



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar



BMEETT
ELEKTRONIKAI TECHNOLOGIA TANSZÉK



Majoros Barbara

Egészségügyi mérnök MSc hallgató

Koronavírus fehérjék molekuláris kölsönhatásának vizsgálata optikai bioszenzorral

Tudományos Diákköri Dolgozat

Témavezetők:

Gerecsei Tamás (PhD hallgató)

ELKH-EK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport

Dr. Horváth Róbert

ELKH-EK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Bonyár Attila

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Elektronikai Technológia Tanszék

Budapest, 2020.

Tartalomjegyzék

Kivonat	4
Abstract	6
1. Bevezetés	7
2. Szakirodalmi áttekintés	9
2.1 Optikai bioszenzorok	9
2.1.1 GCI jelölésmentes optikai bioszenzor működési elve	10
2.1.2 GCI jelölésmentes optikai bioszenzor felépítése	11
2.2 Koronavírusok általános jellemzése	13
2.2.1 A vírus felépítése	13
3. Célkitűzés	15
4. Anyagok és módszerek	16
4.1 Felhasznált anyagok	16
4.2 Mérési módszer	16
4.3 Mérések menete	17
4.3.1 Stabilizáció	17
4.3.2 Immobilizáció	18
4.3.3 Kinetika	19
4.3.4 Regeneráció	21
5. Eredmények	22
5.1 Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S2 (ab272106) vizsgálata	22
5.2 Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 (ab273068) vizsgálata	24
5.3 Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 (ab273068) immobilizációja	27
6. Összefoglalás	28
7. Köszönetnyilvánítás	29

Felhasznált irodalom	30
----------------------------	----

Kivonat

Az utóbbi években az optikai bioszenzorok fejlesztése rohamosan felgyorsult, a cél minél nagyobb érzékenységgel bíró és minél pontosabban mérő műszerek fejlesztése. Az általam elvégzett mérések egy WAVEdelta nevű műszerrel zajlottak, amely a nagy érzékenységű (0.01 pg/mm^2) rács-csatolt interferometria (GCI) módszerrel működik. A GCI rendszer egyik fő része egy He-Ne lézerforrás, amely fénysugara két párhuzamos sugárra van ketté választva, amelyek egy optikai hullámvezető rétegbe vannak bevezetve. A két sugár a mérő és a referencia sugár, a mérő sugár egy optikai ráccsal történő becsatolást követően végighalad a hullámvezető rétegben, majd ezt követően, a lézersugár másik nyálábjával (referencia sugár) egyesül és interferálnak. A hullámvezető azon szakaszán, ahol csak a becsatolt mérőnyaláb terjed (mérési felületen) a felület közelében megjelenő biomolekulák törésmutató-változást eredményeznek. Ennek eredménye, hogy a hullámvezetőben terjedő fény fázisa eltolódik. Amikor a hullámvezetőben terjedő mérőnyaláb találkozik a referencia nyálákkal (még a hullámvezetőben), a kettő interferál egymással. Ahogy változik a mérőnyaláb fázisa, az interferencia karakterisztikája is változik. A két párhuzamos sugár együtt érkezik a detektorba, ahol fényintenzitást mérünk és ahol az időben periodikus interferenciát mérhetjük. A technika előnye, hogy nagy a műszer érzékenysége így nagyon kis molekulák is mérhetők vele, valamint a mérés során négy mikrofluidikai csatorna egyidőben használható, továbbá időben történő változást, azaz kinetikát mér, a kapott kinetikai görbék kiértékelésével megtudhatjuk, hogy mekkora a kötés erőssége, melyik molekula hogyan köt. Hátrányként felmerülhet, hogy a nagy érzékenység miatt a nem specifikus jelek zavaróak lehetnek, ez azonban kiküszöbölhető referencia csatornák alkalmazásával.

