



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Immobilizált antitestek vizsgálata Protein M és képalkotó felületi plazmon rezonancia alkalmazásával

TDK dolgozat

Szerző: Barna Sára

2. Évfolyam Vegyészmérnöki MSc

Témavezető: Dr. Gyurcsányi E. Róbert

tanszékvezető egyetemi docens, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Konzulens: Bognár Zsófia

Doktoráns, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Lezárva: 2023. január 10.

Tartalom

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Képkötő felületi plazmon rezonancia.....	5
2.1.1. A felületi plazmon rezonancia jelentősége	5
2.1.2. Elméleti háttér.....	5
2.1.3. Kinetikai analízis	7
2.2. Antitestek	8
2.3. Antitestek immobilizálása.....	11
2.3.1. Immobilizált antitestek orientáltsága	11
2.3.2. EDC/NHS kapcsolás.....	12
2.3.3. Immobilizálás antitest fragmenseken keresztül	14
2.3.4. Affinitás alapú immobilizálás	14
2.3.4.1. Biotin-sztreptavidin kölcsönhatás	14
2.3.4.2. Koordinációs kölcsönhatások alkalmazása antitestek immobilizálására	15
2.3.4.3. Antitestek immobilizálása antitestkötő fehérjékkel	16
2.4. Antitestkötő fehérjék.....	17
2.4.1. Protein A, Protein G és Protein L	17
2.4.2. Protein M	18
2.4.3. Az antitest-antigén kötés gátlására alkalmas biomolekulák	20
3. Felhasznált anyagok és alkalmazott módszerek	23
3.1. Felhasznált vegyszerek:	23
3.2. SPRi chip készítésének menete	24
3.3. SPRi mérések	25
3.4. Protein M tisztítása Zeba Spin sóalanító oszloppal	26
3.5. Részecskeméret meghatározása NTA-val.....	26
3.6. Antigének és Protein M biotinilálása méretnövelés céljából	27
4. Eredmények	28

4.1.	Koordinációs kölcsönhatással végzett immobilizálás megfelelőségének ellenőrzése	28
4.2.	Optimális regenerálási módszer kidolgozása	29
4.3.	Protein M affinitása különböző alosztályú antitestek esetében	30
4.4.	Protein M tisztítása Zeba Spin segítségével.....	33
4.5.	Protein M kinetikája.....	35
4.6.	Protein M antitest-antigén kötés blokkoló hatása CRP, NT-proBNP, cTnI antitestek esetén	37
4.7.	Kísérletek felületre immobilizált antigénekkal	38
4.8.	A kötésblokkoló hatás tágabb körű vizsgálata.....	41
4.9.	VLP részecskék vizsgálata NTA módszerrel.....	42
4.10.	A blokkolási effektus okának vizsgálata.....	43
4.11.	A sztérikus gátlóhatás igazolása méretnöveléssel.....	45
5.	Összegzés.....	48
6.	Irodalomjegyzék	49

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben az immunoassay-k a legfontosabb diagnosztikai eszközökké váltak az orvosi és környezeti analitikában, amelyhez nagyban hozzájárult az általuk elérhető nagy szelektivitás és érzékenység. Az egyszerű mintakezelés következtében a hétköznapi használatuk is széles körben elterjedt, gondoljunk csak a hCG kimutatására alkalmas terhességi tesztre vagy a manapság szintén elterjedt COVID-19 tesztekre.

A heterogén immunoassay-ek esetében az antitestek orientációja, felületi borítottsága jelentős hatással van a rendszer érzékenységére, valamint a kimutatási határára. A fent említett két tulajdonság elemzésére egy jól használható eszköz az SPRi, azaz a képalkotó felületi plazmon rezonancia. Az SPRi mérések során a felületközeli törésmutató változását követjük, így szükséges a vizsgálandó antitestek immobilizálása a chip arany felületére valamilyen immobilizációs technikával. A törésmutató változásból információkat vonhatunk le a kötődési kinetikára, affinitásra és szelektivitásra vonatkozóan, lehetőség van az antitest-antigén kölcsönhatások valós idejű monitorozására, jelölésmentesen, nagy áteresztőképességgel.

Az antitestek orientációjának és felületi koncentrációjának meghatározásában segítségünkre lehetnek olyan molekulák, amelyek az aminosav sorrendtől függetlenül képesek kötődni az antitestekhez. Ilyen, az antitestekhez univerzálisan kötődő molekulák az antitestkötő fehérjék: Protein A, Protein G, Protein L. Ezeket a fehérjéket széles körben alkalmazzák például az antitestek tisztítására az affinitás kromatográfiában. A Protein A és G az antitestek Fc régiójához kötődik, míg a Protein L a κ típusú könnyűláncához. A Protein M egy nemrég felfedezett antitestkötő fehérje, amely univerzálisan kötődik az antitestek variábilis régiójának konzervált részéhez, a könnyűlánc izotípusától függetlenül. Az irodalmi adatok alapján a Protein M meggátolja, hogy az antitest-antigén kölcsönhatás létrejöjjön, de a már kötésben lévő antigént nem szorítja ki. [1] Kutatómunkám célja a Protein M antitestkötő fehérje karakterizálása volt, nagy hangsúlyt fektetve az antitest-antigén kötést befolyásoló hatás tanulmányozására.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Képző felületi plazmon rezonancia

2.1.1. A felületi plazmon rezonancia jelentősége

Az SPR (felületi plazmon rezonancia) egy olyan optikai eljárás, amely manapság már elengedhetetlen fontosságú a biomolekuláris interakciók karakterizálására és kvantitatív jellemzésére. Az SPR a szenzor chip felületén létrejövő kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas módszer, ennek következtében kiváló a felületre immobilizált fehérjék koncentrációjának és a kötődések kinetikájának jellemzésére. Az SPR alkalmazása elsősorban antitest-antigén, fehérje-fehérje, nukleinsav-nukleinsav, illetve nukleinsav-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára terjed ki. Az orvosi, diagnosztikai, gyógyszerkutatói célok mellett környezeti és élelmiszer minták elemzésére is használják.

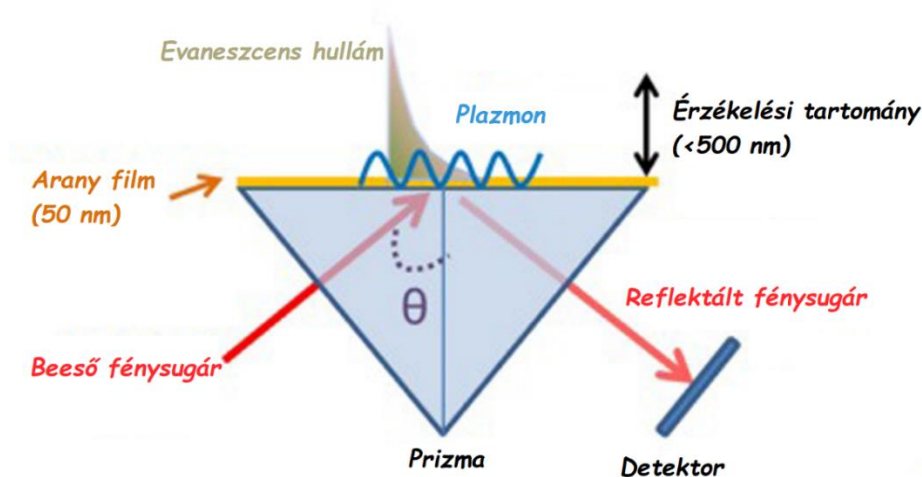
A módszer számos előnnyel rendelkezik. Jelölésmentes, tehát nem szükséges a felhasznált anyagokat radioaktív, fluoreszcens, enzim vagy egyéb jelölő molekulákkal vagy részecskékkel kapcsolni. A kölcsönhatások valós időben követhetők, megfelelő regenerálás után a chipet újra felhasználhatóak, a mérések hatékonyak, mintaigényük kicsi. Megfelelő technikák alkalmazásával elérhető a nem-specifikus kötődések minimalizálása is. [2] A jelölésmentes mérési lehetőség sok előnyt jelent a gyakran alkalmazott fluoreszcens és radiokémiai jelölésen alapuló eljárásokkal szemben. Egyrészt a mintaelőkészítési lépéseket elhagyva időt, vegyszereket és költséget spórolhatunk, illetve az anyagvesztés csökkenthető. Biomolekulák jelölése esetén olyan módosítás is bekövetkezhet, amely például a kötődési képesség elvesztését vagy a fehérjék denaturálását okozza, továbbá elkerülhető veszélyes (pl. radioaktív) reagensok felhasználása. [3]

Az utóbbi években számos fejlesztési irány valósult meg az SPR technikák területén [3]. A fejlesztési irányok egy ága, amikor valamilyen más módszerrel kapcsolják össze a felületi plazmon rezonanciás detektálást (pl. SPR-MS [4]), máskor különböző módszereket, hullámhosszokat alkalmaznak a megvilágításra (közép IR tartományú SPR [5]), illetve újfajta képző, jelfeldolgozási móddal ruházzák fel a technikát (SPRi). Ma már felületi plazmon rezonancia segítségével jelölés nélkül lehetséges sejtek tanulmányozása is. [6]

2.1.2. Elméleti háttér

Az SPRi módszer alapja a plazmon rezonancia. A plazmon rezonancia optikai bioszenzorként való felhasználhatóságát Liedberg és Nylander bizonyította 1982-ben. [7] Ha a síkban polarizált fénysugár optikailag sűrűbb közegből optikailag ritkább közegbe lép át, akkor a fénysugár egy része visszaverődik (1. ábra). Megfelelő beesési szög mellett a fény teljes visszaverődése is elérhető. Ha a két közeg határán egy vékony fémréteget helyezünk el, akkor a fotonok elektromos tere képes kölcsönhatásba lépni a fém

szabad elektronjaival, ennek hatására a szabad elektronok gerjesztődnek. A gerjesztett elektronokból létrejövő töltéssűrűség-hullámot nevezzük plazmonnak. A közegek törésmutatójának megváltozásával a plazmonok terjedési sebessége módosul, ennek következtében pedig a visszavert fénycsugár jellemzői is megváltoznak. Ha a fénycsugár kölcsönhatásba lép a szabad elektronokkal, a visszavert fénycsugár intenzitása jelentősen lecsökken. Az intenzitás-csökkenés mértéke függ az alkalmazott fénycsugár hullámhosszától és a közegek törésmutatójától. A beeső fénycsugár hullámhosszát és a beesési szöget állandó értéken tartva a visszavert fénycsugár intenzitás méréséből következtetni tudunk a törésmutatóra. Mivel a törésmutató függ a hőmérséklettől, fontos, hogy a méréseket precíz hőmérséklet szabályozás mellett végezzük. [8] [9]



1. Ábra- A megfelelő (θ) szög alatt beeső polarizált fénycsugár teljes visszaverődést szenved a prizma vékony fémréteggel borított oldalán. A visszavert fénycsugár elektromos tere kölcsönhatásba lép a fém szabad elektronjaival, amelynek hatására plazmonok keletkeznek. A plazmonok terjedési sebessége függ a felület közeli törésmutatótól, így, ha a törésmutatóban változás következik be az hatással lesz a reflektált fénycsugár intenzitására. [10]

A chip-ek egy üveg prizmából állnak, ennek a hatására következik be a fényvisszaverődés. A biochip ezen oldala vékony (kb. 50 nm vastag) fém, legtöbbször arany réteggel van bevonva. Az aranybevonat alkalmazása rendkívül kedvező, hiszen a biomolekulák immobilizálása jó reprodukálhatósággal lehetséges tiol-csoportokon keresztül. A megvilágító fényforrás (lézerdíóda) vörös vagy közeli IR tartományba eső sugárzást bocsájt ki. [11]

Munkám során SPR-i-t (*surface plasmon resonance imaging*), azaz képalkotó felületi plazmon rezonanciát alkalmaztam. Ebben a mérési módszerben egy CCD kamera rögzíti a chip teljes felületéről visszavert fény intenzitását egy adott beesési szög mellett, így a chip egész felülete folyamatosan

vizualizálható a mérés során. Ez a kialakítás lehetővé teszi, hogy egy biochipen akár több, mint 100 különböző mérési területet határozzunk meg és ezen felületeken a mért törésmutató változást azonos időben rögzítsük. Az SPRi technikát elősorban a kinetikai állandók meghatározásához, az aktuális kötőmennyiség és sztöchiometria méréséhez alkalmazzák. [3]

2.1.3. Kinetikai analízis

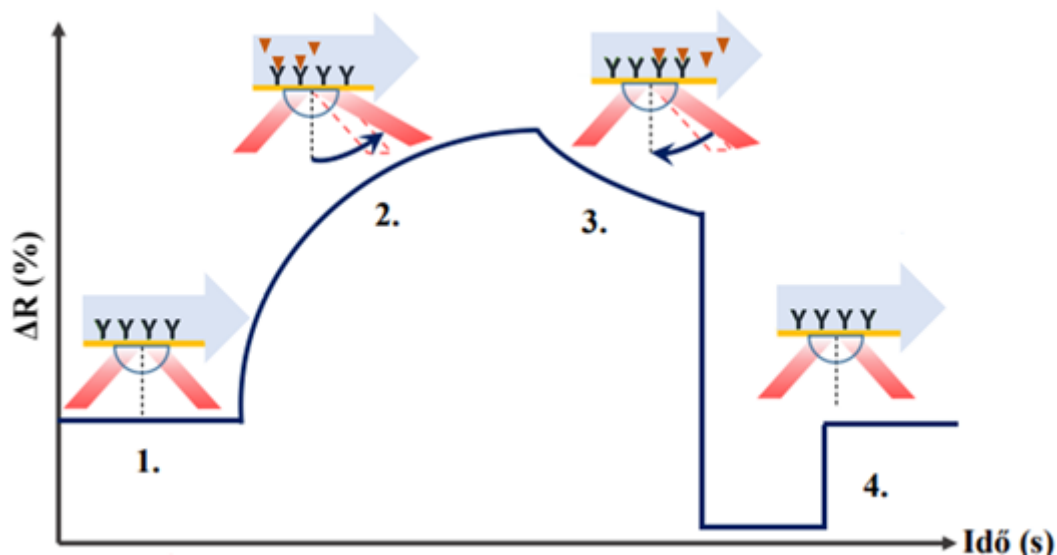
Az SPRi mérések jellemzően 4 jól elkülöníthető szakaszból állnak (2. ábra). Az első szakasz az alapvonal felvétele, majd ezt követi az asszociáció. Ezen szakaszban a chip felülete felett az áramló oldatban jelen vannak azok a molekulák (analátok), melyek képesek a felületre immobilizált felismerő molekulákkal (ligandumok) kölcsönhatásba lépni. Ha a ligandum (L) és az analát (A) között létrejön a kötődés, akkor megváltozik a felületközeli törésmutató és a visszavert fény intenzitása is. Az LA komplex koncentrációjának időbeli változását az (1) képlettel írhatjuk le:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a[L][A] - k_d[LA] \quad (1)$$

Ahol $k_a[L][A]$ a komplexképződés sebessége, $k_d[LA]$ pedig a bomlás sebessége, k_a és k_d az asszociációs és disszociációs sebességi állandó. Tehát, az asszociációs szakaszra felírható sebességi egyenlet függ a két reakcióba lépő molekula koncentrációjától és egy, az adott kölcsönhatásra jellemző állandótól (asszociációs sebességi állandó (k_a)). Ez az állandó azt mutatja meg, hogy egységnyi idő alatt, egységnyi analát (A) és ligandum (L) koncentrációk estén mennyi komplex (LA) keletkezik.

Az asszociációs szakaszban sok szabad A és L molekula van a rendszerben, ennek megfelelően itt a komplexképződés a meghatározó folyamat. A komplexképződéssel azonban folyamatosan csökken a szabad L és A molekulák koncentrációja, így az LA koncentráció lassuló ütemben nő. Ennek megfelelően ez a szakasz egy telítésbe hajló görbével jellemezhető, kialakul az úgynevezett állandósult (steady state) állapotot, amikor ugyanannyi komplex keletkezik és bomlik el egységnyi idő alatt. A dinamikus egyensúlyi állapot leírására az egyensúlyi disszociációs állandót használjuk (K_D) (2).

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[L][A]}{[LA]} \quad (2)$$



2. Ábra- A törésmutató változása és a plazmongörbe eltolódása a mérés során.

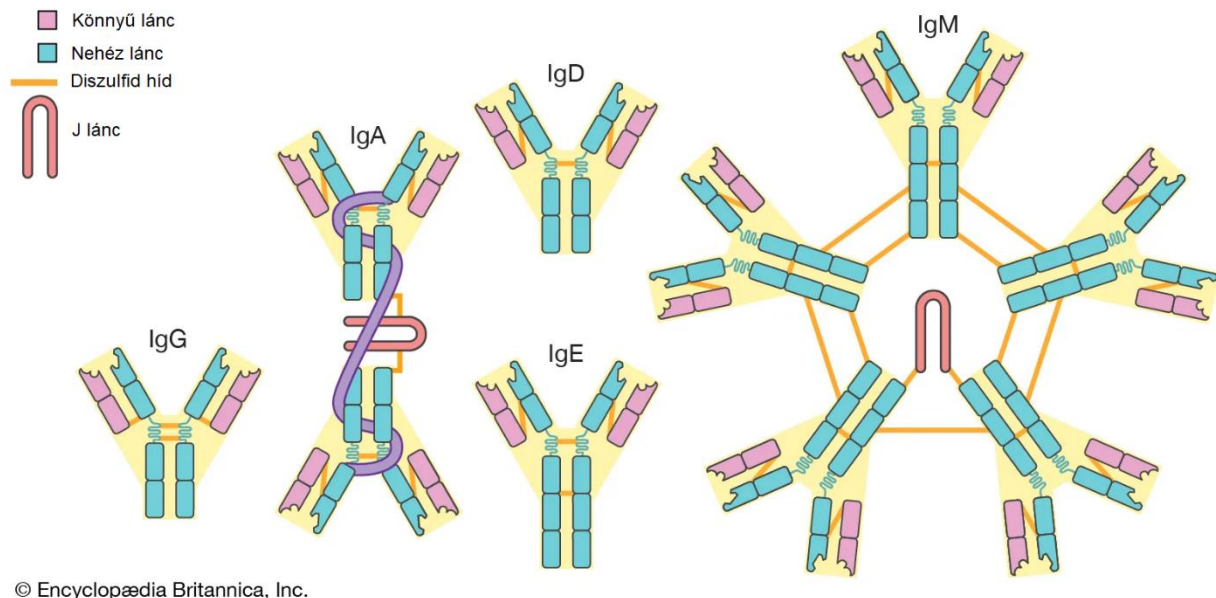
Lépések: 1. alapvonal felvétel, 2. asszociáció, 3. disszociáció, 4. regenerálás.

A disszociációs (harmadik) szakaszban a ligandumot nem tartalmazó pufferoldat áramlik a chip felett, így a komplexek disszociációja kerül előtérbe. A disszociáció jellemzésére a disszociációs sebességi állandót (k_d) használjuk, amely az adott komplex átlagos élettartamának reciproka. A disszociációs szakaszban a kötés erősségének megfelelő mértékben lecsökken a felülethez kötődött ligandumok mennyisége.

Az utolsó szakasz a regenerálás. Ez többféle tulajdonságú (savas/bázikus/ionos/hidrofób) regenerálóoldattal történhet. A regenerálás feladata, hogy a kialakult komplexeket megbontsa, a felületet visszaállítsa az eredeti állapotba, és ennek köszönhetően a chipen egy új, jellemzően más koncentrációjú analát kötődése vizsgálható legyen.

