng/product/product_custompna.php.
- [33] E. M.-M. and C.-M. Pradier, *Intelligent and Biosensors*. InTech, 2010.
- [34] H. Aoki and Y. Umezawa, "Ion-channel sensors for electrochemical detection of DNA based on self-assembled PNA monolayers," *Nucleic Acids Symp. Ser.*, vol. 2, no. 1, pp. 131–132, Nov. 2002.
- [35] N. Prabhakar, K. Arora, S. K. Arya, P. R. Solanki, M. Iwamoto, H. Singh, and B. D. Malhotra, "Nucleic acid sensor for *M. tuberculosis* detection based on surface plasmon resonance.," *Analyst*, vol. 133, no. 11, pp. 1587–92, Nov. 2008.
- [36] T. Ratilainen, P. Lincoln, and B. Nordén, "A simple model for gene targeting.," *Biophys. J.*, vol. 81, no. 5, pp. 2876–85, Nov. 2001.
- [37] J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro, P. A. M. Farias, F. S. Valera, D. H. Grant, M. Ozsoz, and M. N. Flair, "DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 347, no. 1–2, pp. 1–8, Jul. 1997.
- [38] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, "Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly.," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 2, pp. 975–81, Aug. 2000.
- [39] C. Briones, E. Mateo-Martí, C. Gómez-Navarro, V. Parro, E. Román, and J. Martín-Gago, "Ordered Self-Assembled Monolayers of Peptide Nucleic Acids with DNA Recognition Capability," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 93, no. 20, p. 208103, Nov. 2004.
- [40] C. Briones, E. Mateo-Martí, C. Gómez-Navarro, V. Parro, E. Román, and J. A. Martín-Gago, "Structural and functional characterization of self-assembled monolayers of peptide nucleic acids and its interaction with complementary DNA," *J. Mol. Catal. A Chem.*, vol. 228, no. 1–2, pp. 131–136, Mar. 2005.
- [41] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–854, 1993.
- [42] L.-C. Wan, F. Wang, X. Guo, S. Lu, Z. Qiu, Y. Zhao, H. Zhang, and J. Lin, "Identification and characterization of small non-coding RNAs from Chinese fir by high throughput sequencing.," *BMC Plant Biol.*, vol. 12, no. 1, p. 146, Jan. 2012.
- [43] S. Griffiths-Jones, "The microRNA Registry.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. Database issue, pp. D109–11, Jan. 2004.

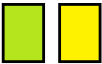
- [44] L.-L. Lv, Y.-H. Cao, H.-F. Ni, M. Xu, D. Liu, H. Liu, P.-S. Chen, and B.-C. Liu, "MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 305, no. 8, pp. F1220–7, Oct. 2013.
- [45] X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, and C.-Y. Zhang, "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases.," *Cell Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 997–1006, Oct. 2008.
- [46] J. W. Hagen and E. C. Lai, "microRNA control of cell-cell signaling during development and disease ."
- [47] Y.-F. Xiao, X. Yong, Y.-H. Fan, M.-H. Lü, S.-M. Yang, and C.-J. Hu, "microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening (Review).," *Oncol. Rep.*, vol. 30, no. 2, pp. 535–44, Aug. 2013.
- [48] E. M. Small and E. N. Olson, "Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology.," *Nature*, vol. 469, no. 7330, pp. 336–42, Jan. 2011.
- [49] X. Ji, R. Takahashi, Y. Hiura, G. Hirokawa, Y. Fukushima, and N. Iwai, "Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury.," *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 11, pp. 1944–9, Nov. 2009.
- [50] E. E. Creemers, A. J. Tijssen, and Y. M. Pinto, "Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 3, pp. 483–95, Feb. 2012.
- [51] T. E. Callis, K. Pandya, H. Y. Seok, R.-H. Tang, M. Tatsuguchi, Z.-P. Huang, J.-F. Chen, Z. Deng, B. Gunn, J. Shumate, M. S. Willis, C. H. Selzman, and D.-Z. Wang, "MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice.," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 9, pp. 2772–86, Sep. 2009.
- [52] K.-G. Shyu, B.-W. Wang, G.-J. Wu, C.-M. Lin, and H. Chang, "Mechanical stretch via transforming growth factor- β 1 activates microRNA208a to regulate endoglin expression in cultured rat cardiac myoblasts.," *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 15, no. 1, pp. 36–45, Jan. 2013.
- [53] M. Satoh, Y. Minami, Y. Takahashi, T. Tabuchi, and M. Nakamura, "Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy.," *J. Card. Fail.*, vol. 16, no. 5, pp. 404–10, May 2010.
- [54] G. Lautner and R. E. Gyurcsányi, "Electrochemical Detection of miRNAs," *Electroanalysis*, vol. 26, no. 6, pp. 1224–1235, Jun. 2014.
- [55] M. de Planell-Saguer and M. C. Rodicio, "Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 699, no. 2, pp. 134–52, Aug. 2011.
- [56] Y. Li, J. Lu, Y. Han, X. Fan, and S.-W. Ding, "RNA Interference Functions as an Antiviral Immunity Mechanism in Mammals," *Science (80-.)*, vol. 342, no. 6155, pp. 231–234, Oct. 2013.
- [57] L. Zhang, D. Hou, X. Chen, D. Li, L. Zhu, Y. Zhang, J. Li, Z. Bian, X. Liang, X. Cai, Y. Yin, C. Wang, T. Zhang, D. Zhu, D. Zhang, J. Xu, Q. Chen, Y. Ba, J. Liu, Q. Wang, J. Chen, J. Wang, M. Wang, Q. Zhang, J. Zhang, K. Zen, and C.-Y. Zhang, "Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA.," *Cell Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 107–26, Jan. 2012.

