

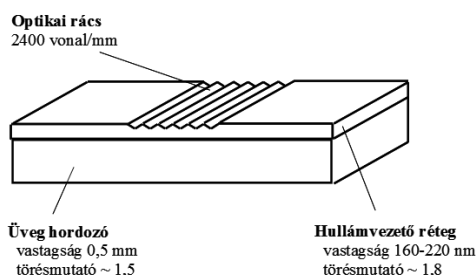
Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia
Majerné Baranyi Krisztina – Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra
NAIK ÉKI 1022 Budapest, Herman Ottó út 15. 4. épület

Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) olyan valós idejű és nagyérzékenységű szenzortechnika, amely lehetővé teszi a határfelületen lejátszódó folyamatok valós idejű, jelölésmentes vizsgálatát. Az OWLS technika alkalmas:

- fehérjék felületi adszorpciójának vizsgálatára
- kémiai szenzorként páratartalom és különböző gázok mérésére
- asszociációs és disszociációs kinetika tanulmányozására
- antitest/antigén, illetve ligand/receptor kötődés vizsgálatára
- immunszenzorként antigének, illetve antitestek mérésére
- fehérje - DNS kölcsönhatás tanulmányozására

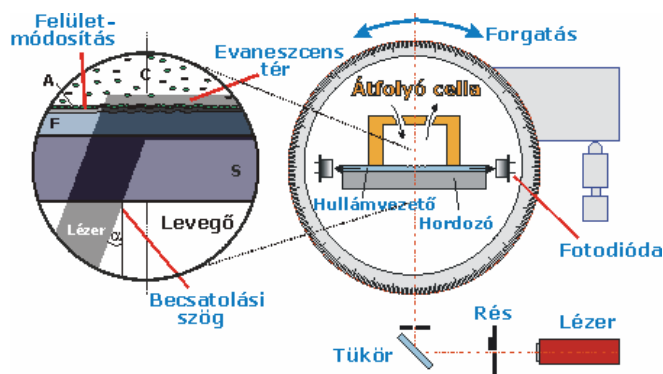
Mérés technikai háttere

Az integrált optikai hullámvezető szenzor alapját a szenzor (chip) adja, amely egy kb. 200 nm vastagságú üveglemezre felvitt nagy törésmutatójú SiO₂-TiO₂ rétegből áll, amelyben finom optikai rácsot alakítanak ki. Ez az optikai rács csatolja be a mérés során a lineárisan polarizált He-Ne lézer fényt a hullámvezető rétegbe egy pontosan meghatározott szögnél. A becsatolás szöge érzékenyen változik a felületen lejátszó folyamatokra (adszorpció, deszorpció). A becsatolás szöge a felületen található anyag és a szenzor komplex törésmutatójának függvénye. A becsatolt fény teljes visszaverődések sorozatával terjed a hullámvezetőben, intenzitását a szenzor 2 végén elhelyezett fotodiódákkal detektáljuk. A becsatolás szöge pontosan meghatározható, belőle pedig a felületen megkötött anyag rétegvastagsága, törésmutatója, egységnyi felületre eső mennyisége számolható. E két paraméter ismeretében a Fejter képlet felhasználásával pedig az egységnyi felületre abszorbeálódott tömeget kaphatjuk meg.

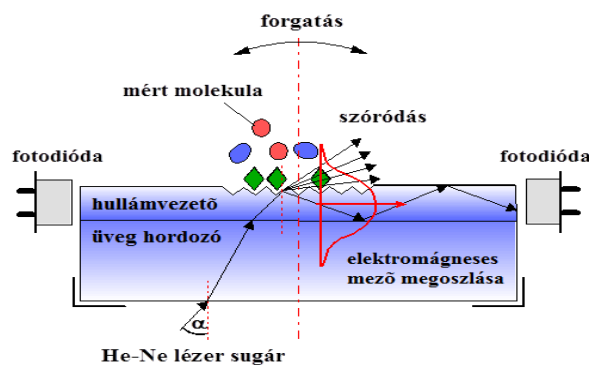


$$M = d_A \frac{n_A - n_C}{dn/dc}$$

A dn/dc a felületre abszorbeálódott anyag törésmutatójának koncentrációtól való függésére jellemző, és értéke fehérjék többségére univerzális és állandó (0,182 cm³/g).



Az OWLS berendezés működési sémája



A OWLS működésének sematikus ábrája

Ahhoz, hogy ezeket a szenzorokat regenerálható bioszenzorként alkalmazhassuk, fontos, hogy a méréshez használt biomolekulát a szenzor felületén minél erősebb kötással, lehetőség szerint kovalens kötással rögzítsük anélkül, hogy jelentősen megváltoztatnánk annak aktivitását, illetve, anélkül, hogy a szenzor felületén történő változtatásokkal számottevően befolyásolnánk a szenzor intenzitás spektrumát (torzítnánk azt).