2.2. Antitestek

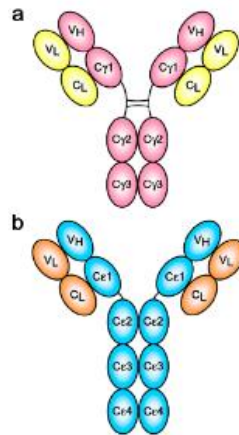
Az antitestek az immunrendszer védekezésében szerepet játszó fehérjemolekulák, a szervezetbe került idegen anyagokat (antigéneket) felismerik és segítik az eltávolításukat. Az antitesteket a B sejtek termelik. Az emberekben az antitestek öt osztályát különböztetjük meg: IgG, IgE, IgA, IgM, IgD (3. ábra). Az egyes osztályok a szerkezetükben és a szervezetben betöltött szerepükben térnek el egymástól. [12]



3. *Ábra*- Az emberi szervezetben megtalálható immunglobulinok szerkezete. [13]

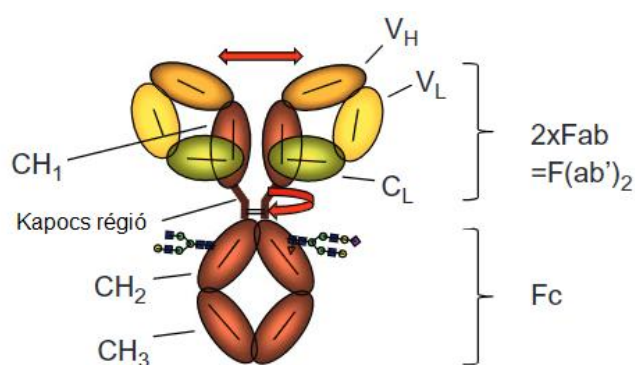
A pentamer szerkezettel rendelkező IgM típusú antitestek jelennek meg először a szervezetben, a fertőzést követő 1-2 napban (primer immunválasz). Az IgA molekulák különböző nyálkahártyákban találhatóak meg, a szervezetbe kerülő mikrobák ellen nyújtanak védelmet. Az IgA antitestek megtalálhatóak az anyatejben is, ennek köszönhetően védelmet nyújtanak a csecsemőknek, míg ki nem fejlődik a saját immunrendszerük. Az IgD molekulák monomerek, a B sejtek receptorai, a testnedvekből csak kis mennyiségben mutathatók ki. [14]

Az IgE, vagyis immunglobulin E az antitestek öt alosztálya közül a legkésőbb felfedezettet jelöli. Az IgE típusú fehérjék szervezetben betöltött szerepei közül jól ismertek az allergiás reakciók közvetítésében játszott funkciók, de az emlősök szervezetében a paraziták és egyes mérgek elleni védekezésben is szerepet játszanak. A legismertebb antitest alosztálytól az IgG-től abban tér el, hogy a nehézláncok eggyel több konstans domént tartalmaznak, és nem található meg bennük az úgynevezett kapocs régió (4. ábra). Az IgE antitestek Fc régiójának konformációja változékony, ennek következtében kiválóan alkalmasak szabályozó funkciók ellátására, valamint a konformáció változékonysága miatt rákos daganatok megcélzására is hasznosak lehetnek. [15]



4. **Ábra**- Az IgG (a) és IgE (b) antitest sematikus ábrája [15]

Munkám során elsősorban IgG típusú antitesteket használtam fel. Az IgG-k négy peptid láncból állnak, amelyeket másodlagos kémiai kötések és diszulfid hidak tartanak össze. Heterotetramer szerkezettel jellemezhetőek, alakjuk Y betűre emlékeztet. A láncok doménekből épülnek fel (5. ábra). A könnyű láncok két domént tartalmaznak, a nehéz láncok négy doménből állnak. Egy-egy domén kb. 70-110 aminosavat jelent. A doménekből az aminosavak sorrendje lehet kötött vagy változó. Kötött aminosavsorrend esetén beszélünk konzervatív doménről (CH_1 , CH_2 , CH_3 , CL), variábilis sorrend esetén variábilis doménről (V_H , V_L). A variábilis részben az aminosav sorrend rendkívül változatos, ezzel lehetővé téve a szervezetnek, hogy antigének millióinak megkötésére alkalmas antitesteket hozzon létre. A konzervatív régió alapján az antitesteket további alosztályokba sorolhatjuk: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. A könnyű láncnak két fő típusa ismert: a λ és κ típusú láncok. A kapocs régió diszulfid hidakat tartalmaz, ez a molekularesz felelős a láncok összekapcsolásáért (5. ábra) [12][16]



5. **Ábra**: Az antitestek felépítése. A két konzervatív CH_2 és CH_3 doménből álló homodimert Fc régió, míg a konzervatív CH_1 és C_L és a variábilis V_H és V_L doménből álló heterodimert Fab régiókat nevezzük. A könnyű és nehéz láncokat a kapocs régió köti össze. [17]

Egy másik csoportosítási rendszerben az antitesteket az egyes részek funkciója szerint osztják fel. A két darab kétszer két domént tartalmazó heterodimer egységet Fab (fragment antigen-binding) régióknak nevezzük. A Fab rész változatos felépítésű, ez a változatosság szükséges ahhoz, hogy a különböző antitestek különböző antigéneket kössenek meg szelektív módon. A két CH₂ és két CH₃ doménből álló homodimert nevezzük Fc (fragment crystallizable) régióknak, amely a szervezettel való kommunikációban vesz részt. [17]

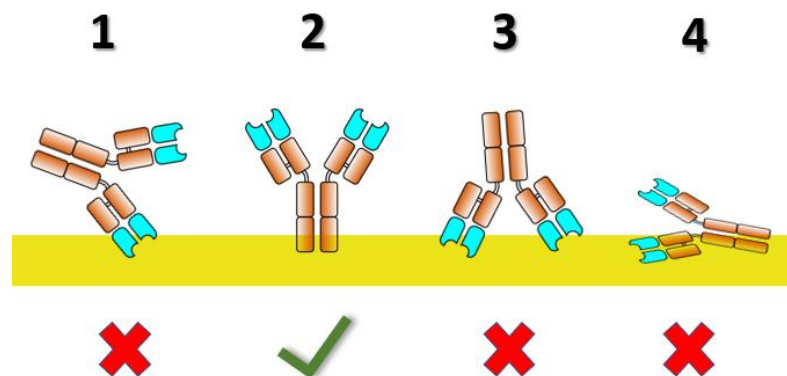
Az antitestek antigén felismerése rendkívül specifikus és szelektív, ennek következtében az antitestek kiválóan alkalmazhatóak a bioanalitikai vizsgálatok során is. Az antigénkötés nem-kovalens kölcsönhatások következtében, elsősorban van der Waals erők, elektrosztatikus kölcsönhatás és hidrogén hidak révén jön létre. Mivel a fent említett kölcsönhatások csupán gyenge, másodrendű erők, így az antigének számára fontos, hogy megfelelően, lehetőleg minél több ponton illeszkedjenek az antitestek kötőzsebébe.

2.3. Antitestek immobilizálása

A fehérjék immobilizálására való igény megjelenik az ELISA módszereknél és az immunkromatográfiás méréseknél. Az SPRi-t heterogén immunoassay vizsgálatokra alkalmazzák, amely esetben az egyik kölcsönható komponens jellemzően az antitest, ezért az SPRi vizsgálatok során szükséges, hogy az antitesteket valamilyen módszerrel a szenzor chip felületére immobilizáljuk. Az antitestek különböző felületekhez történő immobilizálása számos előnnyel járhat, többek közt egyszerűsödnek a tisztítási és elválasztási lépések, továbbá az antitesttel módosított felületek többször felhasználhatóvá válnak. Az utóbbi tényező nagy előnyt jelenthet egy mérési módszer esetén, különösen akkor, ha költséges biomolekulákat használunk fel. A szenzor érzékenysége, regenerálhatósága és stabilitása függ az alkalmazott antitestek típusától, mennyiségétől, az antitestek immobilizálás után fennmaradó aktivitásától és a felületen lévő antitestek megfelelő orientáltságától. [18]

2.3.1. Immobilizált antitestek orientáltsága

Az orientációt tekintve az immobilizálás alapvetően kétféle megközelítéssel valósulhat meg. Véletlenszerű orientáció esetén az antitestek több, a fehérje felületén elhelyezkedő funkciós csoporton keresztül kapcsolódhatnak a hordozófelülethez, ennek megfelelően a képződött rétegben az antitestek többféle orientációban találhatók meg (6. ábra). A véletlenszerű orientációt eredményező eljárások közé tartozik az adszorpció és az amin-csoportokon keresztüli kovalens kapcsolás (EDC/NHS reakció). Az ilyen típusú eljárások előnye az egyszerűség. Azonban magas a denaturálódás kockázata, alacsony a fehérjeréteg stabilitása és kisebb antigén kötési képesség érhető el, mint orientált immobilizációval. [18]



6. Ábra- A felülethez különböző orientációkban kapcsolódó antitestek
1. side-on, 2. end-on, 3. head-on, 4. lying-on orientációk

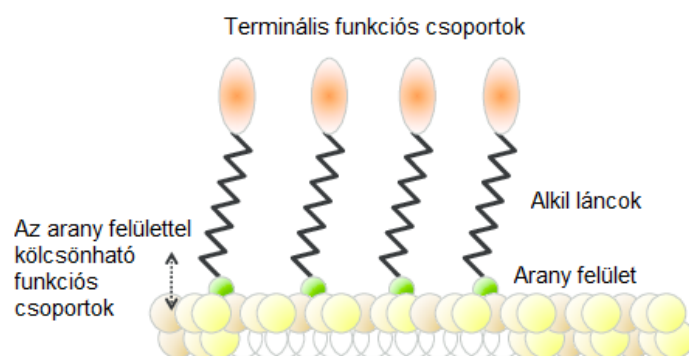
Az orientált immobilizáció célja, hogy valamilyen szelektív módszerrel az antitesteket egy adott orientációban, általában az Fc régió felhasználásával (end-on orientáció, 6. ábra 2.) kösse a felülethez, a maximális analátkötő képesség kihasználása érdekében. Hiszen ebben az esetben az antitest antigénkötő régiójától távol történik meg a kapcsolás, így várhatóan az antitest antigénkötő képessége megmarad, ez pedig együtt jár a kimutatási határ csökkenésével és a mérési módszer érzékenységének növekedésével. Az end-on orientáció további előnye, hogy lényegesen magasabb felületi antitest sűrűség érhető el, mint a többi orientációval. [19] Korábban igazolták, hogy end-on orientációban akár nyolcszoros jelnövekedés is elérhető a random orientációhoz képest. [20]

Az orientált immobilizáció a legtöbb esetben valamilyen funkciós csoport felhasználásával jön létre. A megfelelő módszer megtalálása mindig egy optimalizálási folyamattal jár, mivel a rendezett orientáció mellett nagy jelentősége lehet a felület élettartamának, ellenállóságának, a módszer összetettségének és költségének. Az antitestek felületi immobilizációjára alkalmazott eljárások a felhasznált kölcsönhatás jellege alapján három nagy csoportra oszthatók: fizikai, kémiai kölcsönhatáson alapuló és affinitás módszerek. [21]

2.3.2. EDC/NHS kapcsolás

Az EDC/NHS kapcsolás EDC (*N-etil-N-(3-dimetilaminopropil-karbodiimid)* és NHS (*N-hidroxiszukcinimid*) reakciója segítségével jön létre, amelyek képesek aktiválni a felületi karboxil-csoportokat, majd a fehérje amin-csoportjai és a felületi karboxil-csoportok könnyen reagálnak egymással, amid kötést hozva létre.

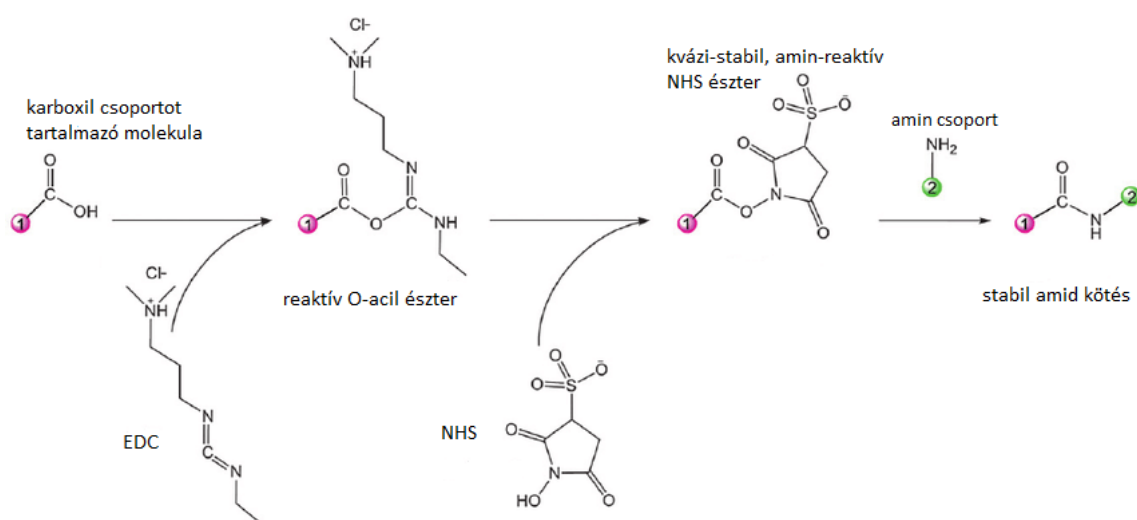
Az EDC/NHS reakciók előtt a módosítandó felületet előkezelik, szabad karboxil-csoportokat hozva létre, például karboxil végcsoporttal rendelkező, hosszú szénláncú alkántiolokat (pl. merkaptoundekán sav) immobilizálva a felületre (7. ábra). [18]



7. Ábra- Tiol csoportokon keresztül az arany felületre immobilizált karboxil-csoporttal rendelkező alkántiolok [22]

A felületi karboxil csoportokat a pH megfelelő beállításával aktiválják, ezen körülmények között az EDC egy bomlékony, reaktív O-acilésztert hoz létre a felületen, amelyhez hozzákötődnek az NHS molekulák és egy kvázi-stabil, amin-reaktív NHS-észter alakul ki (8. ábra). Ez a kialakult NHS-észter képes reagálni a fehérjét alkotó aminosavak oldalláncaival, általában a lizin oldallánccal.

Natív konformációjú antitest esetén a hidrofób funkciós csoportok a fehérje belseje felé, a hidrofíl csoportok kifelé állnak. Mivel az amin funkciós csoporttal rendelkező aminosavak hidrofíl karakterűek, így könnyen hozzáférhetőek a felületre immobilizált reagensek számára. Fontos szem előtt tartanunk, hogy amin oldalláncú aminosavak közel azonos gyakorisággal fordulnak elő az antitest minden pontján, ezért a felületen kialakult antitestréteg heterogén orientációjú lesz. Ennek következtében az antigén megkötésének képessége is alacsonyabb, mint egy orientált immobilizációs technikánál. [23]

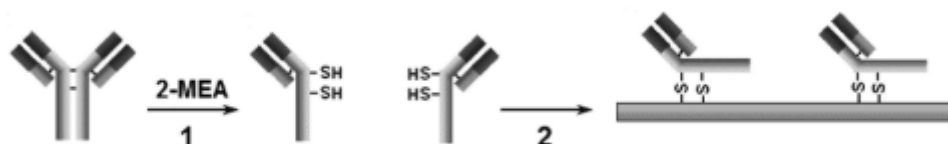


8. Ábra- Az EDC/NHS kapcsolás során a felületen lévő karboxil csoportok elreagálnak az EDC (N-etil-N-(3-dimetilaminopropil-karbodiimid)), majd az NHS (N-hidroxi-szukcinimid) molekulákkal. Az ezt követően kialakult kvázi-stabil NHS-észter képes kapcsolódni a fehérje amin oldalláncaihoz. [24]

2.3.3. Immobilizálás antitest fragmenseken keresztül

Immunanalitikai szenzorokban egy kézenfekvő megoldás lehet antitestek immobilizálására a natív IgG-k tiol-csoportjainak felhasználása, hiszen legtöbbször valamilyen arany felületet alkalmazunk, az Au-S kölcsönhatás révén pedig a tiol-csoportot tartalmazó molekulák jól definiáltan immobilizálhatóak. Ennek megfelelően az aminosavak közül nem csak az amin és karboxil oldalláncúakat tudjuk a kötéshez felhasználni, hanem a tiol-csoportot tartalmazókat is (cisztein). [25]

Abban az esetben, ha nem áll rendelkezésünkre megfelelő mennyiségű vagy helyzetű cisztein, a diszulfidhidak kémiai redukciójával vagy génmérnökségen keresztül létrehozhatóak az antitestek különböző fragmensei, melyek tiol-csoportjaikon keresztül képesek az arany felülethez kötődni (9. ábra), az így létrehozott tiol-csoportokkal, a megfelelő orientációnak köszönhetően, magas érzékenység érhető el. A módszer hátránya, hogy nagyon kompakt antitest fragmens réteg alakul ki a felületen, amely szterikus módon akadályozhatja a nagy molekulatömegű antigének megkötését. Továbbá az antitestek kémiai emésztése során a biológiai aktivitás elvesztése is könnyen felléphet. A génmérnökség útján előállított antitest fragmensek stabilitása limitált. [18]



9. Ábra- Az antitestben lévő diszulfid hidak megbontása redukzív ágenssel (1. lépés). Az így létrejött szabad tiol-csoportok kölcsönhatnak a szenzor arany felületével (2.lépés), ezáltal orientált immobilizációt hozva létre. [2]

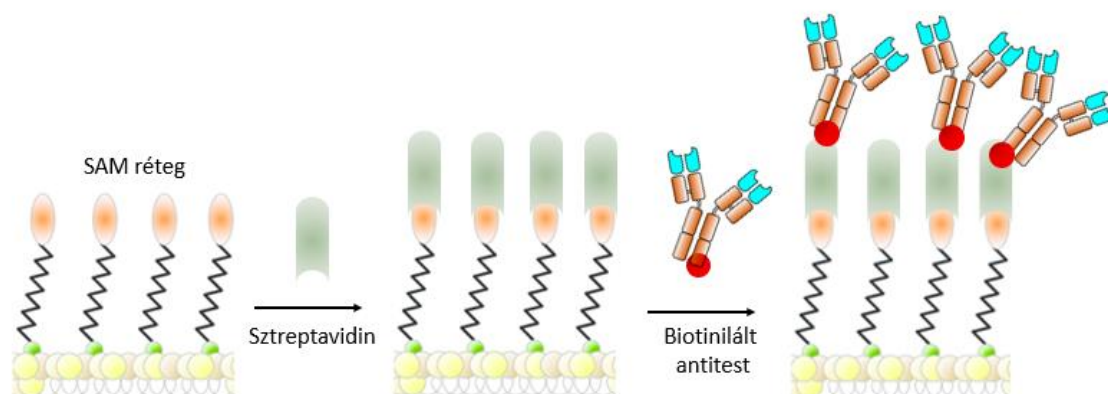
2.3.4. Affinitás alapú immobilizálás

Az affinitás alapú immobilizálás ma már sokféle módon megvalósulhat. A legismertebb immobilizálási technika az antitestkötő fehérjék (pl. Protein A, Protein G) felhasználása. Továbbá ezen módszercsaládba sorolhatók a biotin-sztreptavidin kölcsönhatáson alapuló módszerek, az egyes aminosavak fém affinitásának kihasználása és az Fc specifikus antitestek alkalmazása. Az említett módszerek mellett ma már alkalmaznak például kalixarén alapú [26], és foszfatáz-hisztidin fuzionált proteinnel történő immobilizálást is [27].