Manapság mindennapi életünk befolyásoló tényezőjévé vált a SARS-CoV-2 koronavírus által kiváltott légúti és légzőszervi megbetegedés. A vírus cseppfertőzéssel terjed, tehát beszéd, tüsszentés vagy köhögés után a levegőben szétporlasztott nyálcseppekhez tapadva a légáramlattal jutnak tovább. A koronavírus elnevezés a vírus elektronmikroszkópos képe alapján született ugyanis a vírus felszínét kitüremkedő fehérjetüskék alkotják melyek hasonlóak a Nap koronájához. Ezeket a kitüremkedő fehérjetüskéket a vírus felszínén különböző glikoproteinek alkotják. A fehérjetüskét alkotó fehérjék közül érdemes kiemelni az S1 és S2 fehérjéket. Ezekkel a fehérjékkel tud a vírus a humán sejtek ACE2 receptorához kapcsolódni ezáltal bejutni a sejtbe. Az ACE2 receptor az emberi szervezet renin-angiotenzin rendszerének egyik receptora, amely többek között a vérnyomás szabályozásért felel.

Az általam elvégzett mérések során azt vizsgáltuk, hogy az antitesteket egy polikarboxilát polimerből (PCP) felépülő bevonatra felvitt protein A/G réteghez rögzítve vagy a vírus S1 fehérjét a PCP felületre rögzítve kapunk értékelhető eredményt, amelyeket később gyógyszer fejlesztéshez használhatunk. Valamint a kísérletek során validációs méréseket is végeztünk, amelyek alapján kijelenthető, hogy az ACE2 receptorhoz csak a vírus felszínén lévő S1 fehérje képes kapcsolódni.

Abstract

Optical biosensors are intensively researched today, with the aim of developing devices with better sensitivities and overall performances. During my work, I employed the grating coupled interferometry (GCI) based WAVEdelta device with a surface sensitivity of 0.01 pg/mm^2 . During a GCI measurement a reference and a sensing laser beam are coupled into a planar optical waveguide through two coupling gratings. The two coupled waves produce an interference signal which is outcoupled from the waveguide using a 3rd grating. The area between the first two gratings represents the sensing area of the sensor. Any refractive index variation (for example, caused by adsorbing biomolecules) at this area shifts the phase of the propagating sensing wave, altering the interference signal. Therefore, by monitoring the interference signal in situ, changes at the sensing region can be followed. Distinct advantages of the technology are i) its very high sensitivity, allowing the detection of small molecules, ii) the 4-channel arrangement making parallel measurements possible and iii) the capability of kinetic measurements. From kinetic analysis, one can determine binding strength and kinetic rate constants for the actual binding event. It is also important to emphasize that the reference channel can be employed to avoid any nonspecific signals.

The SARS-CoV-2 virus became especially important in today's research and development, heavily affecting our everyday life. The virus can cause severe respiratory disease and can be transmitted in the air through liquid droplets. The morphology of the virus is similar to other coronaviruses, its outer surface is covered by the so-called spike proteins (S1 and S2 proteins). By using the S1 protein, the virus can effectively bind to the ACE2 receptors of various human cells. These surface receptors, especially abundant in lung epithelium, are the principal point of entry for the virus.

During my experiments I immobilize spike protein specific antibodies on protein A/G coated sensor chips and record the on-line kinetic of S1 and S2 binding on these surfaces. Using the biosensor data I will determine the kinetic rate constants and affinity of the binding events and compare the properties of the S1 and S2 proteins.

1. Bevezetés

Az idei év egyik legmeghatározóbb eseménye a koronavírus járvány elterjedése, mely minden ember életét jelentősen befolyásolja. A vírus terjedésével egyre szükségsebb volt a SARS-CoV-2 névre keresztelt vírus szaporodási mechanizmusának feltérképezése. Kutatók milliói foglalkoztak azzal, hogy minél jobban megismerhessük ezt a vírust, ezáltal módszereket keresve a fertőzés gyógyítására vagy megelőzésére. Az alapján, hogy hogyan kapcsolódik a vírus a megfertőzött szervezet sejtjeihez potenciális gyógyszereket lehet kifejleszteni, melyek ezt a folyamatot valamiként gátolni tudják.

Az általam végzett mérések motivációja is ezen alapszik, speciális összetételű vegyületeket vizsgáltam jelölésmentes optikai bioszenzorral. Azt vizsgáltam, hogy az adott vegyület alkalmas-e arra, hogy a vírus felszínén lévő fehérjékhez kapcsolódjon ezzel megelőzve azt, hogy a vírus az emberi szervezet sejtjeihez kapcsolódva megfertőzze a szervezetet.

