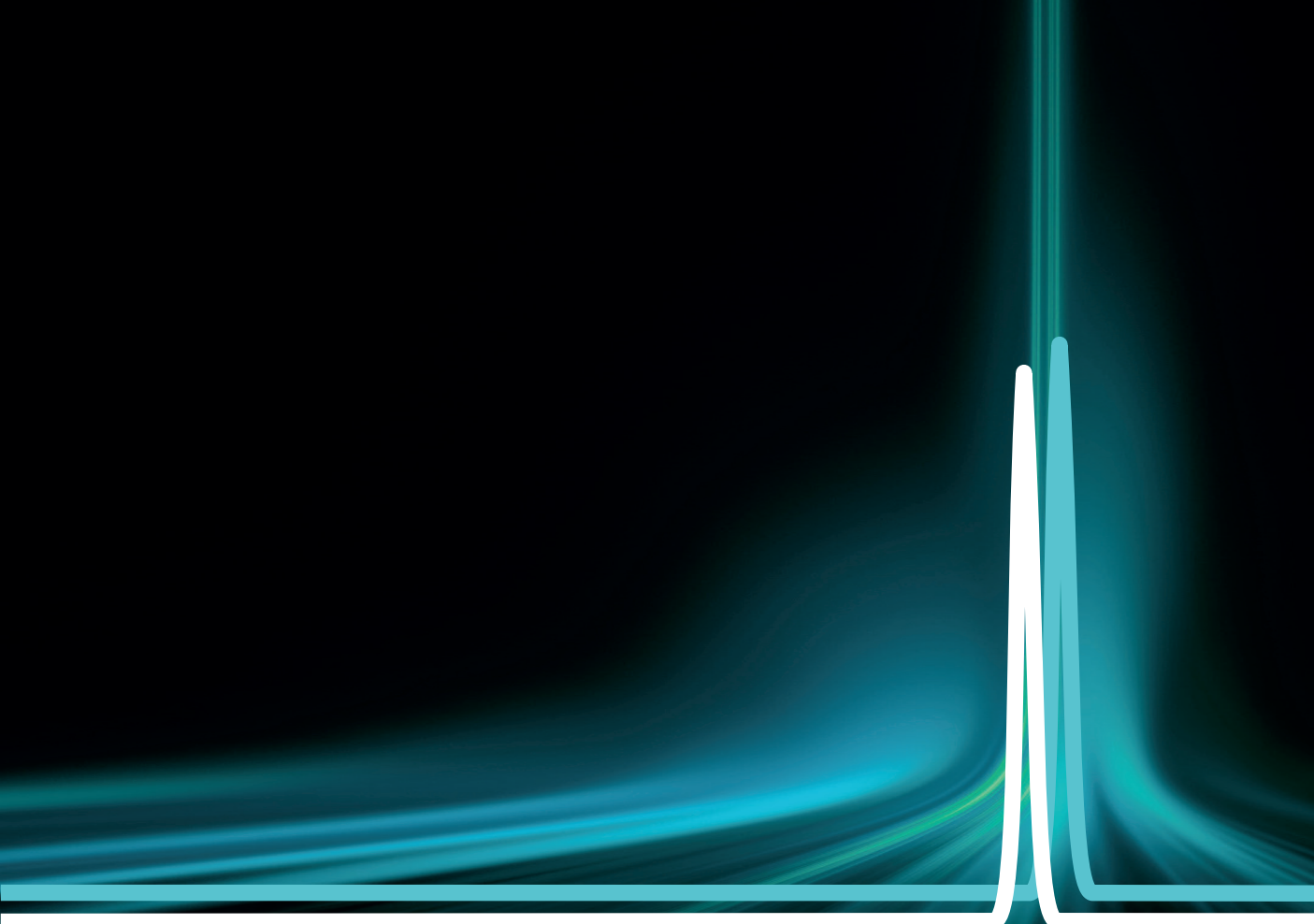




RÉSZVÉTELI IGAZOLÁS

Ezúton igazoljuk, hogy

Fügedi Kata Dorina

(Természettudományi Kutatóközpont)

részt vett a 2021. október 18-20. között megrendezett

METT 25 jubileumi konferencián, Egerszalókon



Prof. Felinger Attila
a METT elnöke

GLÜKÓZAMINOGLIKÁNOK GRAFITALAPÚ ÉS VATTA-HILIC TISZTÍTÁSA

ELKH | Eötvös Loránd
Kutatási Hálózat

Fügedi Kata Dorina^{1,2}, Tóth Gábor^{1,2}, Balbisi Mirjam^{1,3}, Drahos László¹, Turiák Lilla¹