2.3.4.1. Biotin-sztreptavidin kölcsönhatás

A biotin nagy affinitással rendelkezik a sztreptavidin és avidin fehérjékhez, olyannyira, hogy az avidin-biotin kölcsönhatás a legerősebb nem-kovalens kölcsönhatás egy fehérje és egy ligandum között ($K_D=10^{-15}$ M), ennek megfelelően ez a módszer rendkívül erős kötést biztosít. Az így immobilizált antitest

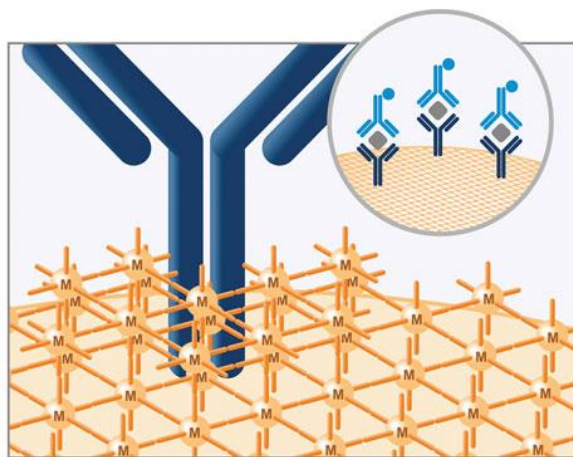
antigénköteése jól vizsgálható, mert a kialakult antitest-antigén komplex gyengébb kötődést mutat, mint az immobilizáló biotin-sztreptavidin reakció. Emellett az avidin és a sztreptavidin molekulák 4 biotin kötőhellyel rendelkeznek, így keresztkötések is kialakíthatóak. Mivel a biotin egy viszonylag kis molekula (MW=244 Da), az antitestek biotinilálása könnyen elvégezhető, a biotinilált antitest pedig a felületre immobilizált sztreptavidin vagy avidin molekulához kötődik (10. ábra). [28] Az immobilizálási módszer hátránya azonban, hogy szükséges az antitestek kovalens jelölése, biotinilálása. Továbbá az antitest felületén a biotin random eloszlásban helyezkedik el, ezzel akár az antigénköti helyet is módosítva.



10. Ábra- Antitestek immobilizálásának menete sztreptavidin és biotin segítségével. A létrehozott SAM (Self-Assembled Monolayer) rétegre EDC/NHS kapcsolással kovalens módon immobilizálható a sztreptavidin, amely nagy affinitással képes megkötni a biotinilált antitesteket.

2.3.4.2. Koordinációs kölcsönhatások alkalmazása antitestek immobilizálására

Az immobilizált fém affinitás kromatográfiában (IMAC, *immobilized metal affinity chromatography*) már régóta felhasználnak különböző átmenetifém ionokat (Ni^{2+} , Cr^{2+}) az antitestek megkötésére. Ezek az átmenetifém komplexek hatékonyak lehetnek a kromatográfiában a hagyományos Protein A vagy Protein G alternatívájaként, elsősorban a jelenős árkülönbség folytán. [29] Egyes kutatócsoportok tanulmányozták, hogy az előbb említett, kromatográfiában alkalmazott fém affinitási kölcsönhatást az antitestek immobilizációjára hogyan lehetne alkalmazni. A vizsgálatok során a felületek antitestköti képességét vizsgálták, valamint az immobilizálás hatását az antigénköti képességre, hiszen az antitestek immobilizálásánál nemcsak a felületi sűrűség befolyásolja az assay tulajdonságait, hanem az is lényeges, hogy az antitestek megfelelő orientációban, a natív szerkezetüket és ezáltal antigénköti képességüket megőrizve kerüljenek immobilizálásra. [30] A sokféle vizsgált komplex közül a legjobb antitestköti képességet a $[\text{Cr}(\text{OH})_6]^{3-}$ komplex esetében kapták. [31] AFM (atomerő mikroszkópia - *atomic force microscopy*) vizsgálatok segítségével azt is kimutatták, hogy a króm csökkenti az antitestek aggregációját, így a felület egyenletesebb borítottsága érhető el ezzel a módszerrel. [32]



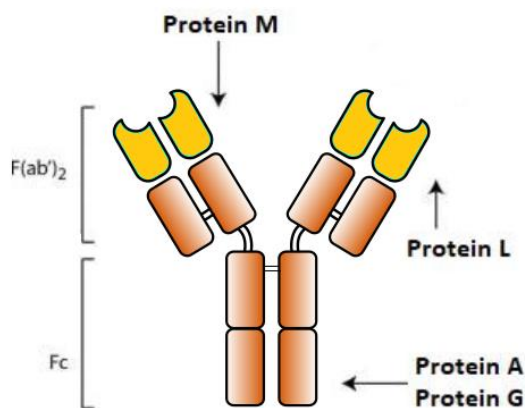
11. Ábra- A polimer mátrixba ágyazott átmenetifém ionok (M) képesek az antitestek Fc régiójával kelát komplexet alkotni, és ezáltal orientált immobilizációt létrehozni. [33]

A kereskedelmi forgalomban is kapható króm tartalmú, komplexképzést felhasználó termék (*Mix & Go*, *AnteoBind* (*AnteoTech*)) (11. ábra). A *Mix & Go* az antitestek hisztidinben gazdag régiójával alkot kelát komplexet, tehát a nehéz lánc CH₃ doménjához a legnagyobb az affinitása. [31] Munkám során EDC/NHS kapcsolással, illetve *Mix & Go* oldattal végeztem az antitestek immobilizálást.

2.3.4.3. **Antitestek immobilizálása antitestkötő fehérjékkel**

A *Mycoplasma* baktériumok egy része képes olyan immunglobulinkötő fehérjék termelésére (például Protein A, Protein G, Protein L, Protein M), amelyek erős, nem szelektív antitest affinitással rendelkeznek, mely tulajdonságukat kihasználhatjuk az antitestek rögzítésére. Az antitestkötő fehérjéket gyakran alkalmazzák antitestek immobilizálására, elsősorban a kromatográfiában, de ma már az immunanalitikai felhasználásuk is széles körben elterjedt. Az antitestkötő fehérjék első felhasználása szenzorokban 1987-ből származik, amikor kvarckristály mikromérleg alapú piezoelektromos bioszenzort fejlesztettek az IgG kimutatására. [34]

Az antitestkötő fehérjéknek tehát azokat a molekulákat nevezzük, melyek magas affinitást mutatnak az IgG típusú antitestek valamely meghatározott részéhez. Ha ezeket az antitestkötő fehérjéket egy felületre immobilizáljuk biotinilálással, tiolozással vagy a fent említett módszerek valamelyikével, majd antitesteket adunk hozzájuk, akkor az antitestek magas szintű orientált immobilizációját érhetjük el. A megfelelő orientáltság érdekében érdemes az immobilizáláshoz olyan antitestkötő fehérjét választani, amely az Fc régióra specifikus (12. ábra). [2]



12. Ábra- Az egyes antitestkötő fehérjék (Protein A, Protein G, Protein L, Protein M) affinitási helye.

Az antitestkötő fehérjékkel létrehozott receptorréteg előnye a nagymértékű orientáció, ennek megfelelően a nagy érzékenység. További előny, hogy az antitest konformációja nem sérül az immobilizálás során. Hátránya, hogy csak néhány antitest osztályra léteznek ilyen specifikus antitestkötő fehérjék és több esetben létrejöhetnek nem-specifikus kölcsönhatások vagy keresztreakciók, amelyek csökkentik az érzékenységet. A szenzor felületének regenerálása sem lehetséges, hiszen az antitestkötő fehérje és az antitest közti kötés már enyhe regeneráló szerek hatására is megbontható.

2.4. Antitestkötő fehérjék

A patogén baktériumok evolúciós harcot vívnak a gazdaszervezet immunrendszerével, ennek megfelelően sokféle védekezési mechanizmus fejlődött ki az immunrendszer működésének akadályozására. A baktériumok olyan antitestkötő fehérjéket termelhetnek, amelyek segítenek elkerülni a gazdaszervezet immunválaszát, ezen membránfehérjék lehetővé teszik a baktérium számára, hogy IgG-k kötődjenek meg a felszínén, így „álcázva magát” a gazdaszervezet előtt. A fent említett fehérjék képesek az antitestek rögzítésére, jelölésére és az antitest-antigén kölcsönhatás gátlására is.[35]

A leggyakrabban előforduló antitestkötő fehérjék a Protein A, Protein G, Protein AG, Protein L és újabban a Protein M.

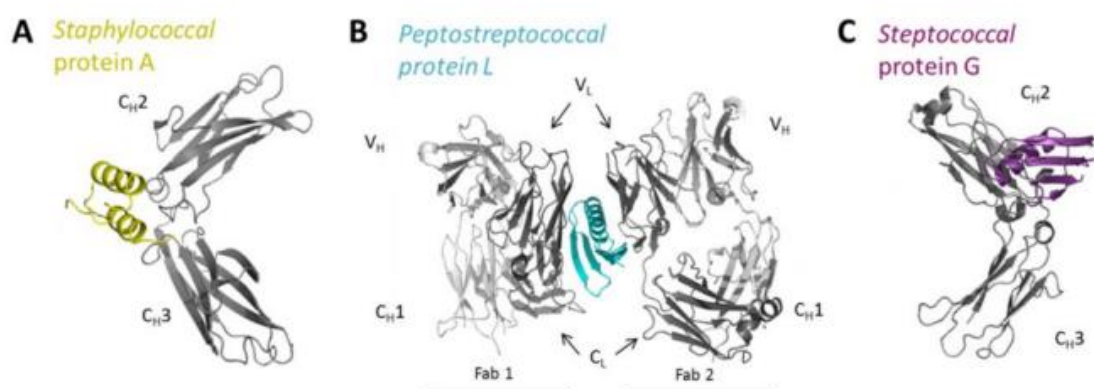
2.4.1. Protein A, Protein G és Protein L

A Protein A (45 kDa), Protein G (32 kDa) és Protein L (36 kDa) molekulák jól karakterizált membránfehérjék (13. ábra), melyeket különböző streptococcus baktériumok termelnek (pl. *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus magnus*). Ahogy a 12. ábrán is látható a Protein A és G az antitestek Fc régiójához kötődik nagy affinitással (CH₂, CH₃ domén), a Protein L a κ típusú könnyűlánchoz. Bár a Protein L a Fab régióhoz kötődik, nincs információ arról, hogy kötődése befolyással lenne az antitest

antigénkötő képességére. A Protein A és L fehérje lúgos közegben ($\text{pH} \approx 7,5 - 8,2$), míg a Protein G savas közegben ($\text{pH} \approx 5$) kötődik jobban. [36] Általánosságban elmondható, hogy a Protein G erősebb kötést tud létrehozni az antitestekkel, mint a Protein A, de az IgG kötő képesség erősen függ az antitestet termelő fajtól is. [17][37]

Mivel az előbbieken említett két Fc régióra specifikus antitestkötő fehérje az IgG-k más aminosav szekvenciából álló részéhez kötődik és szerkezetük eltérő, a két molekulából kémiai rekombinációval létrehozták a Protein AG fehérjét. [38] A Protein AG antitestkötő fehérje viszonylag elterjedten használható, így ennek mintájára megalkottak egyéb hibrid fehérjéket is, például a Protein LG-t, amely 4 könnyűlánc, valamint 2 Fc kötő domént tartalmaz. [39]

A Protein A és G fehérjéket elterjedten alkalmazzák az antitestek tisztítására az affinitás kromatográfiában, azonban a bakteriális úton előállított antitestkötő fehérjék termelése költséges, valamint elszennyezhetik a tisztítandó mintát, így számos kutatócsoport dolgozik mesterséges alternatívákon. Egy ilyen alternatíva lehet a Protein Z, mely a Protein A B doménját tartalmazó szintetikus fehérje. Mivel a Protein Z specifikusan az antitestek Fc régiójához kötődik, orientált immobilizáció létrehozására kiválóan alkalmas, bár az antitest affinitása alacsonyabb, mint a Protein A-nak. [40]

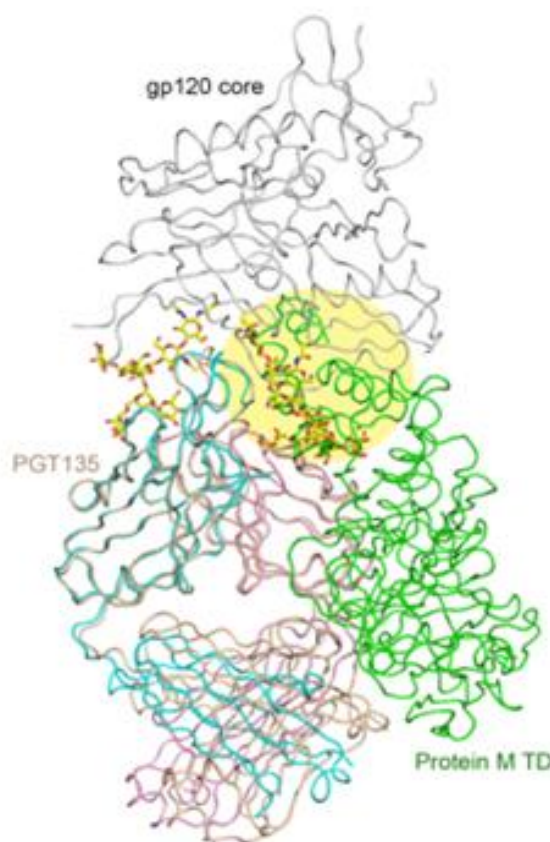


13. Ábra- Antitestkötő fehérjék szerkezete A) Protein A, B) Protein L, C) Protein G. [41]

2.4.2. Protein M

A Protein M (MG281) egy olyan, még karakterizálatlan membránfehérje, amely nagy affinitással kapcsolódik a humán és nem humán IgG molekulákhoz, így számtalan immunanalitikai felhasználásra lehet alkalmas a későbbiekben. A Protein M fehérjét *Mycoplasma genitalium* baktériumban fedezték fel 2014-ben.

A Protein M (62 kDa) szerkezete teljesen eltér a többi antitestkötő fehérjétől. Míg a Protein A és G több, kisméretű IgG-kötő domént tartalmaz, a Protein M-ben csak egy régió található, amely alkalmas az antitest megkötésére és eddigi tudásunk alapján a Protein M rendelkezik a legnagyobb kölcsönhatási felülettel. [1]



14. Ábra- Protein M (zöld) molekula kölcsönhatása PGT135 antitesttel. Az ábrán a sárgával jelölt részben a Protein M molekula C-terminális doménja gátolja az antigén megkötését. [1]

A Protein M fehérje a variábilis régió konzervatív részéhez kötődik (12. ábra), a könnyűlánc izotípusától (κ , λ) függetlenül és meggátolja az antitest-antigén kölcsönhatás létrejöttét, az irodalomban vizsgált vírusok (HIV-1, H5N1, Ebola, Lupusz, Goodpasture) esetében. A kölcsönhatás blokkolása valószínűleg a nagyméretű C-terminális domén szterikus kizorító hatása miatt lép fel, ugyanis a molekula ezen része lefedí a kombinációshely bejáratát. (14. ábra) A szterikus kizorítást támaszthatja alá az is, hogy a Protein M molekula a már kötésben lévő antigént nem szorítja ki a komplexből. [1]

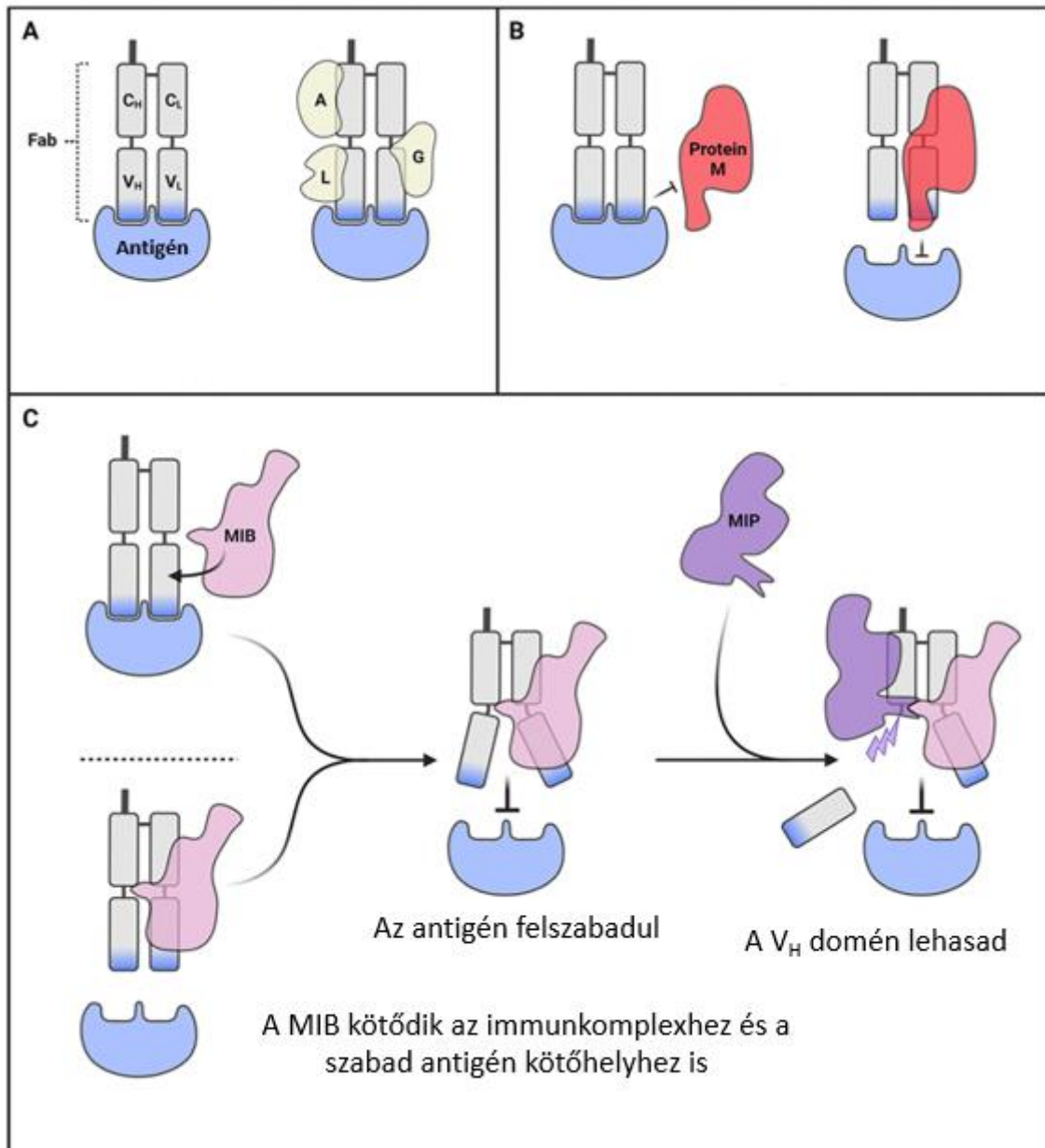
A dolgozatomban bemutatott kutatási munka fő célja a Protein M fehérje karakterizálása. Annak érdekében, hogy minél jobban megértsük a Protein M antitestekhez való kötődésének mechanizmusát elvégeztem a kinetikai állandók meghatározását, továbbá a fehérje antitest-antigén kötés gátló hatását tanulmányoztam. Céлом volt SPRi felhasználásával bizonyítani, hogy a Protein M valóban szterikus okok miatt képes az antigén megkötődésének blokkolására.