Elmúlt években rohamos fejlődésnek indultak a különböző optikai bioszenzorok fejlesztése melyek legfőbb célja az, hogy minél nagyobb érzékenységgű és minél pontosabban mérő műszerek kerüljenek kifejlesztésre. Az általam elvégzett méréseket a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport Laboratóriumában volt szerencsém elvégezni, egy WAVEdelta nevű műszerrel, amely a nagy érzékenységgű (0.01 pg/mm^2) rács-csatolt interferometria (GCI) módszerrel működik. A GCI elve, hogy egy optikai ráccsal egy olyan vékony hullámvezető rétegbe (ez a mérési felület, itt zajlik a mérés) csatoljuk a fényt melynek nagy a törésmutatója. A fény teljes visszaverődést szenved el emiatt rezonáns erősítés lép fel. Így a mérési felület felett egy speciális tér alakul ki, amelyet evanescens térnek nevezünk. Ennek az evanescens térnek exponenciális lecsengése van távolodva a mérési felülettől.[1] A technika előnye, hogy nagy a műszer érzékenysége így nagyon kis molekulák is detektálhatóak a segítségével, valamint a mérés során négy mikrofluidikai csatorna egyidőben használható, továbbá időben történő változást, azaz kinetikát mér. A kapott kinetikai görbék kiértékelésével a kötés erősségét jellemző kémiai paramétereket számolhatjuk ki.

A SARS-CoV-2 vírus felszínét különböző glikoproteinek alkotják melyek tüske szerű kitüremkedésekbe rendeződnek. Ezek a tüskékre emlékeztető fehérjék (spike proteinek) képesek a humán sejtek ACE2 receptorához kapcsolódni majd ezáltal megfertőzni a sejtet. Az

ACE2 receptor nagyon sok sejtípusban és szövetben megtalálható többek között a tüdőt, szívet, vesét és májat alkotó szövetekben. [a]

Az általam elvégzett mérések során azt vizsgáltam meg, hogy a vírus felszínén található fehérjék és a humán szervezet sejtjeinek ACE2 receptorja között fellépő kölcsönhatás mérésére hogyan alkalmazható a GCI mérési technika. A kutatás során a vírusfehérjék ellen termeltetett antitesteket is alkalmaztam. Kétféle módon lehetséges vizsgálni a korábban említett kölcsönhatást: az antitesteket egy polikarboxilát polimerből (PCP) felépülő bevonatra felvitt protein A/G réteghez rögzítve vagy a vírus S1 fehérjéjét a PCP felületre rögzítve.

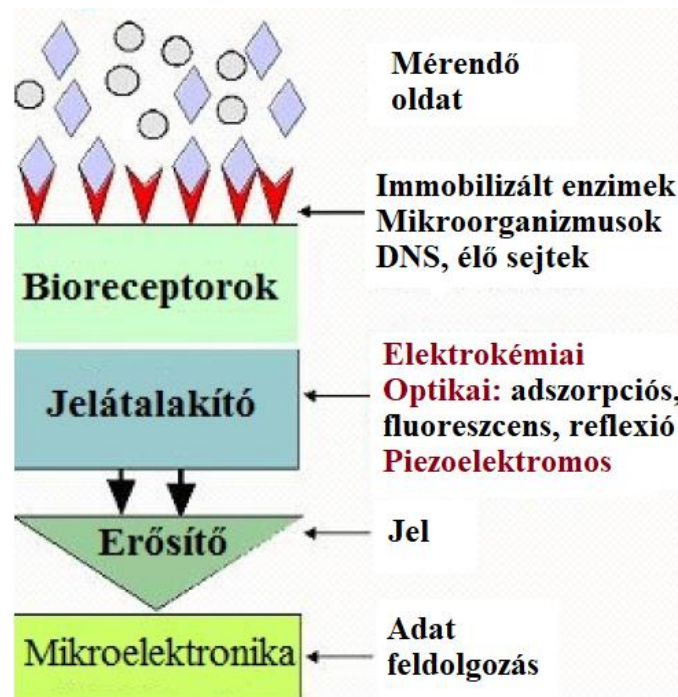
2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 Optikai bioszenzorok