- [58] R. W. Wood, "XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum," *Philos. Mag. Ser. 6*, vol. 4, no. 21, pp. 396–402, Sep. 1902.
- [59] E. Kretschmann, "Decay of non radiative surface plasmons into light on rough silver films. Comparison of experimental and theoretical results," *Opt. Commun.*, vol. 6, no. 2, pp. 185–187, Oct. 1972.
- [60] A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Zeitschrift Phys.*, vol. 216, no. 4, pp. 398–410, Aug. 1968.
- [61] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing," *Sensors and Actuators*, vol. 4, pp. 299–304, Jan. 1983.
- [62] R. P. H. Kooyman, H. Kolkman, J. Van Gent, and J. Greve, "Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations," *Anal. Chim. Acta*, vol. 213, pp. 35–45, Jan. 1988.
- [63] H. J. Lee, A. W. Wark, and R. M. Corn, "Creating advanced multifunctional biosensors with surface enzymatic transformations.," *Langmuir*, vol. 22, no. 12, pp. 5241–50, Jun. 2006.
- [64] V. Kanda, J. K. Kariuki, D. J. Harrison, and M. T. McDermott, "Label-free reading of microarray-based immunoassays with surface plasmon resonance imaging.," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 24, pp. 7257–62, Dec. 2004.
- [65] "GYURCSÁNYI E. Róbert. Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában. Magyar Kémiai Folyóirat 2005. 111(3):133-142."
- [66] S. Fang, H. J. Lee, A. W. Wark, and R. M. Corn, "Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 43, pp. 14044–6, Nov. 2006.
- [67] G. Lautner, "'Szelektív szintetikus receptorok fejlesztése és alkalmazása fehérjék meghatározására' című doktori értekezés."
- [68] "SPR." [Online]. Available: http://www.photonics4life.eu/var/plain_site/storage/images/consortium/p4l-database/all-items/surface-plasmon-resonance-imaging/23832-2-eng-US/Surface-Plasmon-resonance-Imaging.jpg.
- [69] U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, and I. Rönnerberg, "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology.," *Biotechniques*, vol. 11, no. 5, pp. 620–7, Nov. 1991.
- [70] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species.," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–93, Feb. 2008.
- [71] G. Krishnamoorthy, E. T. Carlen, J. B. Beusink, R. B. M. Schasfoort, and A. van den Berg, "Single injection microarray-based biosensor kinetics," *Anal. Methods*, vol. 1, no. 3, p. 162, Dec. 2009.