¹ ELKH TTK MS Proteomika Kutatócsoport, 1117 Budapest, Magyar tudósok krt. 2.

² BME VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, 1111 Budapest, Szt. Gellért tér 4.

³ ELTE Kémia Intézet, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/a.



BEVEZETÉS

A glükózaminoglikánok (GAG-ok) diszacharid építőegységekből álló hosszú, lineáris makromolekulák, melyek gyakran kapcsolódnak fehérjévezakhoz poszt-transzlációs módosulásként, így biológiai szempontból szerepük meghatározó. A heparán-szulfát (HS) esetében a diszacharid építőegységek glükuronsavból és N-acetilglükózaminból állnak, amelyek akár három, különböző pozícióban elhelyezkedő szulfát csoportot is tartalmazhatnak. A GAG-ok vizsgálata heterogén méreteloszlásuk és polaritásuk miatt egyszerűbb, ha diszacharid építőegységeire bontjuk azokat. A műszeres analízis előtt azonban szükséges egy tisztítási lépés elvégzése is, amely során az egyéb biológiai és emésztési maradványoktól, sóktól megtisztítjuk a diszacharidokat, hogy kis mennyiségű minták is hatékonyan vizsgálhatók legyenek, azonban a széles polaritástartomány miatt továbbra is kihívásokkal teli feladat.

CÉLKITŰZÉSEK

- Kis mennyiségű biológiai minták vizsgálatára szolgáló szilárd fázisú extrakciós (SPE) módszer fejlesztése GAG-ok tisztítására

- Saját készítésű vatta-HILIC módszer
- Kereskedelmi forgalomban kapható grafit alapú módszerek

KONKLÚZIÓK

- Vatta HILIC SPE:
a polárisabb, szulfatáltabb komponensek megkötésére alkalmas
- Grafit SPE:
a nem- és az egyszerűen szulfatált komponenseket köti meg
- A megfelelő visszanyerés és torzítatlanság eléréséhez a két módszer kombinációja alkalmazandó

Saját töltésű vatta-HILIC módszer



Kereskedelmi forgalomban kapható 100% pamut tartalmú vatta.

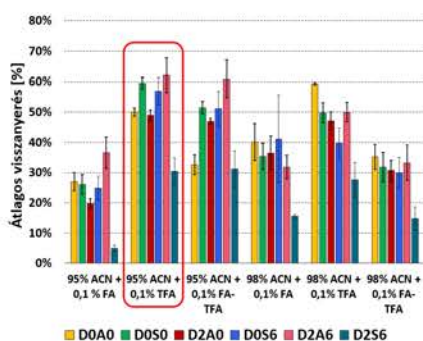
HILIC típusú állófázis

Pipettahegyekbe töltve 2-3 mm magasságban.

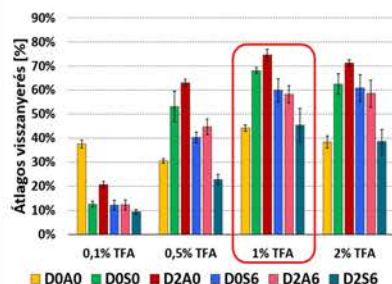
~2-3mm

Optimált paraméterek:

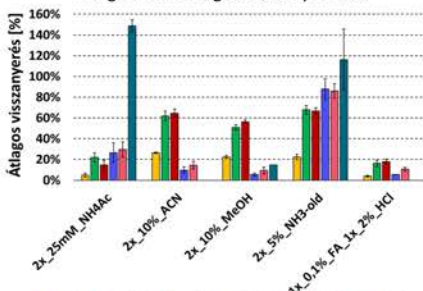
- ideális vatta mennyiség,
- az oldószert összetétel (1.ábra)
- savminőség (1.ábra)
- savkoncentráció (2.ábra).
- az elúció összetétele (3.ábra)
- hőmérséklet
- ideális oldószert térfogatok



1. ábra: A felviteli oldószert és savminőség hatásának vizsgálata az átlagos visszanyerésre.