A bioszenzorok három fő részből tevődnek össze, melyek a következők: felismerő egység, jelátalakító, valamint jelfeldolgozó egység. A felismerő egység receptorokból áll, melyek a felülethez kötött fehérjék (pl. antitestek, enzimek) vagy mikroorganizmusok, nukleinsavak, baktériumok vagy sejtek. A receptorok és a mérendő vegyület találkozásakor különböző fizikai és kémiai változások következnek be melyet érzékel és átalakít elektromos jellé a jelátalakító. A jelfeldolgozó egységben történik a kapott jel feldolgozása és kiértékelése.

A bioszenzorokat többféle csoportba sorolhatjuk, attól függően, hogy a jelátviteli módjukra mi jellemző, ez alapján lehetnek: mechanikai, elektrokémiai és optikai.

Az optikai bioszenzorokkal történő mérés során a fény és a vizsgálandó minta kölcsönhatása során a fény valamilyen tulajdonsága megváltozik így tud megvalósulni a jelölésmentes érzékelés. A változó fizikai paraméter lehet a fény intenzitása, polarizációs állapota, a fázissebesség, valamint -jelöléses módszerek esetén- a markerekben indukált fluoreszcencia. [2][3]



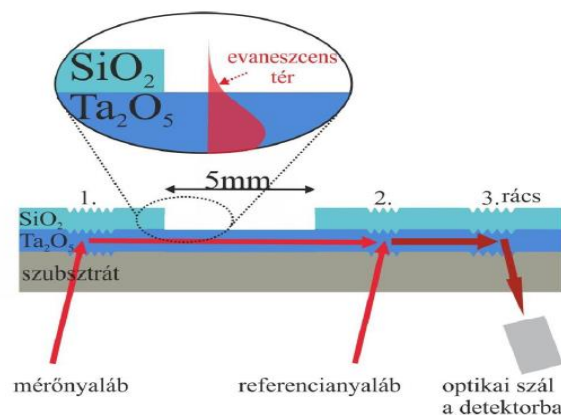
1.ábra

Bioszenzorok általános felépítése [3]

2.1.1 GCI jelölésmentes optikai bioszenzor működési elve

A rendszer egyik fő része egy félvezető lézerforrás, amely fénysugara két párhuzamos sugárra van ketté választva, majd ezek a sugarak egy optikai hullámvezető rétegbe vannak rácsok segítségével bevezetve. A két sugár a mérő sugár és a referencia sugár. A mérő sugár egy LCM rétegen (Liquid Crystal Modulator, folyadékkristály modulátor) van átvezetve, majd ezt követően egy optikai ráccsal történő becsatolással a hullámvezető rétegben halad. A hullámvezető réteg után a fénysugár két szétválasztott nyalábjá ismét egyesül és ez interferenciát okoz. A hullámvezető módus azon tartományát, ahol a tényleges mérés zajlik, evanescens térnek nevezzük. Az evanescens tér az az elektromágneses hullám által kialakított mező, amely a hullámvezető réteg fölött van jelen. Amikor a mérőnyaláb végighalad a hullámvezető rétegben, a sugárnak van a hullámvezető rétegből úgynevezett kilógó, a felületbe belekóstoló része (ezt nevezzük evanescens térnek és ezt figyelhetjük meg a 2. ábrán). Ennek az elektromágneses hullámnak adott intenzitása van, mely a felülettől távolodva exponenciálisan csökkenni fog, ezt a távolságot nevezzük behatolási mélységnek.

Ebben az evanescens térben elhelyezkedő biomolekulák törésmutató-változást idéznek elő, vagyis a fény terjedési sebessége megváltozik. Így a hullámvezetőben terjedő fény fázisa eltolódik. Amikor a hullámvezető rétegben terjedő mérőnyaláb találkozik a referencia nyalábbal a kettő interferál egymással. Ahogy változik a mérőnyaláb fázisa, az interferencia karakterisztikája is változik. Ahhoz, hogy az interferencia karakterisztikát nagyon pontosan lehessen mérni, időben változó jelet kell előállítani, erre szolgál az LCM. A két párhuzamos sugár együtt érkezik a detektorba, ahol fényintenzitást mérünk és ahol az időben változó interferenciát mérhetjük. [1][4][5][6]



2. ábra

A hullámvezető rétegbe bevezetett lézersugár két nyalábjá, valamint a hullámvezető réteg feletti evanescens tér sematikus ábrázolása [1]

2.1.2 GCI jelölésmentes optikai bioszenzor felépítése

A méréseket a Creoptix által gyártott WAVEdelta elnevezésű műszerrel végeztem el.