8 MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: Nukleinsav kölcsönhatások



-  12 bázis hosszú PNS (C' vagy N' terminálison tiollal immobilizálva, N' terminálison lehet Lysin)
-  18 bázis hosszú PNS (C' terminálison tiollal, N' terminálison lehet Lysin)
-  18 bázis hosszú PNS (N' terminálison tiollal)
-  Lysin
-  Thyol
-  miR-208a mikroRNS-el analóg DNS
-  Szerves bázisok

2. számú melléklet: Szenzorchip cseppentési terve

SPRi-Biochip (HORIBA Genoptics, name: 1447, PN: 36000067, Date: 16/09/2013)

Sensor cleaning:

15 min UV/ozone

Source:

Greiner 384 well plate (blocked with Pierce ProteinFree Blocking Solution, 1h, 100 μ l/well),

Spotting definition: horiba_biochip_30-3_ver1.0_20130909.def

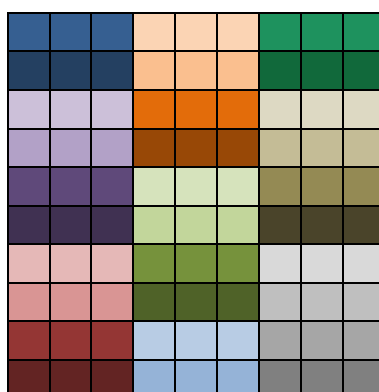
Spotting pin: stealth solid pin (Arrayit, tip = 375 μ m, catalog ID: SSP015)

Spotting temperature: 15°C

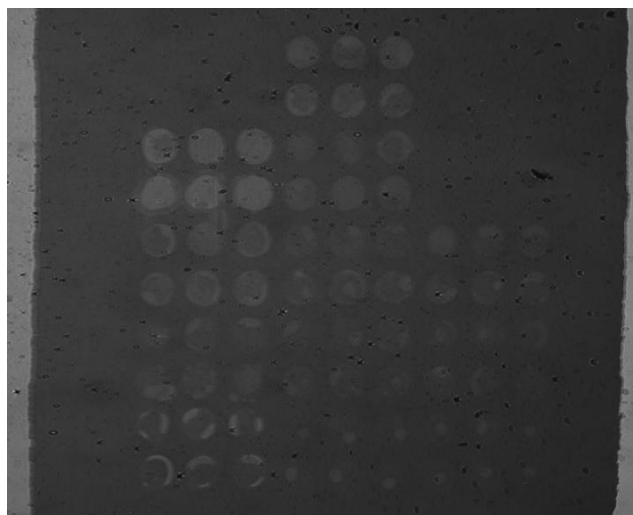
Spotting humidity: 65 rh%

Incubation after spotting: overnight

Spotting map:



Biochip map:



PBS: 10 mM phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), pH=7,4
Blocked: 1 mM MCH 6-merkapto-1-hexanol
spotting from: 20 μ l/well

well	species	well	species	well	species
A06		B10	10 µM miR PNA12(C'T)-DNA22	A16	
A05		B09	10 µM miR PNA12(C'T;N'L)-DNA22	A15	
B04	10 µM miR PNA18(C'T)-DNA22	A10	10 µM miR PNA18(N'T)-DNA22	B14	
B03	10 µM miR PNA18(C'T;N'L)-DNA22	A09	10 µM NC PNA-DNA18	B13	
A04	5 µM miR PNA18(C'T)-DNA22	B08	5 µM miR PNA18(N'T)-DNA22	A14	5 µM miR PNA12(C'T)-DNA22
A03	5 µM miR PNA18(C'T;N'L)-DNA22	B07	5 µM NC PNA-DNA18	A13	5 µM miR PNA12(C'T;N'L)-DNA22
B02	2.5 µM miR PNA18(C'T)-DNA22	A08	2.5 µM miR PNA18(N'T)-DNA22	B12	2.5 µM miR PNA12(C'T)-DNA22
B01	2.5 µM miR PNA18(C'T;N'L)-DNA22	A07	2.5 µM NC PNA-DNA18	B11	2.5 µM miR PNA12(C'T;N'L)-DNA22
A02	1.25 µM miR PNA18(C'T)-DNA22	B06	1.25 µM miR PNA18(N'T)-DNA22	A12	1.25 µM miR PNA12(C'T)-DNA22
A01	1.25 µM miR PNA18(C'T;N'L)-DNA22	B05	1.25 µM NC PNA-DNA18	A11	1.25 µM miR PNA12(C'T;N'L)-DNA22