A szenzor jellemzése

A szerves $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ hordozóként történő alkalmazása számos előnyt jelent a szerves hordozókkal szemben, elsősorban fizikai tulajdonságai alapján. A szerves hordozók nagyobb mechanikai ellenállóképessége, hőstabilitása, szerves oldószerekkel ill. mikróbákkal szembeni ellenállóképessége, egyszerűbb regenerálhatósága, hosszú élettartama alkalmasabbá teszi az ipari felhasználásra.

A hullámvezető anyaga $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ 75%-25% arányú keverékből áll, de egyes irodalmi adatok alapján a TiO_2 mennyiség akár a 40%-ot is elérheti. A szenzor felületén szilanol ill. tianol csoportok találhatóak, melynek mennyisége a $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ arányától illetve a hullámvezető réteg kialakításánál használt hőmérséklettől függ. Minél több a TiO_2 aránya annál jobban nedvesíthető a felület. Minél magasabb a hullámvezető réteg kialakításánál használt hőmérséklet annál hidrofóbbá válik a felület, annál nehezebb a rehidratáció.

A szenzor felületének módosítása

A hullámvezető felületén lévő -OH csoportok kevés lehetőséget biztosítanak a biomolekulák kovalens rögzítésére, ezért a szenzor felületét módosítani kell. A felületmódosításra leggyakrabban alkalmazott eljárás a szilanizálás. Az eljárás célja, hogy kialakítható legyen a hordozó és a biomolekula közötti kovalens kötés. E mellett a szilanizálás csökkenti a nem-specifikus adszorpciót, ellenállóbbá teszi a felületet a külső hatásokkal szemben, pl.: a lúgokkal szembeni érzékenység csökken.

A szilanizálási folyamat megkezdése előtt a hordozót meg kell tisztítani minden szennyeződéstől. A felülettisztítás lehet igen egyszerű vagy többlépcsős bonyolult fizikai, vagy kémiai eljárás. A legegyszerűbb módszer a hőkezelés, melynek során olyan magas hőmérsékletre hevítik a hordozót, hogy leég róla az adszorbeált anyag. Egy másik eljárás során a hordozót 5%-os salétromsav oldatban 45 percig forraljuk, majd ezt követően desztillált vízzel lemossuk a savat.

A szilánok általános képlete:



Az R nem hidrolizálható funkciós csoport, amely a rögzítendő molekulával közvetlenül, vagy keresztkötő vegyületek segítségével közvetetten tud kapcsolódni.

Az X egy hidrolizálható csoport, amely lehet alkoxi-, amino- vagy kloro csoport. Az X csoport vesz részt a szilán és a hordozó között kialakuló sziloxán kötésben. A leggyakrabban alkalmazott alkoxi csoportok a metoxi és etoxi csoportok, melyek a kötés kialakulásakor melléktermékként metanolt és etanolt képeznek. A kloroszilánok melléktermékként sósavat képeznek, ezért alkalmazásuk jóval szűkebb körű.

A kötési folyamat négylépcsős reakcióban játszódik le

1. Először megtörténik az X csoport hidrolízise, melynek során reaktív szilanol csoport keletkezik. A hidrolízishez szükséges víz számos forrásból származhat. Lehet hozzáadott víz, de a felületen jelenlevő víz is betöltheti e szerepet, vagy az atmoszférából illetőleg a felhasznált oldószerből is származhat.
2. Ezt követően a szilánmolekulák oligomerekké kapcsolódnak.
3. A harmadik lépésben az oligomerek a hordozó hidroxil csoportjához hidrogénkötésekkel kapcsolódnak.
4. Végül pedig egy szárítási folyamat következik, melynek során vízkilépés kíséretében kialakul a hordozó és a szilán közt a kovalens kötés.

Szilánmolekula kiválasztása

Azt, hogy egy adott biológiailag aktív molekula kötéséhez milyen szilánt használjunk a szilanizálási folyamathoz, általában empirikus úton határozzuk meg. A kötés kialakulását nagymértékben befolyásolja, hogy az adott szilánmolekula hány hidrolizálható csoportot tartalmaz. Leggyakrabban három hidrolizálható csoportot tartalmazó szilánmolekulákat alkalmaznak. A trifunkciós szilánok merev felületet, de maximális hidrilitikus stabilitást biztosítanak. A bifunkciós szilánok kevésbé rigid felületet biztosítanak. Az egy funkciós csoportot tartalmazó szilánok monomolekuláris réteget képeznek, erősen hidrofób felületet adnak, de hidrolitikus stabilitásuk kicsi. A hidrolitikus stabilitás fokozható, ha a funkcionális szilánokat nem funkcionális szilánnal keverik. Általában ezek 3:1 arányú keverékét használják.