A műszer felépítését a 3.ábrán láthatjuk. Az egység bal oldala az ún. WAVEcore, amely a mérő egység, a műszer elején látható a hely, ahová a chip-et be kell helyezni. Ez a nyílás látható a 4. ábrán. A jobb oldalon a WAVEsampler (autosampler) látható, mely a minta adagoló rész, valamint a műszerhez tartozik egy program is mellyel valós időben nyomon követhetjük a kísérletünket és kiértékelhetjük a kapott eredményeket.



3.ábra

A WAVEdelta műszer egyes elemei



4.ábra

A chip helye a WAVEcore-on [b]

A mérésekhez használt chip-en (WAVEchip) négy mikrofluidikai csatorna található melyek poli-karboxiláz polimerből (PCP) felépülő felülettel rendelkeznek. Ezen a négy csatornán a mérés során puffereket és különböző oldatokat áramoltatunk. Oldat formában makromolekulákat, különböző reagenseket és sejteket is tudunk a chip felületére juttatni és eltávolítani onnan. Mivel négy csatorna áll rendelkezésünkre, így több párhuzamos mérést is elvégezhetünk, valamint referenciaként is használható egy adott csatorna. Az 5. ábrán egy ilyen WAVEchip-et láthatunk.



5.ábra

Poli-karboxiláz polimer (PCP) felületű WAVEchip, amely négy mikrofluidikai csatornával rendelkezik [b]

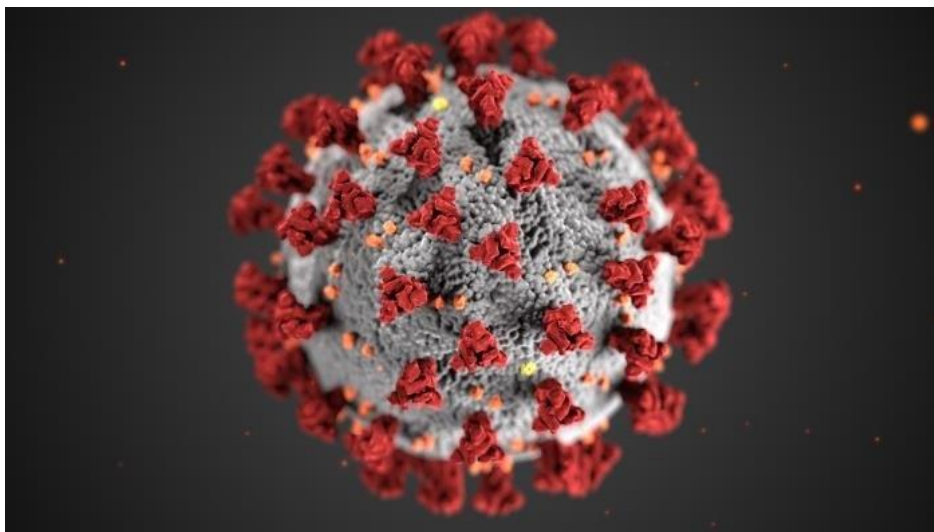
2.2 Koronavírusok általános jellemzése

A koronavírusokat először az 1960-as években azonosították elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével. Nevük is innen ered, mert a virion felületét tüske-szerű képződmények, glikoprotein nyúlványok borítják melyek koszorúhoz hasonlítanak (corona: koszorú latinul). Már korábban nyilvánvalóvá vált, hogy a koronavírusok közé tartozó vírusok meglehetősen gyakoriak, többnyire légző és emésztőszervi megbetegedést okoznak állatokban és emberekben is egyaránt. [7]