2. ábra: A felviteli oldószert savmennyiségének hatásának vizsgálata az átlagos visszanyerésre.



3. ábra: Az elúció összetételének hatásának vizsgálata az átlagos visszanyerésre.

Optimalizált protokoll:

Centrifuga paraméterek: 2500 rpm, 1 min

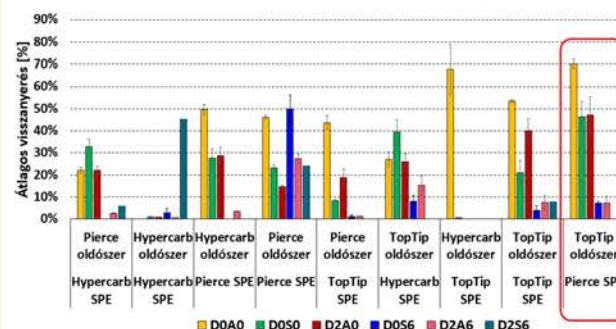
- Felület aktiválás 50 µl 40% H₂O 60% ACN
- Kondicionálás 50 µl 1% TFA, 95% ACN x 2
- Felvitel 30 µl 1% TFA, 95% ACN
- Felvitel ismétlés x 2
- Mosás 50 µl 1% TFA, 95% ACN
- 40°C-ra melegített elúció 10 µl 5% NH₃ x

Grafit alapú módszerek

Három kereskedelmi forgalomban kapható grafit SPE állófázis.

Három oldószert rendszer

Összes lehetséges kombináció



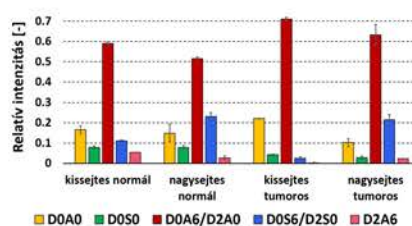
4. ábra: A kombinált grafit módszerek visszanyerései

Optimalizált protokoll:

Centrifuga paraméterek: 2500 rpm, 1 min

- Felület aktiválás 100 µl 80 % ACN 0,1% TFA 2x
- Kondicionálás 100 µl víz 2x
- Felvitel 50 µl víz. Inkubálás 2 percig centrifugálás előtt.
- Felvitel ismétlés 1x
- Mosás 100 µl víz 3x
- Elúció 50 µl 40% ACN 0,05% TFA 3x

ALKALMAZÁS



5. ábra: Tüdőrákos minták HS szulfatációs mintázatának összevetése a környező normál szövetekkel.





VÉGLEGES PROGRAM
ELŐADÁS- ÉS POSZTERKIVONATOK

METT 25

a Magyar Elválasztástudományi Társaság jubileumi konferenciája

P-36

Horváth Simon^{1,2}, Eke Zsuzsanna², Németh Gábor¹

¹ Egis Gyógyszergyár Zrt., Hatóanyagfejlesztési főosztály, Budapest

² Hevesy György Kémia Doktori Iskola, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest

Normál fázisú és poláris szerves oldószeres mód közötti váltás után fellépő reprodukálhatósági problémák megoldása ADMPC alapú kolonnák esetén

P-37

Kirchkeszner Csaba^{1,2}, Petrovics Noémi^{1,2}, Eke Zsuzsanna^{1,3}

¹ Eötvös Loránd Tudományegyetem, Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium (EKOL), Budapest

² Eötvös Loránd Tudományegyetem, Hevesy György Kémia Doktori Iskola (HKDI), Budapest

³ Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ (WIREC), Budapest

A lágyítótartalom és a hőmérséklet hatása a különböző műanyag-adalékanyagok polipropilén-alapú élelmiszer-csomagolóanyagokból történő kioldódására