A szilanizálás a használt oldószert tekintve lehet vizes ill. szerves szilanizálás. Vizes fázisban történő szilanizálásnál az előkészített hordozót 10%-os vizes szilán oldatba merítik. A pH-t HCl-val pH=4 re állítják, majd az egészet 75°C-ra melegítik 3-5 óra hosszat. Ezt követően desztillált vízzel mossák, majd 110°C-on egy éjszakát szárítják, hogy növeljék a stabilitást. Az eljárás során vékony egyenletes szilánréteget lehet képezni, habár kevesebb funkciós csoport vihető így fel, mint szerves szilanizálással.

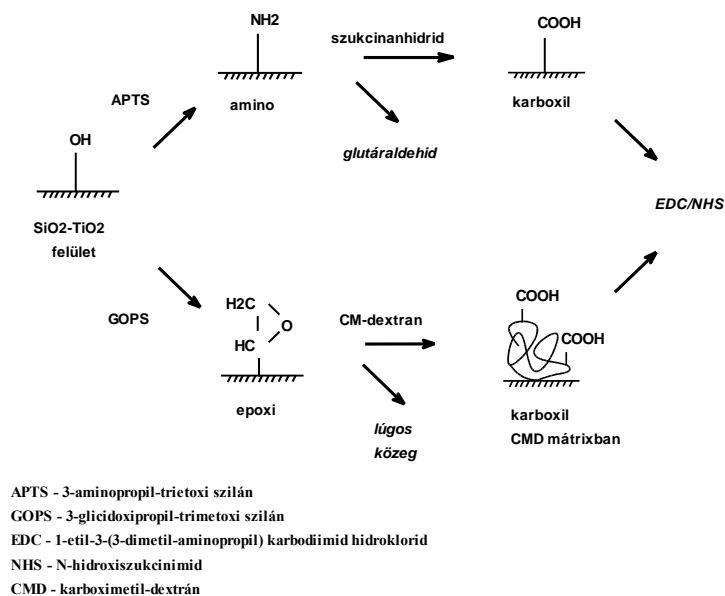
Szerves szilanizálásnál valamilyen illékony oldószerral 5-10%-os szilán oldatot készítenek, és azzal kezelik a felületet. Ez történhet bemelegítéssel, bepárlással, alacsony hőmérsékleten történő elpárologtatással vagy rágőzöléssel. A folyamat az alkalmazott hőmérséklettől függően (20-120°C-on) 2-48 óra lehet. Ezt követően az adott oldószerral történő mosás következik, majd szárítás, végül hőkezelés 80-115°C-on 1,5-12 óráig. Eredményként sokkal vastagabb, nem olyan egyenletes, de több funkciós csoportot tartalmazó felületet érhető el.

Hordozó aktiválása

A biomolekulák számos reaktív csoporttal rendelkeznek, melyek felhasználásával kovalenskötés kialakítására nyílik lehetőség. Ezek közül leggyakrabban az amino-, szulfhidril-, karboxil- és aromás csoportokat használjuk. Ahhoz hogy a biomolekula kötődjön a hordozóhoz aktiválni kell a hordozót, tehát olyan funkciós csoportot kell kialakítani a felületén, amely a biomolekula funkciós csoportja számára támadási felületet biztosít.

Az OWLS vizsgálatokhoz aminoszilanizált szenzorokat használunk, melyek aktiválása lehet kétlépcsős folyamat, mely során rövid bifunkciós keresztkötő vegyületeket alkalmazunk. A kötővegyület lehet homobifunkciós, ilyenkor mindkét végén ugyan azt a funkciós csoportot tartalmazza, és heterobifunkciós, amikor a két vége különböző funkciós csoportból áll.

A leggyakrabban alkalmazott bifunkciós molekula a glutáraldahid, mely két végén található aldehidcsoporttal két aminocsoport összekapcsolására alkalmas. Glutáraldehid adagolása után a fehérje közvetlenül köthető a felülethez. Az aminoszilanizált chippek másik aktiválási módja az, amikor a kialakított aminocsoportot szukcinanhidriddel karboxil csoporttá alakítjuk át, melyet EDC/NHS technikával aktiválunk. Ebben az esetben a fehérje közvetlenül a karboxil csoporthoz kötődik.