2.4.3. Az antitest-antigén kötés gátlására alkalmas biomolekulák

A baktériumok egy része MIB-MIP rendszer segítségével védekezik a gazdaszervezet immunrendszere ellen. A MIB (*Mycoplasma IgG binding protein*) képes az antitest Fab régiójához kötődni, majd ehhez kapcsolódik a MIP (*Mycoplasma IgG proteáz*) fehérje, amely szerin proteáz tulajdonságának köszönhetően képes az antitestek széles körében a nehéz lánc variábilis doménjának eltávolítására. Az ily módon emésztett antitest már nem lesz képes az antigén megkötésére. Az antitest emésztéséhez mindkét fehérjére szükség van. [42]

Az előző fejezetben említett, az antigénkötést valószínűleg sztérikusan gátló Protein M és a MIB fehérje erős szerkezeti hasonlóságot mutat, annak ellenére, hogy aminosavszekvenciájuk nagyon eltérő. A MIB a Protein M-mel közös „magot” tartalmaz, amelyhez kapcsolódik egy nagyméretű N-terminális domén, amelynek kulcsfontosságú szerepe van a MIP-pel való kölcsönhatásban (15. ábra). A MIB valószínűleg a Protein M evolúciós őse. Míg a MIB-MIP rendszer gyakori a *Mycoplasma* baktériumok körében, a Protein M csak néhány fajban található meg. [43]

Nemrég felfedeztek a *Mycoplasma bovis* baktériumokban egy újfajta membránfehérje párt, mely többféle állatmintából származó IgG megkötésére és emésztésre alkalmas, a MIB-MIP rendszerhez hasonlóan. Az r0375 fehérje kötődik az antitest Fab régiójához, az ehhez kötődő r0376 fehérje pedig elhasítja a nehézláncot. Az r0375 fehérje szerkezete nagyon hasonló a Protein M és a MIB fehérje szerkezetéhez. Továbbá azt tapasztalták, hogy az r0375 fehérje a Fab régióhoz való kötődése során részben gátolja az antigén megkötését, a Protein M-hez hasonlóan. Az antigénkötés blokkolási kísérletekben rPVPA antigéneket és hozzá tartozó antitesteket használtak fel. [44]

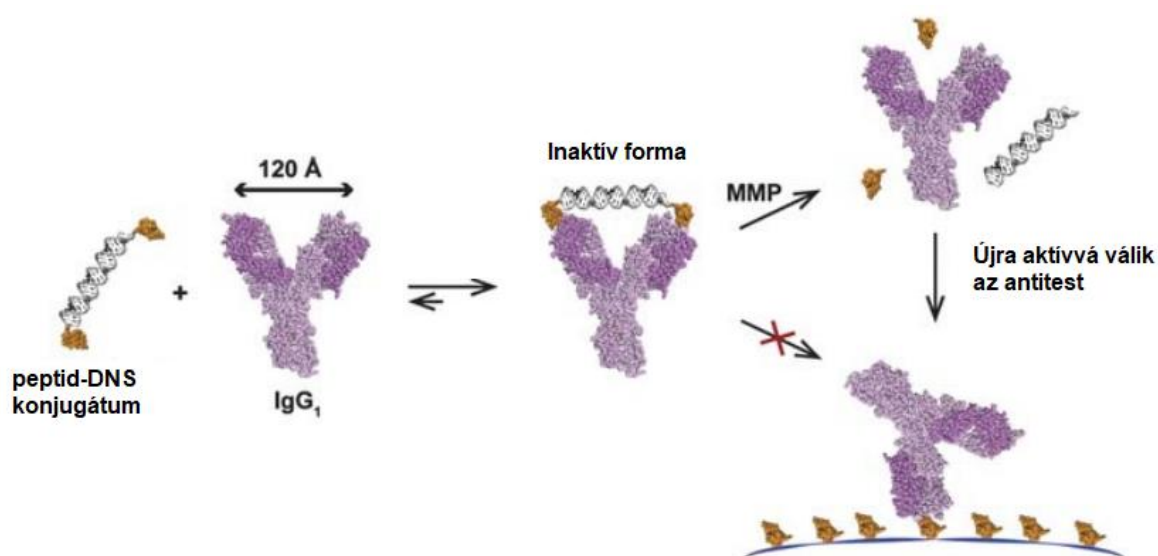


15. Ábra - (A.) Egyes baktériumok membránfehérjéi (Protein A, G, L) képesek a Fab régióhoz kötődni, anélkül, hogy megzavarnák az immunkomplex létrejöttét (a Protein A és G affinitása az Fc régióhoz jóval magasabb, mint a Fab-hoz, de részben a Fab régió kötésére is alkalmasak) (B.) A Protein M a szabad Fab régióhoz kötődve gátolja az antigén megkötését. (C.) A MIB képes a szabad antitestekhez és az immunkomplexekhez egyaránt kötődni. Kötődéskor a korábban megkötött antigén felszabadulását vagy a szabad antitestek antigénkötésének gátlását eredményezi. Ezt követően csatlakozik a rendszerhez a MIP, amely proteolitikus hasítással végérvényesen inaktíválja az antitestet.[43]

A Protein M és az r0375 fehérje antigénkötés gátlása reverzibilis, szemben a MIP-MIB rendszerrel végzett hasítással. Az antigénköthelyek reverzibilis, nem-kovalens blokkolása egy hatékony eszköz lehet

az antitest alapú molekuláris felismerések szabályozására, valamint alkalmas univerzális reagens lehet kompetitív assaykben.

A reverzibilis antigénkötőhely blokkolásra való igény jól látható abból is, hogy ma már több kutatócsoport dolgozik mesterségesen létrehozott blokkoló molekulák megvalósításán. Jassen és társai egy bivalens peptid-dsDNS konjugátumot hoztak létre, amely az Y alakú IgG molekulák két antigénkötő ágát képes összekötni (16. ábra). A megfelelő hosszúságú DNS linker két terminálisára egy-egy peptid kerül rögzítésre, az így létrehozott konjugátum elreagál az antitesttel, ennek során egy stabil, inaktív gyűrű alakul ki. Végül megfelelő reagenssel (*MMP-2*, *mátrix metalloproteináz-2*) a peptidek lehasíthatóak a DNS linkerről, az ezáltal létrejött monovalens peptidek pedig már nem gátolják meg az antigént kötését. (16. ábra) [45]



16. *Ábra*- Bivalens peptid-dsDNS konjugátum reverzibilis antigénkötés gátlása. [45]

3. Felhasznált anyagok és alkalmazott módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek:

- **Szenzor chip aktiválásához használt reagens:**
 - AnteoBind Biosensor (Mix and Go Biosensor) (*AnteoTech*)
- **Blokkoláshoz felhasznált reagens:**
 - BSA (bovine serum albumin, liofilizált, *Sigma-Aldrich*)
 - Hemoglobin (liofilizált, *Sigma-Aldrich*)
 - Etanol-amin (*Sigma-Aldrich*)
 - MES (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid) puffer (25 mM, pH = 6,0) (*Sigma-Aldrich*)
 - PBS puffer (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH = 7,4) (*Sigma-Aldrich*)
- **Mosó puffer a chipek módosításához:**
 - PBST (10 mM PBS + 0,05 % TWEEN® 20) (*Sigma-Aldrich*)
- **Kalibráló oldat:**
 - Szacharóz (3 mg / ml) (*Sigma-Aldrich*)
- **Regeneráló oldat:**
 - 5 mM H₃PO₄ (*Sigma-Aldrich*)
 - 100 mM NaOH (*Sigma-Aldrich*)
- **Az SPRi mérések során használt pufferek alkotói:**
 - HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (*Sigma-Aldrich*)
 - TRIS (tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) (*Sigma-Aldrich*)
 - MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid) (*Sigma-Aldrich*)
 - Szervetlen sók: NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄ (*Sigma-Aldrich*)
 - Felületaktív anyagok: Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*), TWEEN®20 (*Sigma-Aldrich*)
- **A vizsgált fehérjék:**
 - Protein M (MG281) (50 % glicerin tartalmú törzsolat, *MyBioSource*)
 - Sztreptavidin (*Sigma-Aldrich*)

- Vizsgált antitest-antigén kölcsönhatások

Antitestek	Antigének
Anti-SARS-CoV-2 (<i>Abnova</i>)	SARS-CoV-2 VLP ¹ (<i>Abnova</i>)
	SARS-CoV-2 Spike protein (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)
Anti IgE (<i>Abcam</i>)	IgE (<i>HyTest</i>)
Anti-CRP (C2, C6, 135) (<i>HyTest</i>)	CRP (<i>HyTest</i>)
Anti-cTnI (560cc, 4C2, 19C7) (<i>HyTest</i>)	cTnI (<i>HyTest</i>)
Anti-NT-proBNP (NT34, 29D12, 15C4) (<i>HyTest</i>)	NT-proBNP (<i>HyTest</i>)

1. **Táblázat-** Felhasznált antitestek és antigének.

¹ VLP-t (virus like particles) alkotó fehérjék: Spike Protein, Membrane Protein, Nucleocapsid Protein, Envelope Protein.

A fehérjék biotinilálásához DSB-X™ Biotin Protein Labeling Kit-et (*Thermo Fisher Scientific*) használtam.

Az oldatokat 18,2 MΩcm fajlagos ellenállású ioncserélt vízzel készítettem el (*Millipore, Synergy UV-Ultrapore Water System*).

3.2. SPRI chipek készítésének menete

Méréseimhez két különböző fajtájú chipet alkalmaztam: az egyik módosítatlan aranybevonattal rendelkezett (*Horiba bare gold SPRI biochip*), ennek a felületét *Mix and Go Biosensor (AnteoBind Biosensor)* oldattal aktiváltam; a másik chip (*Horiba CS-HD SPRI biochip*) a gyártó által létrehozott aktivált EDC/NHS felülettel rendelkezett.

A *Horiba Bare Gold biochipeket* a felhasználás előtt 30 percre UV generálta ózon atmoszféra alá helyeztem, a felület tisztítása céljából (*Novascan Technologies, Ames, IA, USA*). A tisztítást követően *Mix & Go* oldattal aktiváltam az aranyfelületet 60 percen keresztül szobahőmérsékleten, folyamatos rázatás mellett. Az aktivált chipet 10 ml PBST (PBS + 0,05 % TWEEN) oldattal és desztillált vízzel mostam, majd N₂ gázáramban szárítottam. Az gyártó által aktivált felületű chip esetében az előkészítő lépéseket nem kellett elvégezniem.

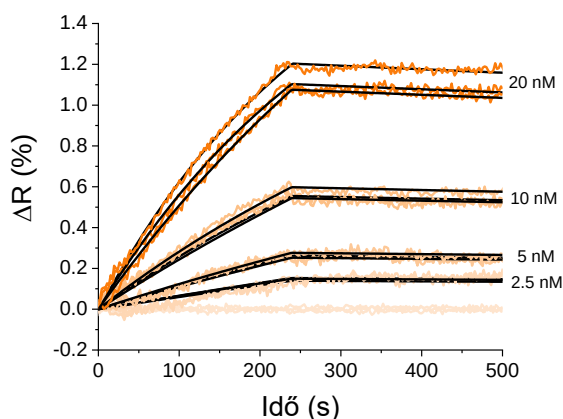
A vizsgálandó antitestek immobilizálást mikrocseppentő robot (*BioRad Calligrapher Microarrayer, BioRad, Hercules, CA, USA*) segítségével végeztem el. A fehérjék oldatát mikrocsonnás

cseppentőtű (*Arrayit SMP15*) vitte fel a chip felületére. Egy koncentrációból 4 párhuzamos pontot cseppent a program, egy csepp kb. 250 nl mennyiségű, ezáltal körülbelül 500 μm átmérőjű érzékelési zónák hozhatóak létre az SPRi chip felületén. A különböző oldatok közt a tűt háromszor átmossa és szárítja a rendszer a keresztszennyeződések elkerülése végett. A kész chipet egy éjszakán át inkubáltam, 12 °C-on, 65 %-os páratartalom mellett. Az inkubálást követően 10 ml PBST oldattal, majd desztillált vízzel mostam a chip felületét. Elvégeztem a módosíthatatlan felületek blokkolását, 1 órán keresztül, állandó rázatás mellett. Blokkolóoldatként 5 mg/ml BSA, 2 mg/ml hemoglobin oldatot és 10 mM etanol-amint használtam fel, a chip aktiválásától és a cseppentett fehérjék izoelektromos pontjától függően. A blokkolt chipet 10 ml PBST oldattal és desztillált vízzel mostam. A kész chipet nitrogénnel szárítottam és 4 °C-on, nitrogén atmoszférában tároltam a mérések elvégzéséig.

3.3. SPRi mérések

A képképző felületi plazmon rezonanciás méréseket SPRi-XelPlex és SPRi Plex II (*Horiba France SAS, Franciaország*) készülékekkel végeztem. A chipet az SPRi-be helyezés előtt lemostam, a prizma oldalát alkoholos kendővel letöröltem. A méréseket 25,00 °C-on és 50 $\mu\text{l}/\text{perc}$ áramlóoldat sebesség mellett végeztem. Első lépésként fel kell venni a plazmongörbét, melynek segítségével beállíthatóak azon mérési szögek, ahol a molekuláris kölcsönhatások a legnagyobb érzékenységgel vizsgálhatóak. A rendszert minden méréssorozat előtt kalibráltam 3 mg/ml koncentrációjú cukor oldattal, hogy a teljes chip felületén ugyanaz a törésmutató érzékenység legyen biztosított. A chip felületének regenerálását 5 mM foszforsav oldattal végeztem, amely biztosítja az alapvonal regenerációt, valamint elkerülhető az antitestek denaturációja.

Az SPRi technika segítségével a kinetikai állandók meghatározására is van lehetőség. Az ilyen típusú eljárások során az immobilizált antitestekre az antigéneket többféle koncentrációban injektáltam. A mérési eredményeket ScrubberGen 2.0 program segítségével értékeltem ki, globális illesztés módszerét alkalmazva. A program segítségével a mért kinetikai görbékre (17. ábra sárgával jelölt része) szimulált (fekete) görbékkel illesztettem, illetve meghatároztam az asszociációs és disszociációs állandók (k_a , k_d), valamint az egyensúlyi disszociációs állandó (K_D) értékét.



17. Ábra- Kinetikai állandók meghatározása során felvett mért (narancssárga) és szimulált (fekete) kinetikai görbék.

3.4. Protein M tisztítása Zeba Spin sóalanító oszloppal

A Protein M oldat magas glicerin tartalma miatt a kinetikai paraméterek meghatározása nem lehetséges, így egy méretkizáráson alapuló eljárással, sóalanító oszlop segítségével el kell távolítani a glicerint az oldatból az injektálás előtt. Ez 500 µl-es Zeba Spin kolonnával végezhető el.

Első lépésként a kolonnák kondicionálását kell végrehajtani, a Protein M későbbi hígítása során használt pufferrel. A kolonna alján lévő záródugó eltávolítása után a kolonnában lévő oldatot lecentrifugáltam (1000 g, 1 perc). Majd 50 µl oldatot mértem a töltet tetejére és 1 percig szintén 1000 g-n centrifugáltam. Ezt a lépést háromszor ismételtam. A kisebb fehérjevesztés, valamint a törzsoldat hígulásának elkerülése érdekében, a harmadik lépésben a centrifugálást két percig végeztem. Ezután 12 µl, 80 µg/ml töménységű Protein M oldatot mértem a kolonnatöltet tetejére. Miután az oldat adszorbeálódott, további 3 µl-t mértem az oszlopra a pufferoldatból. A tisztítandó oldat centrifugálását 2 percig végeztem. Az így kapott oldat (≈16-17 µl) megfelelő mértékben megtisztult a glicerintől, ahhoz, hogy SPRI-vel meghatározhatóak legyenek a kinetikai paraméterek.

3.5. Részecskeméret meghatározása NTA-val

Az NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) méréseket NanoSight LM10 Nanoparticle Analysis System készülékkel végeztem. A méréshez felhasznált puffert előzetesen leszűrtem 100 nm-es szűrőn (Millipore). A vizsgálni kívánt részecskék oldatát (VLP (virus-like particles) 1000 - szeresre hígítottam. A mérés megkezdése előtt a mérőműszert vizes és etanolos kendővel áttöröltem, az esetleges szennyezők eltávolítása végett. Az összeszerelt rendszert feltöltöttem a puffer oldattal, ellenőriztem, hogy szivárgás mentes-e a rendszer, a buborékokat eltávolítottam. Pozicionáltam a cellát, meghatároztam a megfelelő fókusz és elvégeztem a fényerő beállítását. Tíz-tíz 30 másodperces felvételt készítettem a puffer és a

részecskéket tartalmazó oldatokról, minden esetben feljegyeztem a mérés hőmérsékletét. A műszer beépített programja segítségével elvégeztem a részecskeméret meghatározást.

3.6. Antigének és Protein M biotinilálása méretnövelés céljából

Méretnövelési céllal különböző fehérjéket (BSA, NT-proBNP, cTnI, Protein M) biotiniláltam, majd a biotinilált terméket sztreptavidinnel reagáltattam, így növelve a vizsgált fehérjék méretét, anélkül, hogy funkciójukat megváltoztattam volna.

A biotinilálást DSB-X™ Biotin Protein Labeling Kittel végeztem. A kit alapvetően antitestek biotinilálásához készült, azonban az általunk módosítani kívánt fehérjék molekulatömege jelentősen kisebb az antitestek tömegénél. Ennek megfelelően optimálva a rendszert minden reagensből kevesebbet használtam, mint a kit leírásában megadott mennyiség, ugyanis a nagymértékű biotinilálás a fehérjék funkcióvesztéséhez vezethet. Első lépésben 1 M-os nátrium-hidrogén-karbonát oldatot (pH = 8,3 - 8,5) készítettem, majd 50 µl 200 µg/ml koncentrációjú biotinilálandó fehérjeoldatot mértem a reakciócsőbe és hozzáadtam még 5 µl NaHCO₃ oldatot.

A biotint tartalmazó csőbe 40 µl DMSO oldatot mértem, feloldottam és homogenizáltam. Az oldatból 1 µl-t kivettem és 1 µl DMSO oldattal a kétszeresére hígítottam. Ebből a hígított oldatból 1 µl-t mértem a reakciócsőbe ráztatás közben. A bemérés után a reakciócső tartalmát alaposan homogenizáltam és 1,5 órát ráztattam 500 rpm sebességgel.

Ezalatt az inkubálási idő alatt előkészítettem a tisztító gyantát tartalmazó kolonnát. A spin kolonna végét eltávolítottam, a töltettartó korongokat a cső aljába helyeztem. A kolonnába bemértem az előzetesen homogenizált gyantából 1 ml-t és megvártam, amíg leülepszik. Majd pipetta segítségével további gyantát adagoltam a csőbe, amíg a gyanta szintje el nem érte a 1,5 ml-nél lévő jelölést. Ezután rázással és nyomás alkalmazásával eltávolítottam a gyanta tartósító oldatát. A kolonnát egy megfelelő méretű gyűjtőcsőbe helyeztem és 5 percig 1100 g-n centrifugáltam, hogy eltávolítsam a gyantán lévő maradék oldatot.

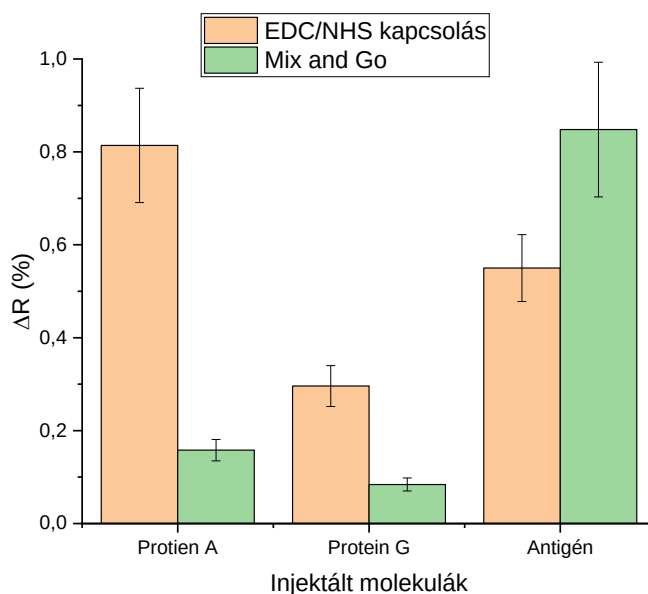
Miután lejárt az inkubálási idő a spin kolonnában lévő gyanta tetejére mértem a reakcióoldatot, és megvártam, amíg a gyanta abszorbeálja azt. A kolonnát egy tiszta gyűjtőcsőbe helyeztem és újból 5 percig 1100 g-n centrifugáltam. A centrifugálás végén kapott oldatot további hígítás után felhasználtam az SPRi mérésekhez.