P-38

Nagy Cynthia¹, Huszánk Róbert², Gáspár Attila¹

¹ Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debreceni Egyetem, Debrecen

² Atommagkutató Intézet, Debrecen, Debrecen

Mikrofluidikai csipek csatornageometriájának vizsgálata proteomikai alkalmazásokhoz

P-39

Pál Domonkos^{1,2}, Tóth Gábor^{1,2}, Sugár Simon^{1,3}, Drahos László¹, Turiák Lilla¹

¹ TTK MS Proteomika Kutatócsoport, Budapest

² BME VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Budapest

³ SE Gyógyszertudományok Doktori Iskola, Budapest

Májelváltozások proteomikai és glikomikai jellemzése

P-40

Fügedi Kata Dorina^{1,2}, Tóth Gábor^{1,2}, Drahos László¹, Turiák Lilla¹

¹ ELKH TTK MS Proteomika Kutatócsoport, Budapest

² BME VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Budapest

Glükózaminoglikánok grafitalapú és vatta-HILIC tisztítása

Glükózaminoglikánok grafitalapú és vatta-HILIC tisztítása

Fügedi Kata Dorina^{1,2}, Tóth Gábor^{1,2}, Drahos László¹, Turiák Lilla¹

¹ ELKH TTK MS Proteomika Kutatócsoport, Budapest

² BME VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Budapest

A glükózaminoglikánok (GAG-ok) ismétlődő diszacharid egységekből felépülő lineáris poliszacharid molekulák, melyek a cukorlánc mentén különböző pozícióban és mértékben lehetnek szulfatáltak. A legnagyobb szerkezeti változatosságot mutató heparán-szulfát (HS) osztály esetén a diszacharid építőegységek glükuronsavból és *N*-acetilglükózaminból állnak, és akár három szulfátcsoportot is hordozhatnak. A GAG-ok vizsgálata analitikai szempontból kihívásokkal teli feladat a nagy méretük, heterogén méreteloszlásuk és polaritásuk miatt. Emiatt elterjedt minta-előkészítési módszer a láncok enzimatis emésztése során keletkező diszacharidok vizsgálata. Azonban a műszeres vizsgálatok előtt szükséges egy mintaelőkészítési lépésben tisztítani a diszacharidokat az egyéb biológiai és emésztési maradványoktól, sóktól, ez azonban a nagy polaritásbeli különbségek miatt nem egyszerű feladat.

Ezért célul tűztük ki a kis mennyiségű biológiai mintákból kinyert HS diszacharidok vizsgálatára szolgáló szilárd fázisú extrakciós (SPE) módszer fejlesztését. A kereskedelmi forgalomban kapható 100% pamutvatták cellulóz anyaga alkalmazható HILIC-típusú állófázisként, korábban azonban GAG-ok tisztítására még nem alkalmazták, így célunk volt egy erre alkalmas SPE módszer kifejlesztése saját készítésű, vattával töltött pipettahegyekkel.

Emellett összehasonlítottunk három kereskedelmi forgalomban kapható, eltérő technológiájú grafit töltetű SPE rendszert. Elvégeztük a gyártók által ajánlott protokollt a hozzájuk tartozó állófázisokon, valamint megvizsgáltuk ezen protokollok hatását az eltérő típusú állófázisokra is, melyekből kiválasztottuk a legjobban teljesítő módszert.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a grafit alapú töltetekről a többszörösen szulfatált komponensek nem eluálhatók megfelelő mértékben. A vatta-HILIC módszer esetén a többszörösen szulfatált komponensek tisztítása 90% fölötti visszanyeréssel oldható meg, azonban a kevésbé szulfatált diszacharidok megkötődése az állófázison nem kielégítő. Mindezek következményeként a két töltet kombinációját használtuk, amely alkalmasnak bizonyult HS diszacharidok torzítatlan SPE tisztítására kis mennyiségű komplex mintákból.

A munka a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj és a NKFIH OTKA PD 121187 és OTKA FK 131603 pályázatok támogatásával készült.