A szenzor felület módosításának és aktiválásának lehetőségei

OWLS mérőrendszer felépítése

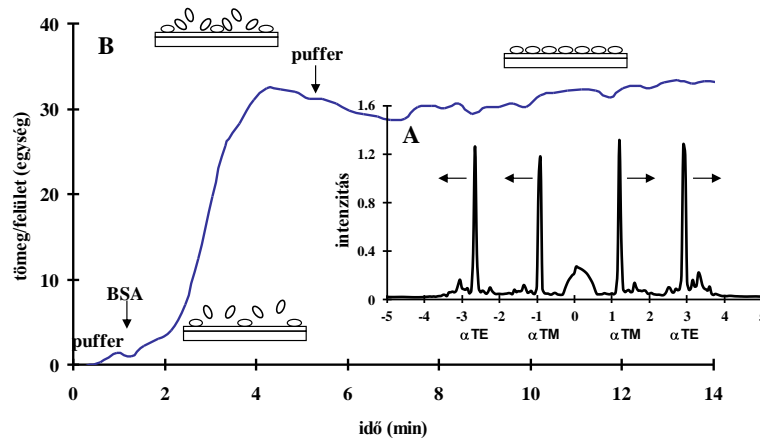
A méréshez OW 2400 típusú amino funkcionizált integrált optikai hullámvezető szenzort (chip) (MikroVakuum Kft, Budapest) használunk, és a MikroVakuum Kft. által gyártott OWLS 120-as típusú berendezéssel dolgozunk. A műszert a BioSense 2.2 szoftver vezérli. A szenzor időben állandó, stabil működésének érdekében az OWLS szenzort folyamatosan áramló injektációs rendszerben (FIA) működtetjük. A szenzort a mérőberendezés mintatartó átfolyó cellájába helyezve használjuk. Az állandó áramlási sebességet egy Gilson Minipulse 3 perisztaltikus pumpa biztosítja. A mintatartó átfolyó cella hőmérsékletének szabályozását az OWLS TC hűtő/fűtő egység kontrolálja. A rendszer egy Rheodyne típusú injektorral van felszerelve, mely 200 µl-es mintavevő hurkot tartalmaz. Az eredmények kiértékelését a MikroVakuum Kft. BioSense 2.6 szoftver-rel végezzük. A FIA rendszerrel ellátott OWLS 120 mérőműszert mutatja be.

Tervezett mérési gyakorlat

Az aminoszilanizált szenzor felületén 20 µg/ml BSA molekulát 2,5 %-os glutáraldehiddel kovalensen rögzítünk és mérjük a szenzor által a különbözőkoncentrációjú (10, 25, 50, 100, 200 µg/ml) antitestre adott válaszok nagyságát. Az amino funkcionizált felületen a kisebb móltömegű BSA molekulát rögzítjük és vizsgáljuk direkt mérési módszerrel a különböző koncentrációjú antitest oldatokra adott szenzorválaszokat.

Immunszenzorok alkalmazása

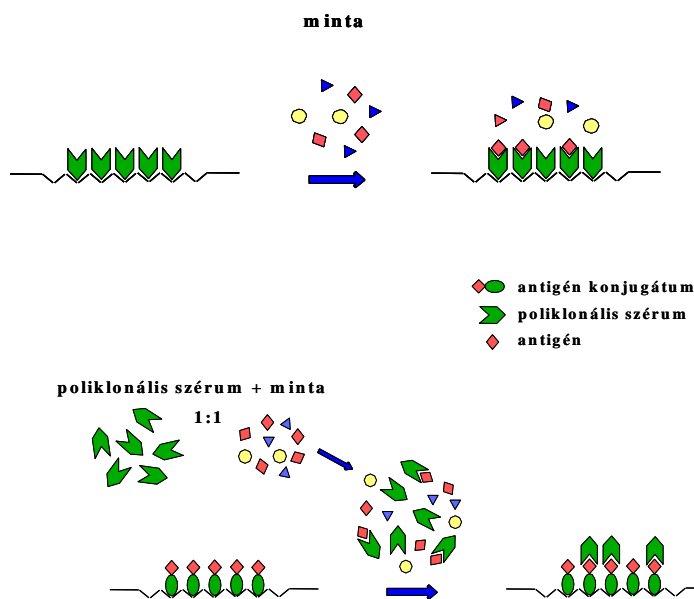
A szenzort a mérőberendezés mintatartó átfolyó cellájába helyezve használjuk (4.1. ábra). A mérésnél a hullámvezetőn lévő rácst polarizált He-Ne lézer (632,8 nm) fénnel alulról világítjuk meg. A szenzort tengelye mentén kis szögtartományban ($\pm 10^\circ$) forgatva a lézernyaláb felett, a fény a rácson megtörik illetve szóródik, és meghatározott szögértékeknél – az ún. becsatolási szögnél – belép a hullámvezetőbe, ahol teljes visszaverődések sorozatával terjed.