4. Eredmények

4.1. Koordinációs kölcsönhatással végzett immobilizálás megfelelőségének ellenőrzése

Az antitestek felületi sűrűsége és orientációja nagyban befolyásolja az antigénkötő képességet, és ebből adódóan a szenzor érzékenysége is hatással van. Munkám során egy krómtartalmú, kelátképző reagenst (Mix and Go) használtam fel az antitestek immobilizálására. A reagens gyártója szerint a Mix and Go az antitestek Fc régiójával hoz létre komplexet, ennek megfelelően „end-on” antitest orientáció (6. ábra) érhető el a felületen.

A fenti állítás ellenőrzésére CRP antitesteket immobilizáltam kétféle eljárással: a) EDC/NHS kapcsolással és b) Mix and Go reagenssel. Vizsgáltam, hogy a létrehozott antitestfelületek milyen mértékben képesek az antigén, illetve az antitestkötő fehérjék, Protein A és Protein G megkötésére. A Protein A és Protein G az antitest Fc régiójához képesek kötődni, így, ha az immobilizált antitestek „end-on” orientációban helyezkednek el a felületen az antitestkötő fehérjék csak kismértékben fognak tudni kötődni az immobilizált antitestekhez szterikus gátlás miatt. Azonban, ha az immobilizálás során az antitestek véletlenszerű orientációban helyezkednek el, akkor mind a Protein A, mind a Protein G nagyobb mértékű kötődést mutat.



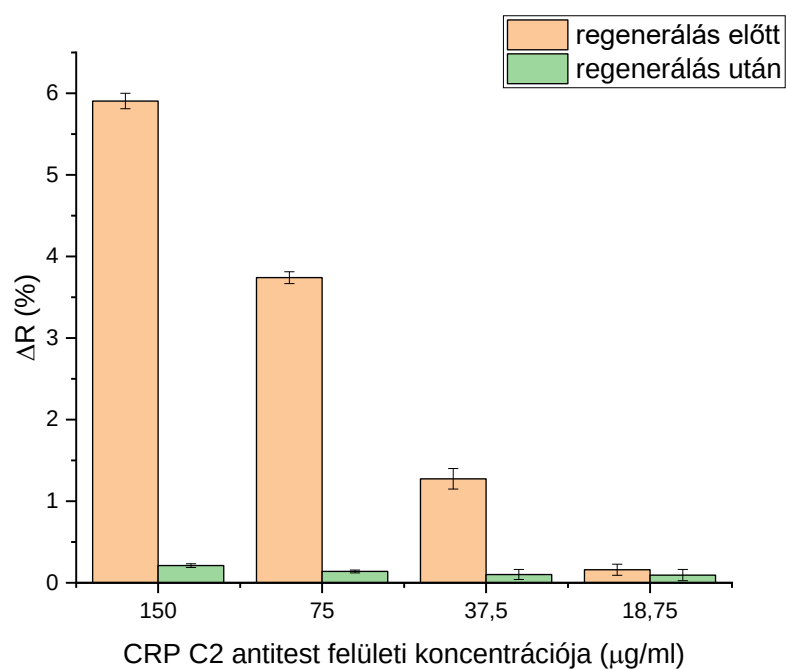
18. Ábra- EDC/NHS és Mix and Go aktivált szenzor chip felületére immobilizált CRP 135 antitesteken (150 µg/ml cseppentési koncentráció) mért jelváltozás Protein A, Protein G (2,5 µg/ml) és a vizsgált CRP antigén (2,5 µg/ml) hatására.

Az antitestkötő fehérjék mérése során azt tapasztaltam, hogy azonos körülmények közt az EDC/NHS aktivált chip minden esetben nagyobb jelet adott a Mix and Go aktivált chipnél (18. ábra). Ez

bizonyíthatja azt, hogy a Mix and Go az antitest Fc régiójával alkot komplexet, tehát „end-on” orientációban helyezkedik el az antitest, így blokkolva az antitestkötő fehérjék megkötését. A feltételezést alátámasztja az antigénnel elvégzett mérés, hiszen ez esetben a Mix and Go-val létrehozott felület volt képes több antigén megkötésére.

4.2. Optimális regenerálási módszer kidolgozása

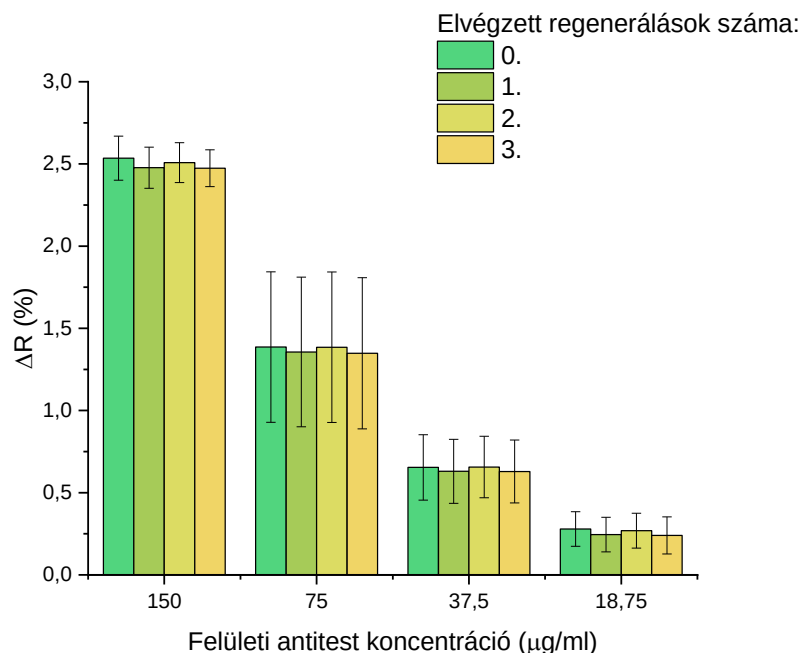
A szenzor chipék többszöri felhasználásának érdekében szükséges a létrehozott kötések megbontása és a felület visszaállítása az injektálás előtti állapotba. A megfelelő regenerálószer kiválasztásánál fontos szempont, hogy elég erős regeneráló képessége legyen, azaz képes legyen a felületi kötések megbontására, emellett viszont ne denaturálja a felületre immobilizált antitesteket. Az antitestkötő fehérjék esetében a 100 mM NaOH oldat kezdetben megfelelőnek bizonyult a regenerálásra, hiszen a regenerálási lépés végére a kinetikai görbe visszatért az alapvonalra, a kötések sikertelenül megbontanunk. Azonban egymást követő mérési és regenerálási lépések során azt tapasztaltam, hogy az immobilizált antitestek antigén kötő képessége gyors csökkenést mutat. (19. ábra)



19. Ábra- 100 mM NaOH regeneráló oldat hatása az antigénkötésre (2 μg/ml injektált CRP koncentráció).

A nátrium-hidroxid, alacsonyabb koncentráció mellett is, valószínűleg denaturálta az antitesteket, ezért egy gyengébb regenerálószer, az 5 mM foszforsav oldatot alkalmaztam a későbbiekben. A foszforsav alkalmazhatóságának vizsgálatához különböző koncentrációkat beállítva konszekutív CRP kötődés-

regenerálás ciklusokból álló injektálásokat végeztem. A 20. ábrán megfigyelhető, hogy a foszforsavval végzett regenerálási körülmények mellett nincs szignifikáns különbség a felületi antitestek kötési képességében, akár három regenerálási lépést követően sem, így ez a módszer kiválóan alkalmazható a későbbiekben.



20. Ábra- Az immobilizált CRP C2 antitestek antigén kötő képessége négy egymást követő kötődési (2 μg/ml CRP) és regenerálási lépés után.

4.3. Protein M affinitása különböző alosztályú antitestek esetében

A Protein M vizsgálata során első lépésben a fehérje affinitását vizsgáltam különböző alosztályú antitestek esetében (2. táblázat), a választott antitestek CRP-re, NT-proBNP-re és cTnI-re specifikusak. Mindhárom antigén esetén IgG1, IgG2a és IgG2b alosztályba tartozó antitestet is választottam a vizsgálatok elvégzésére.

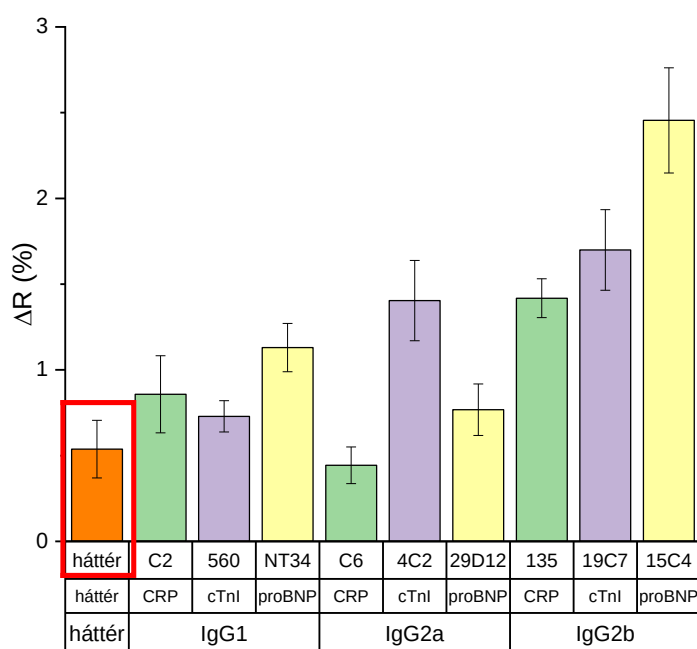
	CRP	NT-proBNP	cTnI
IgG1	C2	NT34	560cc
IgG2a	C6	29D12	4C2
IgG2b	135	15C4	19C7

2. táblázat- Különböző antigénekre (CRP, NT-proBNP, cTnI) szelektív antitestek különböző antitest alosztályokba sorolása.

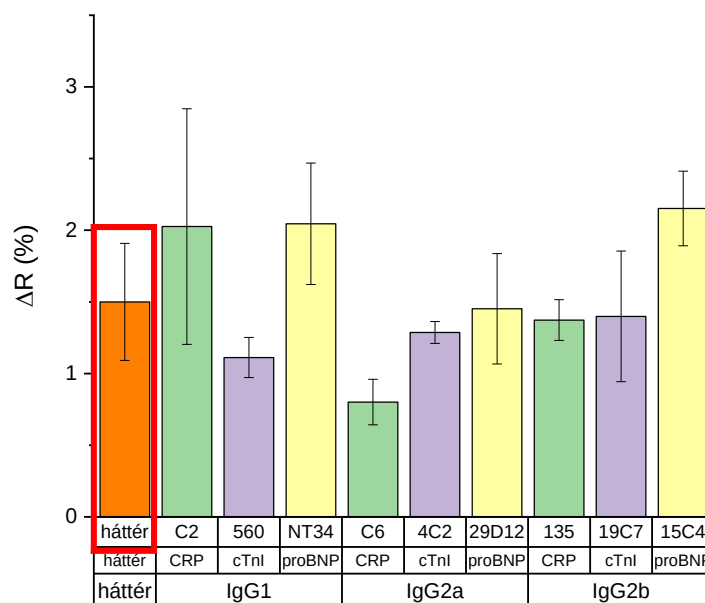
Három különböző pH-n vizsgáltam a Protein M kötődését, azzal a céllal, hogy megtaláljam a legalkalmasabb mérési paramétereket. Az alkalmazott pufferek a következők voltak:

- 10 mM TRIS, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, **pH 7,4**;
- 10 mM TRIS, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, **pH 8,0**;
- 10 mM MOPS, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, **pH 6,5**.

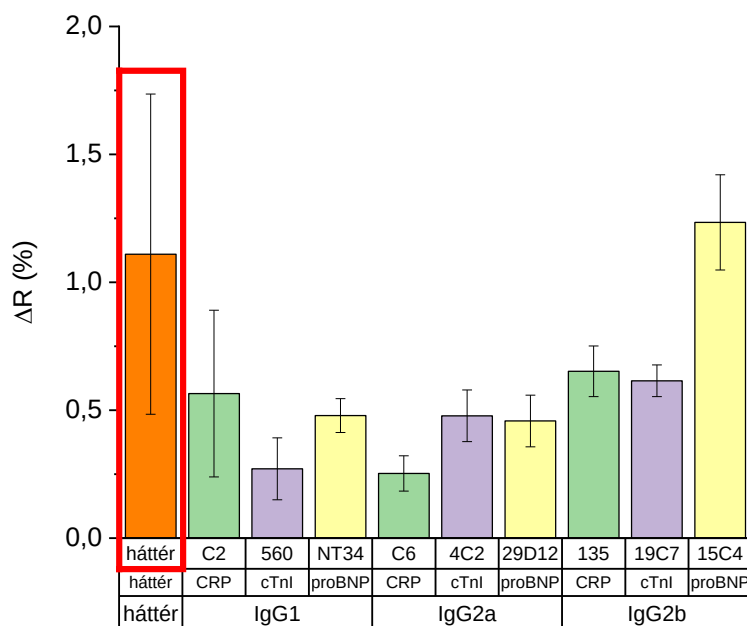
A három pH közül a pH = 7,4 - es környezet volt a legkedvezőbb a Protein M kötődésének, mivel ekkor kaptam a legnagyobb specifikus jelet az antitesteken, miközben a háttéren történő nem specifikus kötődés optimális maradt. A 21. ábrán megfigyelhető, hogy a Protein M affinitása az IgG2b alosztályú antitestekhez a legnagyobb. A lúgos pH-jú oldatban (22. ábra) minden folton magas kötődést tapasztaltam, beleértve a háttér is. Savas közegben (23. ábra) a háttérkötődés jelentősen meghaladta a foltokon mért kötődést. A magas háttérkötődés magyarázatához meghatároztam a Protein M izoelektromos állandójának (pI) értékét, az online is elérhető, nyílt forráskódú ExPASy program segítségével (https://web.expasy.org/compute_pi/). A számított pI érték 6,59. Mivel az alkalmazott savas közeg ennél alacsonyabb pH-jú, a fehérje pozitív töltést vesz fel, míg a háttér blokkolására használt BSA (pI = 5,3) negatív töltésű. A két fehérje közt fellépő erős elektrosztatikus vonzás magyarázatot ad a magas háttérkötődésre.



21. Ábra- A Protein M fehérje affinitása különböző alosztályú antitestek (300 µg/ml antitest cseppentési koncentráció) esetén (alkalmazott puffer: 10 mM TRIS, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, **pH 7,4**).



22. *Ábra*- A Protein M fehérje affinitása különböző alosztályú antitestek (300 µg/ml antitest cseppentési koncentráció) esetén (alkalmazott puffer: 10 mM TRIS, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, **pH 8,0**).

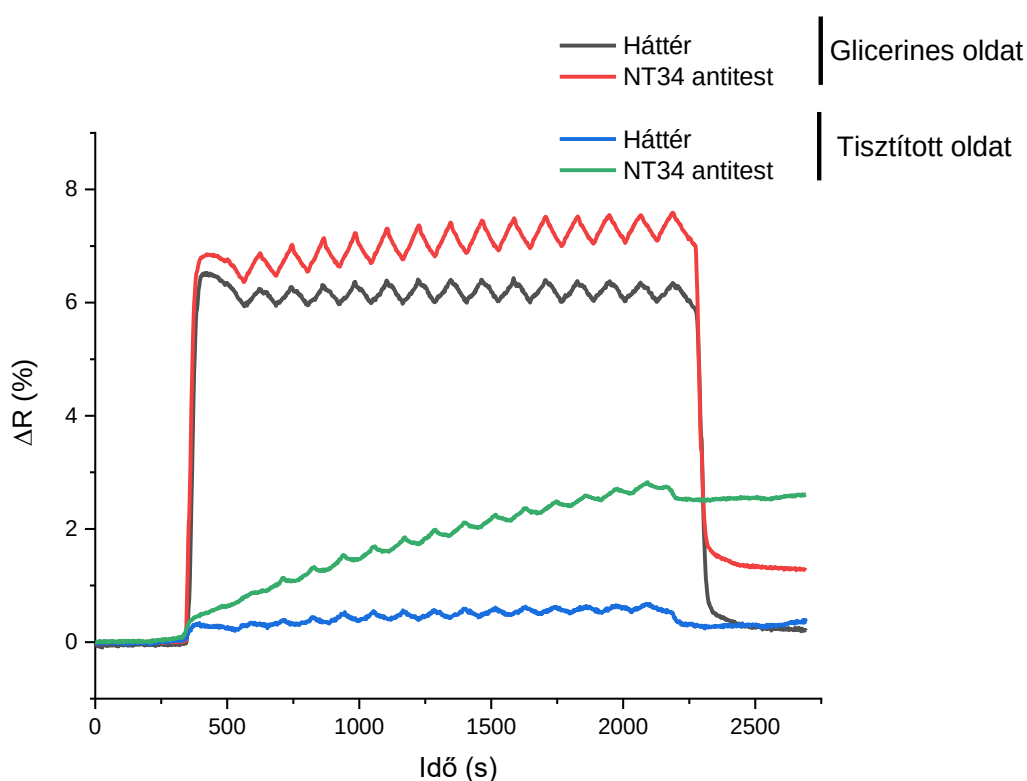


23. *Ábra*- A Protein M fehérje affinitása különböző alosztályú antitestek (300 µg/ml antitest cseppentési koncentráció) esetén (alkalmazott puffer: 10 mM MOPS, 138 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, **pH 6,5**).

4.4. Protein M tisztítása Zeba Spin segítségével

Az előbb említett mérések során tapasztaltam a kinetikai görbe asszociációs szakasza során egy magas, jellegzetes emelkedését (24. ábra, fekete-piros). Mivel a magas törésmutató változás mellett a kinetikai paraméterek nem, vagy nehezebben kiértékelhetők, ezért az asszociációs szakasz nem specifikus megemelkedését igyekeztem amennyire csak lehet visszaszorítani.

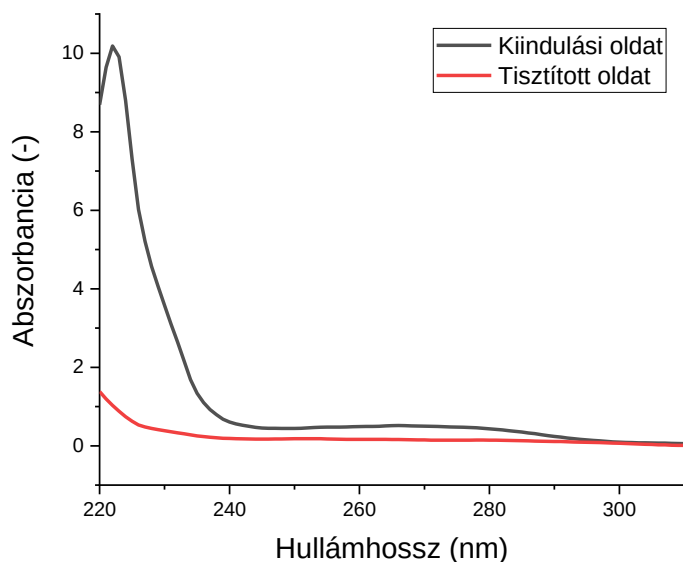
A jelenség oka, hogy a Protein M törzsoldat 50 % koncentrációban tartalmaz glicerint. A glicerintörésmutatója jelentősen eltér az áramló oldatként használt puffer törésmutatójától, és több, mint háromezeres hígítás esetén is jelentős jelnövekményt ad. Mivel az SPRi-ben a felületközeli törésmutató változását követjük, a glicerintörésmutatója jelentősen zavarja a kinetikai méréseket, ennek kiküszöbölésére kerestünk olyan technikát, amelynek segítségével kis fehérjevesztés mellett távolítható el a glicerintörzsoldatból.