well	species	100 µM PNA	100 µM DNA	well	buffer
A06					
A05					
B04	10 µM miR PNA18mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS	4 µL	4,8 µL		31,2 µL
B03	10 µM miR PNA18mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS	4 µL	4,8 µL		31,2 µL
A04	5 µM miR PNA18mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 µL B04	20 µL
A03	5 µM miR PNA18mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS			20 µL B03	20 µL
B02	2.5 µM miR PNA18mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 µL A04	20 µL
B01	2.5 µM miR PNA18mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS			20 µL A03	20 µL
A02	1.25 µM miR PNA18mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 µL B02	20 µL
A01	1.25 µM miR PNA18mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS			20 µL B01	20 µL

well	species	100 µM PNA	100 µM DNA	well	buffer
B10	10 µM miR PNA12mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS	4 µL	4,8 µL		31,2 µL
B09	10 µM miR PNA12mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS	4 µL	4,8 µL		31,2 µL
A10	10 µM miR PNA18mer (N' thiol)- miR DNA22mer in PBS	4 µL	4,8 µL		31,2 µL
A09	10 µM PC PNA18mer – PC DNA18mer in PBS	4 µL	4,8 µL		31,2 µL
B08	5 µM miR PNA18mer (N' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 µL A10	20 µL
B07	5 µM PC PNA18mer – PC DNA18mer in PBS			20 µL A09	20 µL
A08	2.5 µM miR PNA18mer (N' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 µL B08	20 µL
A07	2.5 µM PC PNA18mer – PC DNA18mer in PBS			20 µL B07	20 µL
B06	1.25 µM miR PNA18mer (N' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 µL A08	20 µL
B05	1.25 µM PC PNA18mer – PC DNA18mer in PBS			20 µL A07	20 µL

	well	species	100 μ M PNA	100 μ M DNA	well	buffer
	A16					
	A15					
	B14					
	B13					
	A14	5 μ M miR PNA12mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 μ L B10	20 μ L
	A13	5 μ M miR PNA12mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS			20 μ L B09	20 μ L
	B12	2.5 μ M miR PNA12mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 μ L A14	20 μ L
	B11	2.5 μ M miR PNA12mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS			20 μ L A13	20 μ L
	A12	1.25 μ M miR PNA12mer (C' thiol)- miR DNA22mer in PBS			20 μ L B12	20 μ L
	A11	1.25 μ M miR PNA12mer (C' thiol; N' Lysine)- miR DNA22mer in PBS			20 μ L B11	20 μ L

species	place			batch#	oligo#	name	aliquot#
miR DNS22mer	I	C	5	HA04406086-008	8013857176-000010	hsa-miR-208a DNS	5
miR PNA18mer (N' thiol)	III	E	3	2500702		miR208a-1812511PO-12	2
miR PNA18mer (C' thiol)	III	H	4	2232090		SQ-PNAOL-13082-130812PO-04 (miR208a-18)	1
miR PNA18mer (C' thiol; N' Lysine)	III	H	5	2232091		SQ-PNAOL-13083-130812PO-05 (miR208a-18-Lys)	1
miR PNA12mer (C' thiol; N' Lysine)	III	H	6	2232092		SQ-PNAOL-13084130812PO-06 (miR208a-12-Lys)	1
miR PNA12mer (C' thiol)	III	H	7	2232093		SQ-PNAOL-130851130812PO-07 (miR208a-12)	1

NC DNA18mer	I	E	5	HA03535235-006	8012339131-000060	NC-18 DNA	2
NC PNA18mer	III	G	1	2500700		NC-18120511PO-11	0

3. számú melléklet: Egyensúlyi állandó meghatározása különböző PNS szálakra