A hullámvezető felszínén a megkötődött réteg vastagságának, felületi borítottságának ábrázolása a lézertény beesési szögének függvényében

(A (inert) – adott *chipse* jellemző pillanatnyi intenzitáspektrum, α_{TE} – transzverz elektromos fénymódus becsatolási szöge, α_{TM} – transzverz mágneses fénymódus becsatolási szöge, B – a hullámvezető felszínén a megkötődött réteg vastagságának időbeli alakulása)

A



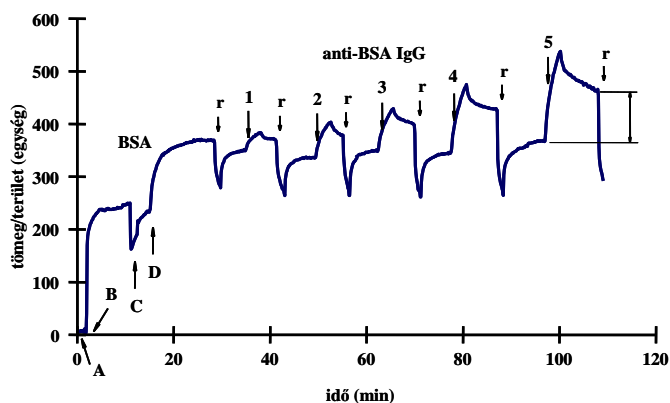
B

A vizsgált immunszenzorok működésének elvi vázlata (A – nem versengő, direkt mérés, B – versengő mérés)

A szenzorfejlesztések során két immunszenzortípust alakítható ki, a direkt (nem versengő) illetve a versengő elrendezést. A nem versengő vagy direkt mérés (A) esetében a hullámvezető felületén a specifikus szérum megfelelő hígítású oldatát rögzítettük kovalensen, és közvetlenül mértük a kimutatni kívánt vegyületeket tartalmazó standardokra, illetve mintákra adott szenzorválaszok nagyságát. A versengő (kompetitív) immunszenzor (B) kifejlesztése során a

vizsgálandó antigén vagy az antigénmolekuláknak fehérjével képzett konjugátuma került rögzítésre. A mérések során a standardoldatokat, illetve mintákat ismert mennyiségű antitestet tartalmazó szérummal elegyítettük, inkubáltuk, majd injektáltuk a mérőrendszerbe. A mérésnél így a mintában lévő antigének által meg nem kötött, szabad antitestek mennyiségét határoztuk meg, és ebből a jelből következtettünk a minták eredeti antigéntartalmára.

A szilanizált szenzorok alkalmazásával a BSA – anti-BSA IgG molekulapár immunreakcióját vizsgáljuk, a BSA molekulákat glutáraldehiddel kovalensen rögzítve a szenzor felületén és mérve a különböző koncentrációjú antitest oldatokra adott szenzorválaszokat. A méréseket FIA rendszerben végezzük. Az alkalmazott áramlási sebesség 0,18 ml/perc. A kísérletek során, a mérőcellán először desztillált vizet áramoltatunk (A), majd a rendszerbe glutáraldehid oldatot (2,5% deszt. vizes) injektáljunk (B). Az oldat kimosódását követően a desztillált vizet TRIS pufferre (42 mmol/l, pH 7,4) cseréljük (C). A BSA rögzítése injektálással (D). A rögzítési lépés után a szenzort rövid ideig pufferrel mossuk a meg nem kötődött molekulák eltávolítására, majd 0,1 mol/l HCl-at injektálunk. Az érzékenyített szenzorfelület ezt követően alkalmas a minták mérésére. Az egyes IgG standardok mérése között a felület regenerálása, a megkötődött IgG molekulák lemosása ugyancsak 0,1 mol/l sósavoldat injektálásával történik.



BSA rögzítése aminofunkcionalizált szenzorfelületen és különböző koncentrációjú anti-BSA oldatokra adott jelei (A – desztillált víz; B – 2,5% glutáraldehid; C – TRIS puffer (42 mmol/l, pH 7,4); D – 200 µg/ml BSA; r – 0,1 mol/l HCl; 1. – 10 µg/ml anti-BSA; 2. – 25 µg/ml anti-BSA; 3. – 50 µg/ml anti-BSA; 4. – 100 µg/ml anti-BSA; 5. – 200 µg/ml anti-BSA)