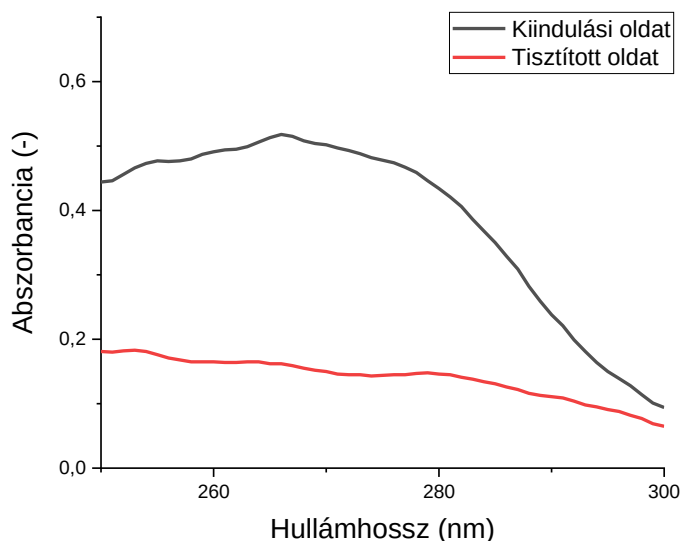
24. Ábra- Protein M injektálása során felvett kinetikai görbék, (300 µg/ml antitest cseppentési koncentráció mellett). A glicerines oldat hatására kapott görbe (piros, fekete) jellegzetes törésmutató emelkedést mutat, amely jelentősen eltér a tiszta oldattal kapható értéktől (kék, zöld).

A probléma visszaszorítása Zeba Spin kolonna segítségével sikerült. Ez egy sóalanító oszlop, amely alkalmas az 1000 Da-nál kisebb molekulák eltávolítására. A tisztítás hatékonyságáról UV-látható spektroszkópia segítségével győződtem meg. Az eredmények a 25. ábrán láthatóak, a glicerinnak a ~220 nm-es hullámhosszon detektálható abszorpciós csúcs tulajdonítható. A 25. ábra alapján elmondható, hogy

a glicerín mennyisége az oldatban a Zeba Spin sóalanító oszlop hatására jelentősen lecsökkent. A tisztítás sikerességét az SPRi mérések is alátámasztották (24. ábra, kék-zöld). Azonban a sóalanítás során a fehérjevesztés is viszonylag magas volt (26. ábra).



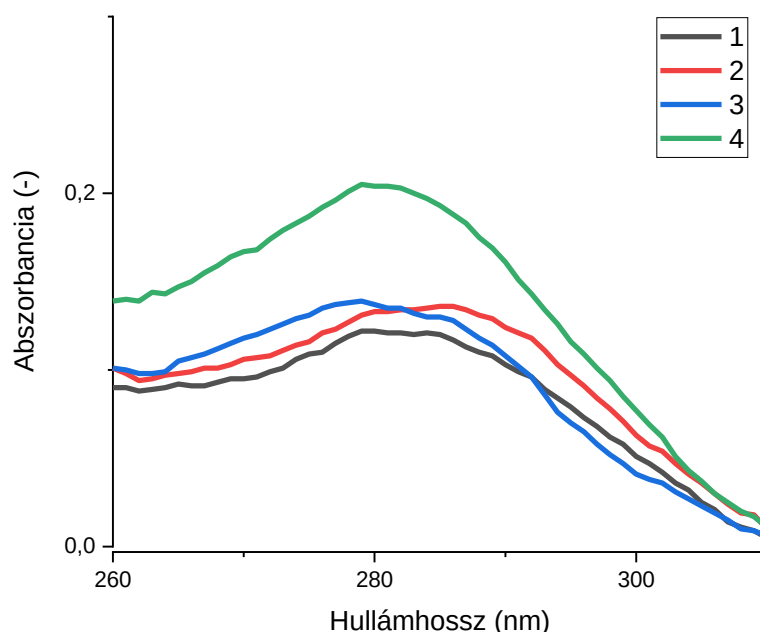
25. Ábra- Protein M oldat abszorpciós spektruma a glicerínmentesítési lépés előtt és után.



26. Ábra- A glicerínmentesítés hatására bekövetkezett fehérjevesztés kezdetben több, mint 50 % volt. (A fehérjék abszorbanciája 280 nm-nél látható.)

A fehérjevesztés a kiindulási oldat töménységével, a centrifugálás idejével és sebességével befolyásolható. Valós fehérjevesztés csökkenést a kondicionálási szakasz centrifugálási idejének

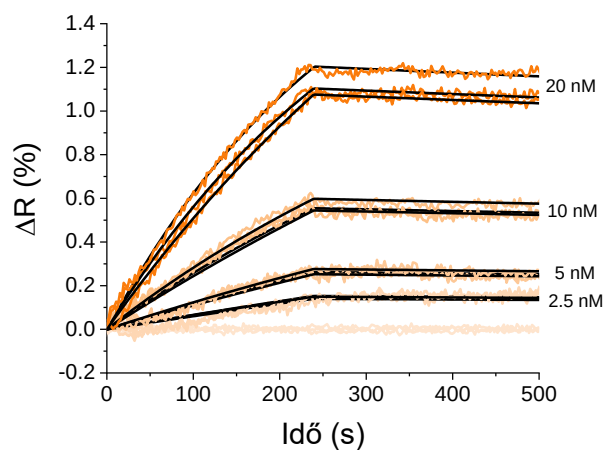
növelésével sikerült elérni, mivel ennek következtében a tisztított fehérjeoldat térfogata nem növekedett meg nagy mértékben, azaz kisebb mértékű hígulás volt elérhető. A kiindulási oldat töménységének növelése is javított a veszteség mértékén, de ekkor a glicerínmentesítés hatásfoka kisebb volt. (27. ábra) A Protein M árát is figyelembevéve továbbra is 80 µg/ml töménységű kiindulási oldatokkal dolgoztunk.



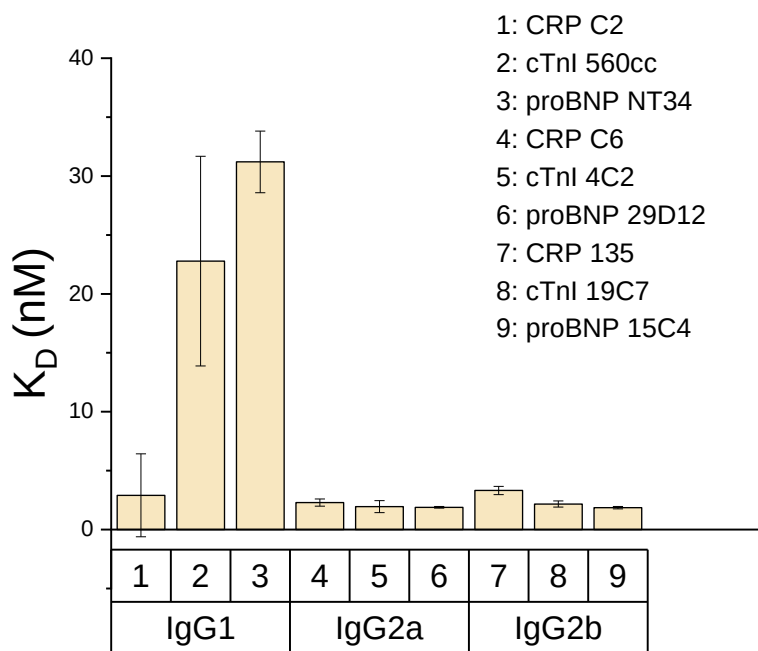
27. Ábra- A centrifugálási idő és a kiindulási oldat töménységének hatása a fehérjevesztésre: Az 1. esetben a leírásban megadott centrifugálási időt (1 perc) és 80 µg/ml töménységű fehérje oldatot használtam (alapbeállítás). Ehhez képest a 2. esetben a kondicionálás utolsó centrifugálási lépésének idejét megdupláztam, a 3. esetben kétszeres töménységű fehérje oldatot használtam. A 4. esetben mind a centrifugálási időt, mind a töménységet a kétszeresére emeltem. Látható, hogy a 4. esetben kapható a legnagyobb fehérjekoncentráció a végső oldatban.

4.5. Protein M kinetikája

A glicerínmentesített Protein M oldattal már el tudtam végezni kinetikai méréseket is. Meghatároztam különböző antitestek és antigének, valamint az antitestek és a Protein M kölcsönhatásának kinetikájára jellemző egyensúlyi disszociációs állandókat (K_D). Az egyes antitestek és a Protein M disszociációs egyensúlyiállandói az 29. ábrán láthatóak. Az ábrán feltüntettem azt is, hogy az egyes antitestek, mely alosztályhoz tartoznak. A korábbi méréseim során azt állapítottam meg a mért ΔR (%) értékekből, hogy a Protein M affinitása az IgG2b alosztályú antitestekhez a legnagyobb (21. ábra), ezt igazolja a kinetikai mérés is, hiszen az IgG2b alosztályra jellemzően kis K_D értékeket kaptam, minden vizsgált antitest esetében.



28. Ábra- A glicerínmentes oldattal felvett mért és illesztett kinetikai görbe (injektált Protein M koncentráció 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM; 300 µg/ml cseppentési koncentrációjú NT-proBNP NT34 antitest folton).

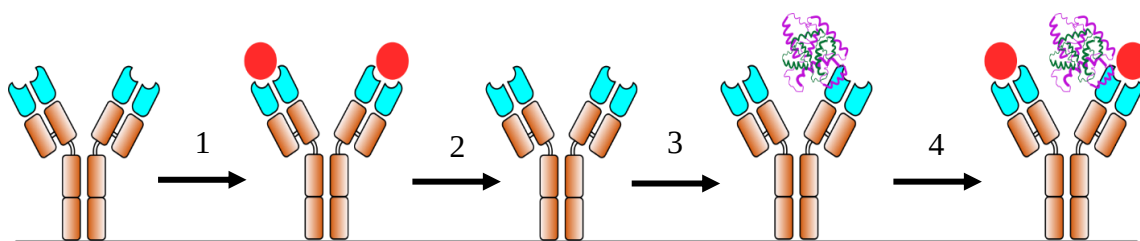


29. Ábra- A Protein M fehérjére jellemző egyensúlyi disszociációs állandók értéke (300 µg/ml antitest cseppentési koncentráció mellett).

4.6. Protein M antitest-antigén kötés blokkoló hatása CRP, NT-proBNP, cTnI antitestek esetén

Az irodalmi adatok alapján, ha a Protein M fehérje hozzákapcsolódik egy antitesthez, akkor megakadályozza az antigén megkötését. [1] A kizorítási méréseket az alábbi lépéssorozat mentén végeztem (30. ábra):

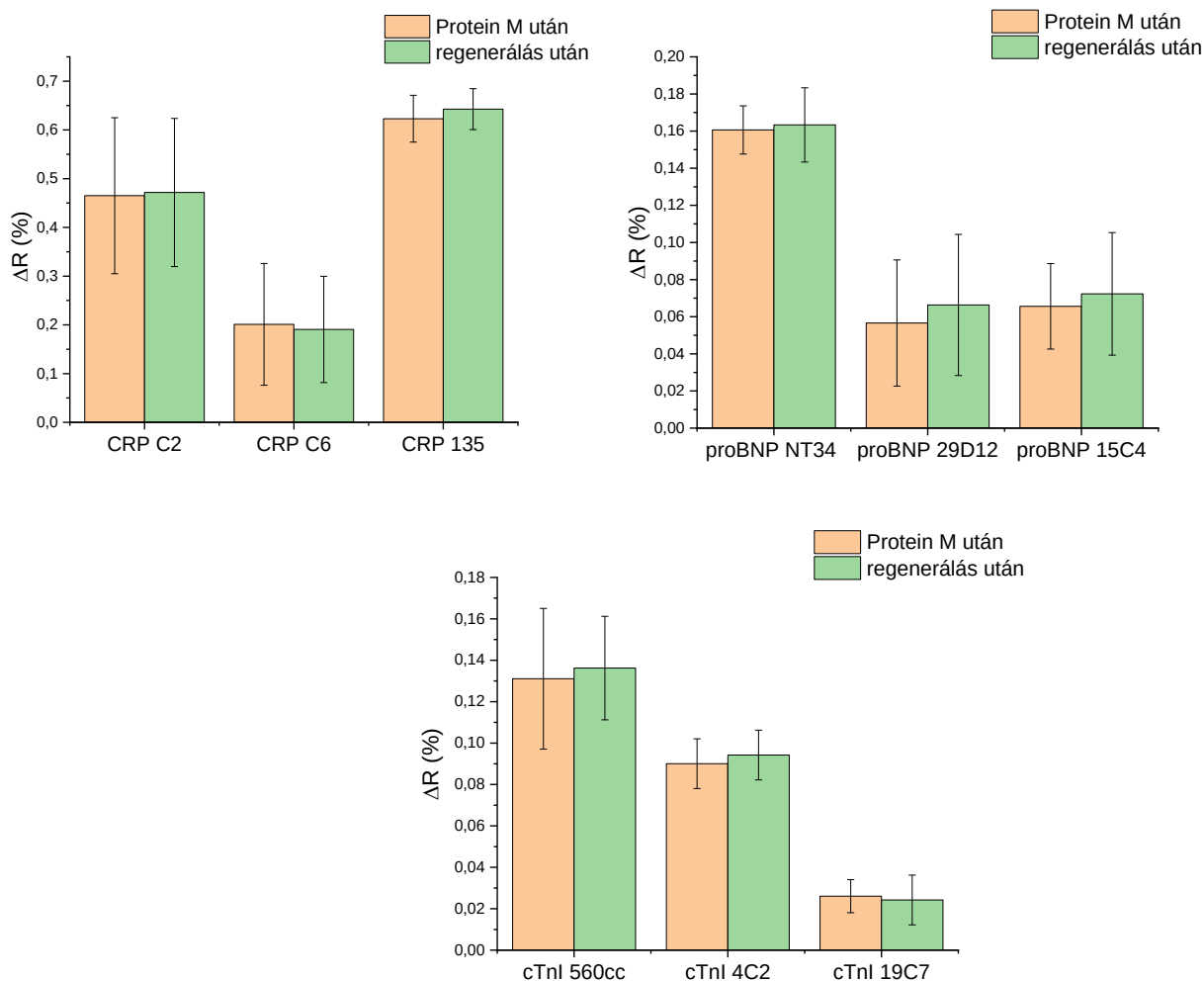
1. Első lépésként a mérendő antigéneket injektáltam, ezzel meghatározva, hogy mekkora az antitestek szabad kötőhelyeinek kapacitása.
2. A mérés után az antitesteket regeneráltam 5 mM foszforsav oldattal, amelynek során visszakaptam az eredeti felületet és a szabad kötőhelyeket.
3. A megtisztított felületre injektáltam az antigénnel megegyező tömegkoncentrációjú (2 µg/ml) Protein M oldatot. A jobb kötődés érdekében ezt az oldatot az injektálás után 30 percig recirkuláltattam a felület felett.
4. Erre a Protein M-mel telített felületre újra injektáltam az antigéneket, és meghatároztam az SPRi válaszábanak különbségét a szabad (1. lépés) és a Protein M-mel blokkolt antitestek (4. lépés) esetében.



30. Ábra- A kizorítási mérések során alkalmazott lépéssorozat.

1. antigén kötődése, 2. antitest regenerálása, 3. Protein M kötődése, 4. antigén kötődése.

Méréseim során nem találtam szignifikáns különbséget a Protein M-mel gátolt és szabadon hagyott antitestek antigénkötési képességében CRP (125 kDa), NT-proBNP (8,5 kDa) és cTnI (34,6 kDa) antigének esetén (31. ábra). A kötésgátlás bizonyítása érdekében végeztem méréseket egyszeri injektálásokkal, és felületi titrált is alkalmaztam. Az utóbbi módszer előnye, hogy biztosított az antitestek összes kötőhelyének telítése, azonban a felületi titrálással sem tapasztaltam szignifikáns kötésblokkolást az általunk választott kis méretű (<150 kDa) antigének esetén.



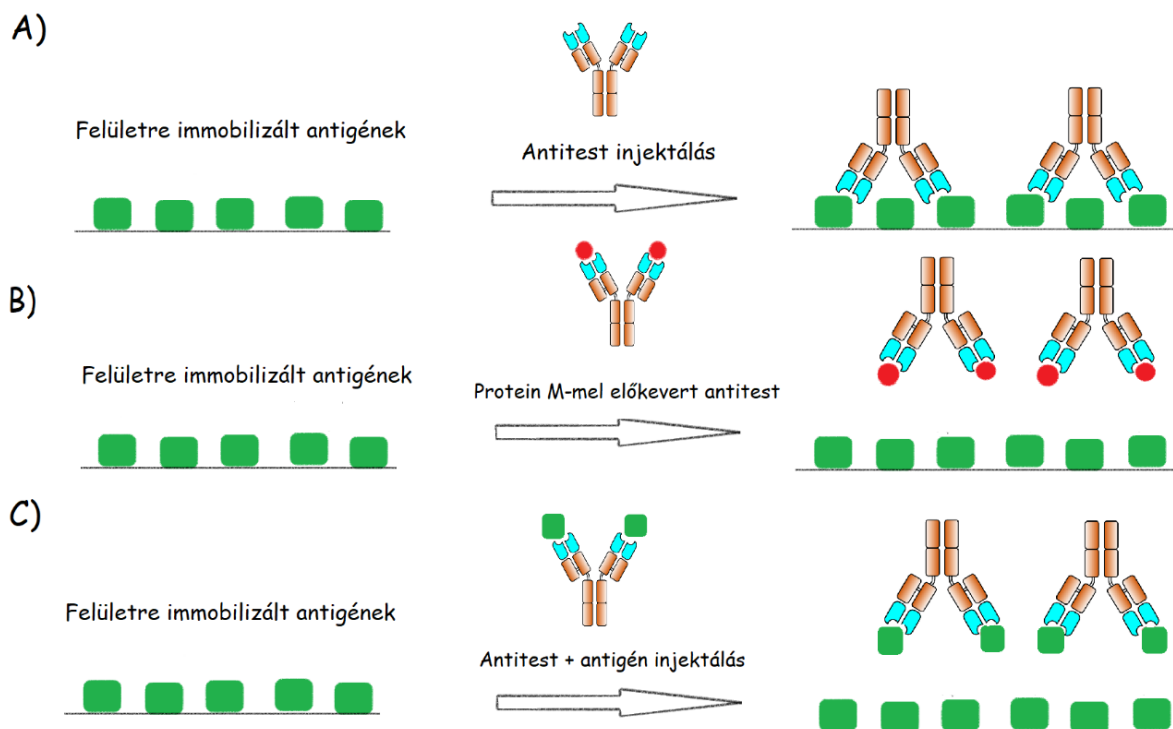
31. Ábra- Különböző antitestek (300 µg/ml cseppentési koncentráció) antigénkötési képessége a szabad antigén kötőhelyek mellett (zöld) és Protein M-mel előzetesen reagáltatott esteben (narancssárga). Az ábrán jól látható, hogy a két eset között nincs szignifikáns különbség, így a mi méréseink nem igazolják a Protein M fehérje antigénkiszorító képességét.

4.7. Kísérletek felületre immobilizált antigénekkal

Az előbb említett vizsgálatok inverz változatát is elvégeztem, amely során nem az antitestet immobilizáltam a chip felszínére, hanem az antigéneket. Erre az antigénnel borított felületre injektáltam a különböző antitesteket. Hipotézisem szerint, ha a Protein M rendelkezik antitest-antigén kötést gátló hatással, akkor ez esetben a Protein M-mel előzetesen reagáltatott antitestek nem, vagy csak kisebb mértékben tudnak a felületre immobilizált antigénekhez kötődni.

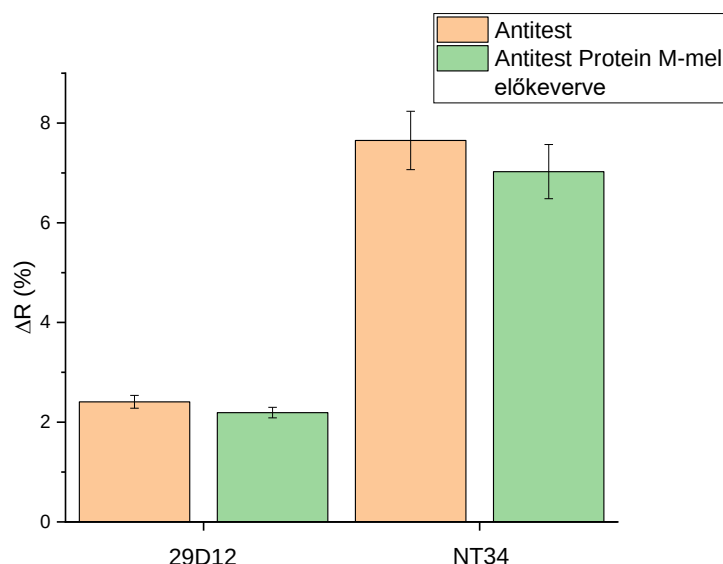
A fent említett mérések három fő egységből álltak (32. ábra): először meghatároztam a szabad antigénkötőhellyel rendelkező antitestek kötődését a felületre immobilizált antigénekhez (A); majd az antitesteket előzetesen Protein M-mel reagáltattam, így blokkolva az antitest antigénkötő régióját, és

meghatároztam a blokkolt antitestek affinitását a felületi antigénekhez (B); végül ellenőrző kísérletként az antitesteket saját antigénjeikkel kevertem össze az injektálást megelőzően, és ezeket az antigénnel blokkolt antitesteket injektáltam az SPRi-be.



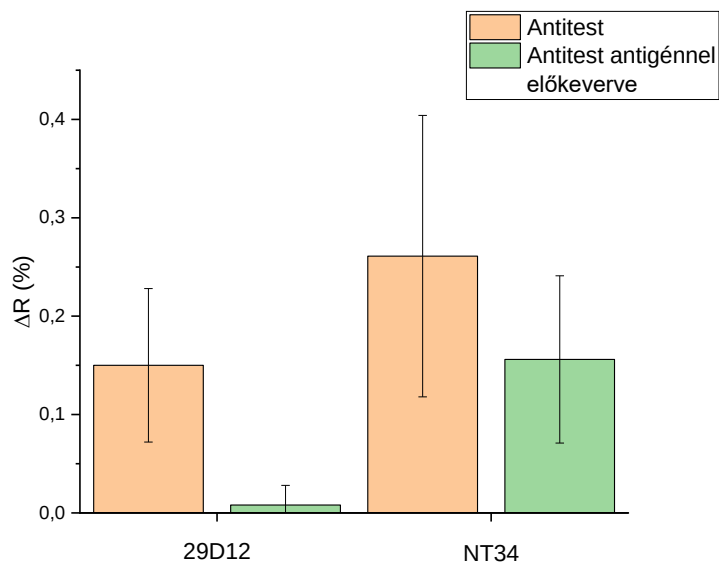
32. Ábra- A szenzor chip felületére antigéneket immobilizáltam, majd erre a felületre injektáltam az antitesteket: A) szabad antitestek injektálása; B) előzetesen Protein M-mel összekevert antitestek injektálása; C) ellenőrzőkísérlet, az injektált antitestek a saját antigénjeikkel összekeverve.

Feltevéseinknek megfelelően, ha a Protein M-nek van antitest-antigén kötést gátló hatása, akkor a B.) esetben az antitestek kötésének mértéke várhatóan lecsökken az A.) esethez képest, így az SPRi jelben is csökkenést várunk. A mérési eredmények azonban nem mutattak jelentős különbséget a szabad (A.) és a Protein M-mel előzetesen blokkolt (B.) kötőhelyek között (33. ábra), így megbizonyosodtam arról, hogy az általam választott antigének esetén (<150 kDa) nem történik meg a Protein M antitest-antigén kötésgátló hatása.



33. Ábra- Antitestek kötődése a felületre immobilizált antigénhez (NT-proBNP, 150 µg/ml antigén cseppentési koncentráció). Az A.) (narancssárga) esetben az áramló oldat csak a megfelelő antitestet tartalmazta, a B) (zöld) esetben az antigént előzetesen Protein M-mel kevertem össze.

Ellenőrző kísérletet is végeztem, ekkor a Protein M helyett az antigéneket kevertem az antitestek oldatába az injektálást megelőzően. Ezáltal már az injektálandó oldatban kialakult az antitest-antigén kölcsönhatás (32. ábra C), tehát az antitestet a saját antigénjével „blokkoltam” a felületre immobilizált antigénekkal szemben. Ebben az esetben lényeges különbséget tapasztaltam a szabad és a már kötésben lévő antitestek jelei között (34. ábra), így elmondható, hogy ha a Protein M valóban blokkoló hatást fejt ki, azt látnunk kell a fent leírt mérési elrendezésben.



34. Ábra- Antitestek kötődésének ellenőrzése. A felületre immobilizált antigénekhez (NT-proBNP, 150 µg/ml antigén cseppentési koncentráció) a szabad antitestek ((A.) eset, narancssárga) láthatólag sokkal jobban kötődtek, mint azok az antitestek, melyek előzetesen antigénnel voltak reagáltatva ((C.) eset, zöld).

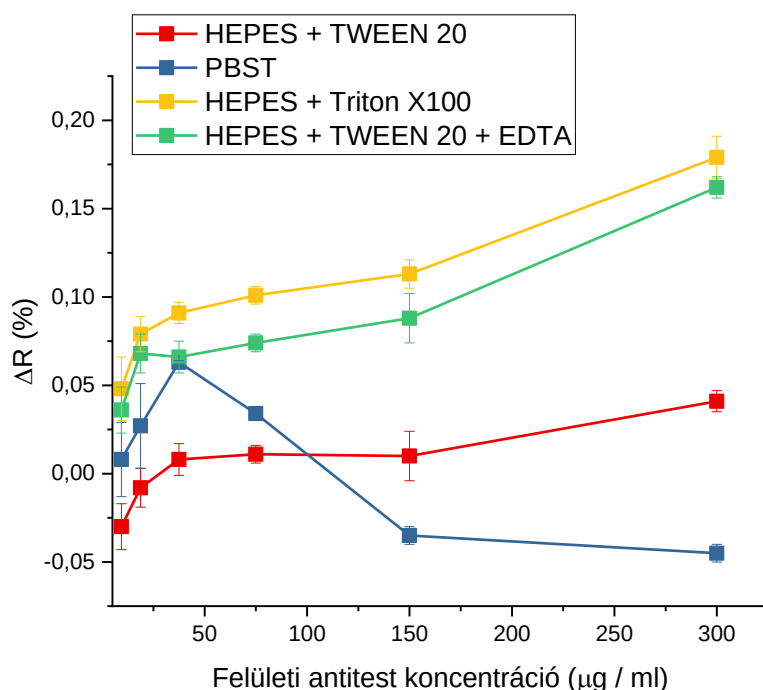
4.8. A kötésblokkoló hatás tágabb körű vizsgálata

Későbbi méréseim során bővítettem a vizsgálandó antitestek körét, már nem csak szívbetegség markerekre specifikus antitesteket, hanem allergiás (anti-IgE) és vírus specifikus (anti-SARS-CoV-2) antitesteket is felhasználtam. Az antitestek kibővített körével a vizsgált antigének mérete is jelentősen nőtt. A vírus részecske helyett a mérések során SARS-CoV-2 VLP-t (virus-like particles) és a vírus tüskefehérjéjének receptorkötő régióját (spike protein RBD) alkalmaztam. A VLP-k mérése általában valamilyen detergenst tartalmazó oldatban célszerű, ezzel megakadályozva a VLP részecskék összetapadását vagy felületi aggregációját, azonban olyan detergens típust és koncentrációt kell választanunk, amely nem okozza a vírusrészecske szétesését.

Az előkísérletek során a következő áramló oldatokat próbáltam ki a VLP kötődés optimalizálása érdekében:

- detergens mentes PBS oldat
- PBS, 0,05 % TWEEN 20
- 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % TWEEN 20, pH = 7,4
- 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % TWEEN 20, pH = 7,4
- 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton X-100, pH = 7,4

A PBS és PBST esetében nagyon magas háttérkötődést kaptam, azonban szignifikáns jelek nem voltak mérhetőek az immobilizált antitesteken (35. ábra). A TWEEN 20-at tartalmazó HEPES oldatban is csak nagyon kismértékű kötődést tapasztaltam, azonban a jel itt már kismértékű összefüggést mutatott a felületre immobilizált antitestek koncentrációjával. Az EDTA-t is tartalmazó oldatra jelentősebb koncentrációfüggést kaptam. Megpróbáltam egy újfajta detergens (Triton X-100) alkalmazását is TWEEN 20 helyett. Ebben az esetben szintén jelentős kötődést tapasztaltam, hasonló korrigált értékekkel, mint az EDTA és TWEEN 20 tartalmú oldatnál.

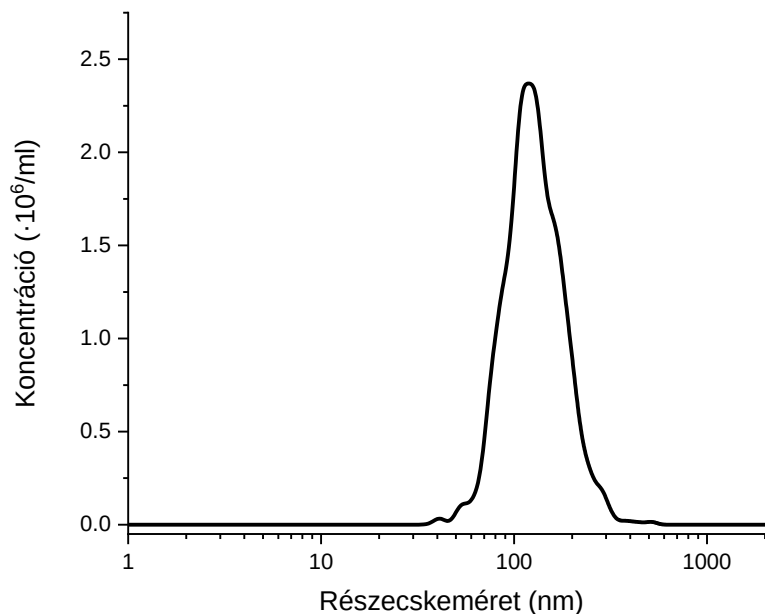


35. Ábra- VLP kötődése a felületre immobilizált NT-proBNP antitestekhez különböző puffer oldatokat felhasználva. A kötődési értékeket a folt mellett lévő háttérrel korrigáltam.

Mivel úgy találtam, hogy a VLP kötődése 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton X-100 (pH = 7,4) oldatban a legoptimálisabb, így további mérésekhez ezt a puffert alkalmaztam.

4.9. VLP részecskék vizsgálata NTA módszerrel

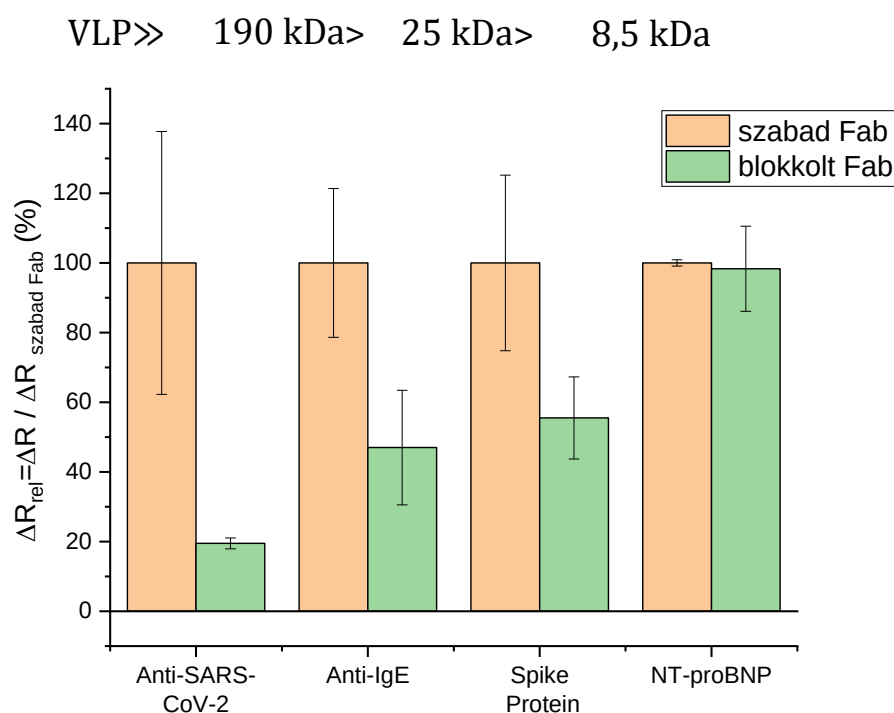
Annak bizonyítására, hogy a VLP részecskék nem esnek szét, illetve nem tapadnak össze a Triton X-100 tartalmú pufferben NTA segítségével részecskeméret meghatározást végeztem. A VLP részecskék méretéről korábban meghatározott értékkel rendelkeztem, amely kb. 100 nm volt (desztillált vízben). A kapott eredmények alapján (36. ábra) sem aggregációt, sem a részecskék szétesését nem tapasztaltam az általam választott pufferben. Így megállapítható, hogy a 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton X-100, pH=7,4 oldat alkalmas lehet a SARS-CoV-2 VLP specifikus meghatározására.



36. Ábra- Részecskeméret eloszlás (SARS-CoV-2 VLP) 0,05 % Triton X-100 tartalmú oldatban 1000-szeres hígításban.

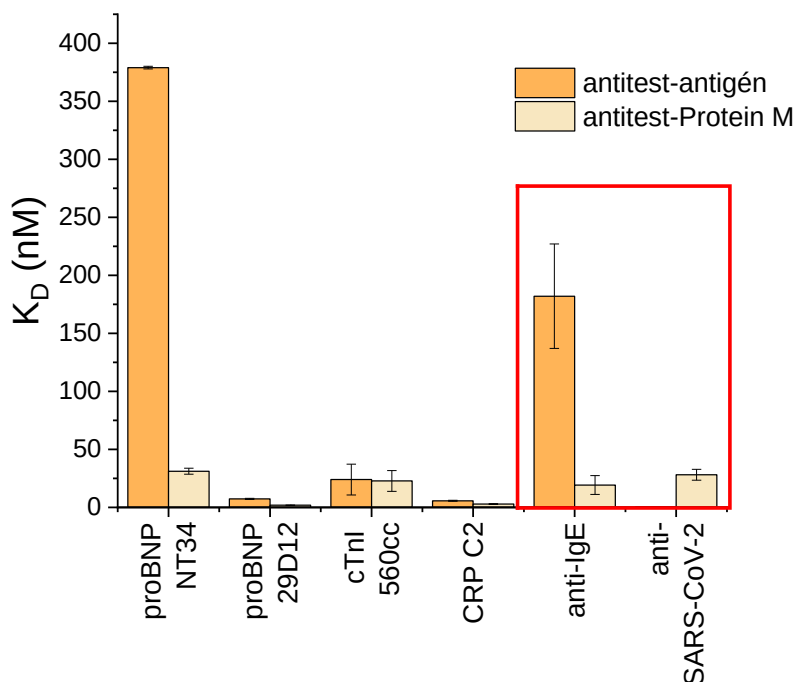
4.10. A blokkolási effektus okának vizsgálata

A 4.6. pontban leírtaknak megfelelően a kiszorítási méréseket SARS-CoV-2 VLP, spike protein és IgE antigénekkal, illetve a megfelelő antitestekkel is elvégeztem. Az eddigi méréseimtől eltérően azt tapasztaltam, hogy az anti-IgE esetében a Protein M-mel blokkolt antitestfelület az antigének felét képes megkötni, míg az anti-SARS-CoV-2 antitestek esetében a VLP molekulák vizsgálatakor csaknem teljes kiszorítást tapasztaltam. A 37. ábrán négyféle, különböző méretű antigén relatív kötődési képessége látható. A Protein M-mel még nem reagáltatott, azaz szabad Fab régiók kötési képességére vonatkoztattam minden esetben a Protein M-mel blokkolt antitestek kötési képességeit. Az ábrán jól megfigyelhető, hogy az antigén méretének növekedésével a Protein M kötésgátló hatása is folyamatosan növekszik.



37. Ábra- Az antigén méretének növekedésével a Protein M kötésgátló hatása is folyamatosan növekszik a vizsgált SARS-CoV-2 VLP, IgE, spike protein RBD és NT-proBNP esetén (300 µg/ml antitest cseppentési koncentráció).

A tapasztalt blokkolási effektusnak másik oka lehet az antitest-antigén és az antitest-Protein M reakciók eltérő kinetikai paraméterei, vagyis a kölcsönhatások erősségének különbsége. A kölcsönhatások erősségének összehasonlítása érdekében minden antitest-antigén és antitest-Protein M kölcsönhatás kinetikai állandóját meghatároztam és összehasonlítottam az összes lehetséges esetben (38.ábra).



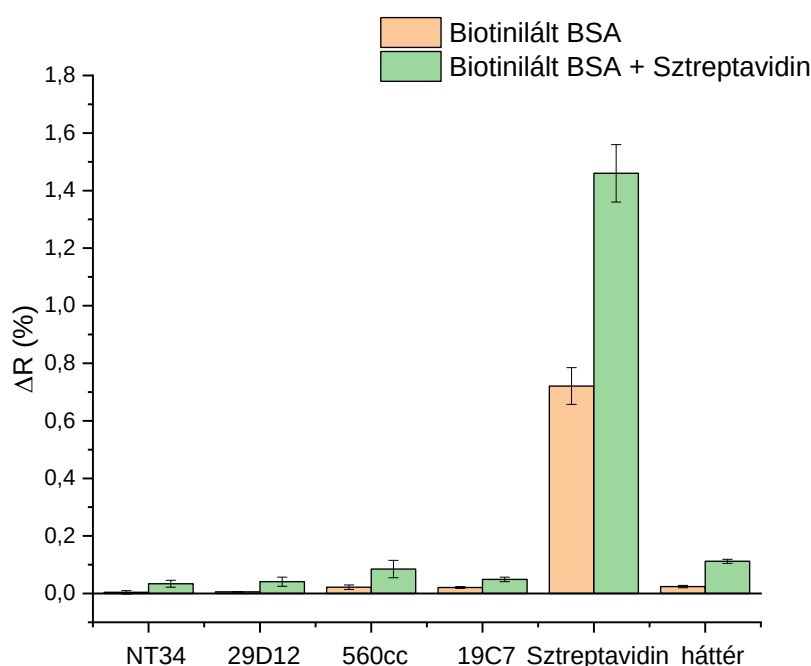
38. Ábra- Különböző antitest-antigén és antitest-Protein M kölcsönhatásokra meghatározott egyensúlyi disszociációs állandók (K_D) értéke (300 $\mu\text{g/ml}$ antitest cseppentési koncentráció). A pirossal karikázott esetekben tapasztaltam kiszorítást.

A 38. ábrán feltüntetett első négy antigén esetében nem találtam szignifikáns mértékű kiszorító hatást, az anti-IgE esetében már megjelenik a Protein M kötődésgátló hatása, a vírus specifikus antitestnél pedig már egyértelmű kiszorítás tapasztalható. A K_D érték viszonya azonban nincs korrelációban a kiszorítás megjelenésével, illetve mértékével.

4.11. A sztérikus gátlóhatás igazolása méretnöveléssel

Annak érdekében, hogy bizonyítsam, hogy a Protein M fehérje antigénkötés gátló hatása valóban sztérikus okokra vezethető vissza, szükségem volt az antigének méretének megnövelésére. Ehhez elengedhetetlen egy olyan megfelelő módszer és reagens, amely az antigénekhez kapcsolódva nem akadályozza az antigén-antitest komplex létrejöttét. A méretnövelésre egy kézenfekvő megoldás lehet az antigének rögzítése nanorészecskék felületére, vagy valamilyen linker molekula felhasználása. A fehérjék méretnövelése elérhető több lépésben is, például a biotin és sztreptavidin közt fellépő erős kölcsönhatást kihasználva. (2.3.4.1. fejezet) A biotinilálás az egyik leggyakoribb fehérje címkéző eljárás, a fehérjék biotinilálása könnyen elvégezhető, a módosítás sikeressége ellenőrizhető. Ha a biotinilált fehérjéket tovább reagáltatjuk a biotinhoz erősen kötődő sztreptavidinnel, a fehérjék mérete jelentősen megnövelhető. Egy sztreptavidin molekula négy biotin megkötésére képes, viszont egy biotin molekula csak egy sztreptavidinhez kötődik, így ezzel a módszerrel nem alakulhatnak ki aggregátumok. [46]

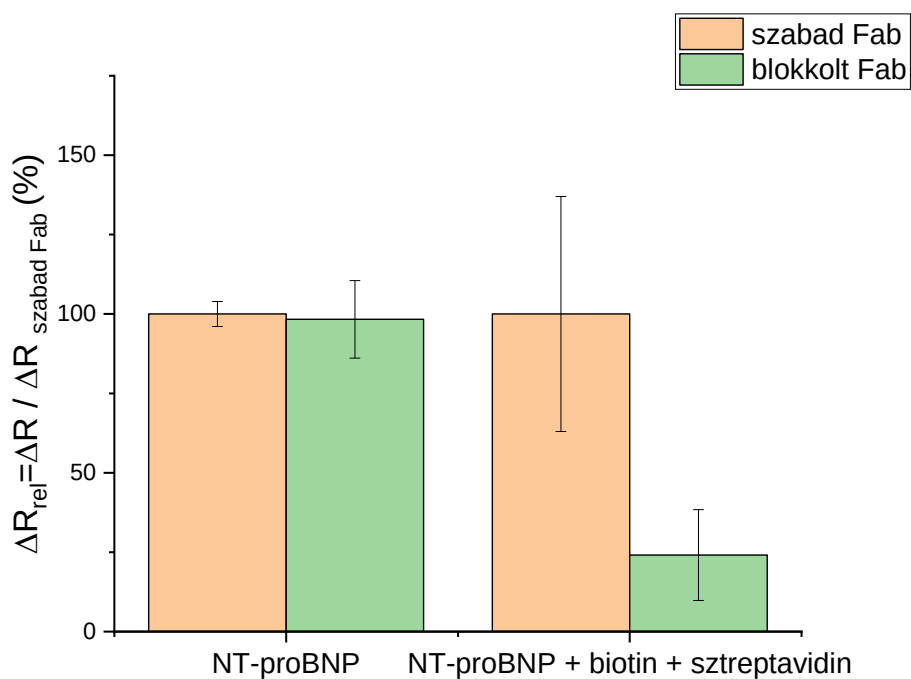
A biotinilálás során fehérjevesztés lépett fel, a veszteség nagyságát NanoDrop mérésekkel ellenőriztem és a hígulást figyelembe vettem a további mérési lépéseknél. A biotinilálás során BSA-val végeztem előkísérleteket, mert a BSA egy alkalmas, relatíve olcsó fehérje. A BSA-t a megadott eljárás mód menete szerint biotiniláltam, majd egy antitesteket és sztreptavidint tartalmazó chip felületére injektáltam. A biotinilált fehérje az antitestekhez nem, míg a sztreptavidin foltokhoz kiválóan kötődött, tehát a módosítás sikeres volt (39. ábra). A kötődött biotinilált BSA molekulákhoz sztreptavidint injektálva a jel a sztreptavidin foltokon tovább megnövekedett. Ez azt igazolja, hogy a BSA számos ponton biotinilálódott, és a biotinilált BSA további sztreptavidin molekulák kötésére is képes.



39. Ábra- Biotinilált BSA kötődése különböző antitesteken és sztreptavidin foltokon (300 µg/ml cseppentési koncentráció). További sztreptavidin injektálására (zöld) jelnövekedés következik be, tehát a biotinilált fehérje képes további sztreptavidin megkötésére is.

Kísérleteimhez az általam eddig vizsgált legkisebb antigént, az NT-proBNP-t választottam, hiszen a méretnövelés hatása elméletünk szerint ezen antigénnél lesz a legnagyobb. A biotinilált NT-proBNP antigéneket sztreptavidinnel kevertem össze még az injektálás előtt. Az antigén-biotin-sztreptavidin komplex jól kötődött a szabad antitestekhez, a Protein M-mel történő reakció után azonban a kötődés mértéke jelentősen lecsökkent (40. ábra). A módosítatlan antigén (NT-proBNP) esetében a jel a szabad kötődés 98 % - ra csökken a Protein M hatására, azaz 2 % - os blokkolást tapasztalunk. Eközben a méretnövelt antigén (NT-proBNP + biotin + sztreptavidin) esetében a blokkolás 70 %. Ezek alapján elmondható, hogy a blokkolási effektus a jelentősen megnő az antigén méretnövekedésének hatására. A

kísérlettel sikerült alátámasztani, hogy a nagyobb méretű antigén kötődését a Protein M fehérje jobban gátolja, mint a kisebb méretű antigénekét, ezek alapján a Protein M antitestkötő fehérje antigénkötődés blokkoló hatása egyértelműen sztérikus okokra vezethető vissza.

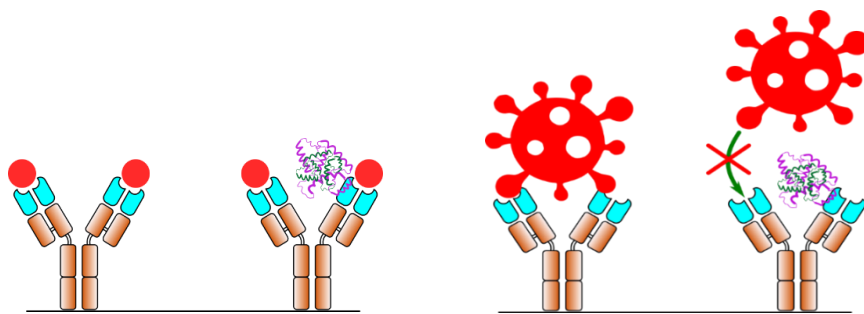


40. Ábra- A szabad és a Protein M-mel reakcióban lévő Fab régiók antigénkötési képessége anti-NT-proBNP (NT34, 300 µg/ml cseppentési koncentráció) antitestek esetén.

5. Összegzés

Munkám során a Protein M fehérje karakterizálásával és antigén kiszorítási tulajdonságának tanulmányozásával foglalkoztam, a méréseket képalkotó felületi plazmon rezonancia (SPRi) segítségével végeztem el.

Első megközelítésben szívbetegség marker fehérjéket (CRP, NT-proBNP, troponin (cTnI)) és ezekre specifikus antitesteket használtam fel. Azonban egyik antigén esetében sem tapasztaltam szignifikáns mértékű különbséget a szabad Fab régió, illetve a Protein M-mel reagáltatott Fab régiók antigénkötési képességében. Az irodalmi adatok vírus antigének vizsgálatára terjednek ki, és ezen antigének esetében tapasztalták az antitest-antigén kötés gátlását is. A fent említett, általam vizsgált antigének azonban kisméretűek (8-125 kDa), így további, nagyobb méretű antigénekre is kiterjesztettem a vizsgálatot. A választott antigének közt szerepel egy jóval nagyobb tömegű antitest (IgE 190 kDa), illetve egy vírus (SARS-CoV-2). Méréseim során azt tapasztaltam, hogy az egyes antigének méretének növekedésével, a kiszorítás mértéke is egyre nő (38. ábra). Ennek megfelelően a Protein M antigén-antitest kötés gátló tulajdonsága valószínűleg sztérikus okokra vezethető vissza.



41. Ábra- A Protein M antitest-antigén kötődést blokkoló hatása sztérikus okokra vezethető vissza. A kisméretű antigének (pl. NT-proBNP, cTnI, CRP) esetében nem tapasztalható önmagában szignifikáns mértékű blokkolás, a nagyobb antigének (pl. vírusok) esetén azonban a Protein M a kötődést teljes mértékben is visszaszoríthatja.

A sztérikus gátlás bizonyítására NT-proBNP-t biotiniláltam és sztreptavidinnel tovább reagáltatva jelentősen megnőveltem az antigén méretét. Az antigén a biotinilálás hatására nem veszítette el antitestkötő képességét, így meg tudtam határozni a megnövelt méretű antigénre is a szabad és blokkolt helyekhez való kötődés mértékét. A méretnövelés hatására a Protein M-mel blokkolt kötődés mértéke a jelentősen lecsökkent (40. ábra), így sikerült bizonyítanom, hogy a Protein M fehérje az antigén-antitest komplex létrejöttét sztérikus okok miatt gátolja.

6. Irodalomjegyzék

- [1] R. K. Grover *et al.*, “A structurally distinct human mycoplasma protein that generically blocks antigen-antibody union,” *Science* (80-.), vol. 343, no. 6171, pp. 656–661, 2014, doi: 10.1126/science.1246135.
- [2] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, J. Kirlyte, and A. Ramanavicius, “Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor,” in *Analytical Chemistry*, Aug. 2010, vol. 82, no. 15, pp. 6401–6408, doi: 10.1021/ac100468k.
- [3] P. Singh, “SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 229, pp. 110–130, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2016.01.118.
- [4] J. Buijs, “SPR-MS in functional proteomics,” *Briefings Funct. Genomics Proteomics*, vol. 4, no. 1, pp. 39–47, Jan. 2005, doi: 10.1093/bfpg/4.1.39.
- [5] E. Sachet, M. D. Losego, J. Guske, S. Franzen, and J.-P. Maria, “Mid-infrared surface plasmon resonance in zinc oxide semiconductor thin films,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 5, p. 051111, Feb. 2013, doi: 10.1063/1.4791700.
- [6] I. Stojanović, R. B. M. Schasfoort, and L. W. M. M. Terstappen, “Analysis of cell surface antigens by Surface Plasmon Resonance imaging,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 52, pp. 36–43, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2013.08.027.
- [7] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundström, “Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 10, no. 8, pp. i–ix, Jan. 1995, doi: 10.1016/0956-5663(95)96965-2.
- [8] A. Chieng, M. Chiang, K. Triloges, M. Chang, and Y. Wang, “Recent progress in the studies of electrochemical interfaces by surface plasmon resonance spectroscopy and microscopy,” *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 13. Elsevier B.V., pp. 94–99, Feb. 01, 2019, doi: 10.1016/j.coelec.2018.11.002.
- [9] “SPR-Pages (Theory).” <https://www.sprpages.nl/spr-overview/spr-theory> (accessed Sep. 28, 2020).
- [10] Y. Yanase *et al.*, “Surface plasmon resonance for cell-based clinical diagnosis,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 14, no. 3. MDPI AG, pp. 4948–4959, Mar. 11, 2014, doi: 10.3390/s140304948.
- [11] J. Homola, “Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–493, Feb. 2008, doi: 10.1021/cr068107d.

- [12] T. P. W. M. et al Janeway CA Jr, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th ed. New York: Garland Science, 2001.
- [13] “classes of antibodies,” *Encyclopædia Britannica*, Sep. 20, 2022. <https://www.britannica.com/science/antibody/Antibody-structure-and-classes> (accessed Oct. 11, 2022).
- [14] “Immunglobulins,” <https://doktorvalaszol.hu/blogcikkek/az-immunglobulinok-szerepe-es-az-immunglobulin-potlas>, Sep. 20, 2022. .
- [15] B. Sutton, A. Davies, H. Bax, and S. Karagiannis, “IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation,” *Antibodies*, vol. 8, no. 1, p. 19, Feb. 2019, doi: 10.3390/antib8010019.
- [16] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispens, “IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. OCT, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [17] T. Rispens and G. Vidarsson, “Human IgG Subclasses,” in *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity*, Elsevier Inc., 2013, pp. 159–177.
- [18] A. Makaraviciute and A. Ramanaviciene, “Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50. pp. 460–471, Dec. 15, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.06.060.
- [19] J. Buijs, J. W. T. Lichtenbelt, W. Norde, and J. Lyklema, “Adsorption of monoclonal IgGs and their F(ab')₂ fragments onto polymeric surfaces,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 5, no. 1–2, pp. 11–23, Sep. 1995, doi: 10.1016/0927-7765(95)98205-2.
- [20] J. Turková, “Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 722, no. 1–2, pp. 11–31, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0378-4347(98)00434-4.
- [21] A. K. Trilling, J. Beekwilder, and H. Zuilhof, “Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview,” *Analyst*, vol. 138, no. 6, pp. 1619–1627, 2013, doi: 10.1039/c2an36787d.
- [22] T. Hayashi and M. Hara, “Nonfouling Self-Assembled Monolayers: Mechanisms Underlying Protein and Cell Resistance,” *Curr. Phys. Chem.*, vol. 1, no. 2, pp. 90–98, Apr. 2011, doi: 10.2174/1877946811101020090.
- [23] M. J. E. Fischer, “Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach,” 2010, pp. 55–73.
- [24] J. Bart, R. Tiggelaar, M. Yang, S. Schlautmann, H. Zuilhof, and H. Gardeniers, “Room-temperature

- intermediate layer bonding for microfluidic devices,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 24, pp. 3481–3488, 2009, doi: 10.1039/b914270c.
- [25] V. Crivianu-Gaita and M. Thompson, “Immobilization of Fab’ fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 70, pp. 167–180, 2015, doi: 10.1016/j.bios.2015.03.032.
- [26] S. W. Oh *et al.*, “Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction,” *FASEB J.*, vol. 19, no. 10, pp. 1335–1337, Aug. 2005, doi: 10.1096/fj.04-2098fje.
- [27] H.-M. Yang, S.-J. Liang, J.-B. Tang, Y. Chen, and Y.-Z. Cheng, “Immobilization of unraveled immunoglobulin G using well-oriented ZZ–His protein on functionalized microtiter plate for sensitive immunoassay,” *Anal. Biochem.*, vol. 432, no. 2, pp. 134–138, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.ab.2012.09.028.
- [28] “Avidin-Biotin Interaction,” *Thermo Fisher*. <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html> (accessed Oct. 26, 2020).
- [29] D. Todorova-Balvay, O. Pitiot, M. Bourhim, T. Srikrishnan, and M. Vijayalakshmi, “Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments,” in *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Aug. 2004, vol. 808, no. 1, pp. 57–62, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.05.034.
- [30] N. G. Welch *et al.*, “High-Throughput Production of Chromium(III) Complexes for Antibody Immobilization,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 20, pp. 10102–10110, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02531.
- [31] B. W. Muir *et al.*, “High-throughput optimization of surfaces for antibody immobilization using metal complexes,” *Anal. Biochem.*, vol. 363, no. 1, pp. 97–107, 2007, doi: 10.1016/j.ab.2007.01.015.
- [32] N. G. Welch, C. J. Lebot, C. D. Easton, J. A. Scoble, P. J. Pigram, and B. W. Muir, “Polypropylene microtitre plates modified with [Cr(OH)₆]³⁺ – for enhanced ELISA sensitivity,” *J. Immunol. Methods*, vol. 446, pp. 70–73, 2017, doi: 10.1016/j.jim.2017.03.015.
- [33] “AnteoBind,” <https://www.genengnews.com/magazine/261/lateral-flow-nanoparticles/>, Sep. 20, 2022. .
- [34] H. Muramatsu, J. M. Dicks, E. Tamiya, and I. Karube, “Piezoelectric crystal biosensor modified with

protein A for determination of immunoglobulins,” *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 23, pp. 2760–2763, Dec. 1987, doi: 10.1021/ac00150a007.

- [35] “<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Protein-A.aspx>,” Sep. 13, 2022. .
- [36] “Comparison of Antibody IgG Binding Proteins,” *Thermo Fisher*. <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/comparison-antibody-igg-binding-proteins.html> (accessed Nov. 11, 2020).
- [37] “Protein G and protein A bind to different IgG.” <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/affinity-chromatography-antibodies/protein-a-g-binding.html> (accessed Oct. 24, 2020).
- [38] P. J. Kelly, M. Tagwira, L. Matthewman, P. R. Mason, and E. Pamela Wright, “REACTIONS OF SERA FROM LABORATORY, DOMESTIC AND WILD ANIMALS IN AFRICA WITH PROTEIN A AND A RECOMBINANT CHIMERIC PROTEIN AG,” 1993.
- [39] B.-M. Kihlberg, A. G. Sjoholm, L. Bjorck, and U. Sjobring, “Characterization of the Binding Properties of Protein LG, an Immunoglobulin-Binding Hybrid Protein,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 240, no. 3, pp. 556–563, Sep. 1996, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0556h.x.
- [40] W. Choe, T. Durgannavar, and S. Chung, “Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides,” *Materials (Basel)*., vol. 9, no. 12, p. 994, Dec. 2016, doi: 10.3390/ma9120994.
- [41] N. Kruljec and T. Bratkovič, “Alternative Affinity Ligands for Immunoglobulins,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 28, no. 8, pp. 2009–2030, Aug. 2017, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00335.
- [42] Y. Arfi *et al.*, “MIB–MIP is a mycoplasma system that captures and cleaves immunoglobulin G,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 19, pp. 5406–5411, May 2016, doi: 10.1073/pnas.1600546113.
- [43] Y. Arfi, C. Lartigue, P. Sirand-Pugnet, and A. Blanchard, “Beware of Mycoplasma Anti-immunoglobulin Strategies,” *MBio*, vol. 12, no. 6, Dec. 2021, doi: 10.1128/mBio.01974-21.
- [44] H. Zhao *et al.*, “MBOVPG45_0375 Encodes an IgG-Binding Protein and MBOVPG45_0376 Encodes an IgG-Cleaving Protein in *Mycoplasma bovis*,” *Front. Vet. Sci.*, vol. 8, Apr. 2021, doi: 10.3389/fvets.2021.644224.
- [45] B. M. G. Janssen *et al.*, “Reversible blocking of antibodies using bivalent peptide–DNA conjugates allows protease-activatable targeting,” *Chem. Sci.*, vol. 4, no. 4, p. 1442, 2013, doi:

10.1039/c3sc22033h.

- [46] “Biotin-streptavidin,” <https://www.aatbio.com/catalog/biotin-and-streptavidin>, Sep. 27, 2022. .