Azok a koronavírusok, melyek képesek a gerinceseket megfertőzni rendszertanilag a *Riboviria* birodalom, *Nidovirales* rend, *Coronaviridae* családjába, azon belül az *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- és *Gammacoronavirus* nemzetségekbe tartoznak. Eddig az *Alpha*- és *Betacoronavirus* nemzetségbe sorolható vírusok közül kerültek ki azon vírusok, melyek képesek a humán szervezetet is megfertőzni.[7][8]

2.2.1 A vírus felépítése

A jelenleg ismert legnagyobb burkos RNS-vírusok a koronavírusok. A virion 120-160 nm átmérőjű és általában gömb alakú. Genomjukra jellemző, hogy szimplaszálú és pozitív irányultságú RNS. A 6.ábrán egy illusztrációt láthatunk arról, hogy hogyan is nézhet ki egy ilyen vírus.



6.ábra

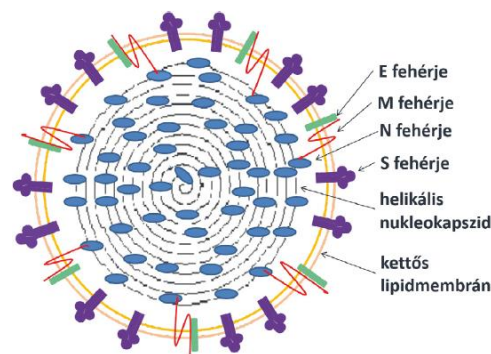
Illusztráció mely bemutatja a vírus felszínén található tüske-szerű morfológiát [c]

A vírus szerkezetét különböző fehérjék határozzák meg melyek a következők: burok (envelope, E), membrán (M), nukleokapszid (N) és tüske (spike, S) fehérjék. Ezek elhelyezkedése látható a 7. ábrán. Az E proteinek a burokban található transzmembrán fehérjék, mennyisége jóval kisebb, mint az M és az S fehérjéké ennek ellenére fontos szerepet tölt be a virion összeépülésében, valamint a sejtől való kijutásban.[7] Az M proteinek is a burokban találhatóak, ez a fehérje stabilizálja a vírus alakját és az N proteineket rögzíti a virion belsejében.[7][9]

Az N proteineknek erős az RNS affinitása, a vírusgenom megkötésében és az M protein segítségével a virionban való RNS-genom rögzítésében van szerepe. [7]

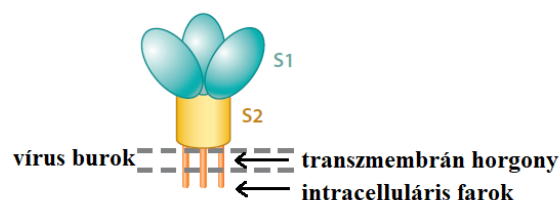
A méréseim szempontjából a vírus legfontosabb fehérjéje az S protein. Ez a protein egy membrán-glikoprotein mely a vírus felszínén jelenik meg. A koronavírusok ezzel az S fehérjével tudnak a sejtek receptoraihoz kapcsolódni majd bejutni a sejtbe. [10]

Az S protein szerkezetére jellemző, hogy egy S1 elnevezésű receptor-kötő és egy S2 elnevezésű membrán-fúziós részből épül fel.[11] Az S1 részre egyes szakirodalmak RBD-ként (receptor-bindig domain) hivatkoznak.[10] A 8.ábrán látható az S protein felépítése.



7.ábra

A vírus szerkezete [7]



8.ábra

Koronavírus tüskéinek sematikus ábrázolása (Fang Li publikációja alapján készült) [11]

3. Célkitűzés

Méréseim célja az volt, hogy megfigyeljem, hogy a vírus felszínén található fehérjék és ezekre specifikus receptorok között fellépő kölcsönhatást tudjuk-e hatékonyan és jól reprodukálhatóan vizsgálni a GCI technikával.

A mérések egy polikarboxilát polimer (PCP) felülettel rendelkező WAVEchip-en zajlottak. Először egy PCP bevonatra felvitt protein A/G réteghez rögzítettünk antitesteket. A protein A/G réteg és az antitest között létrejövő kötések nem kovalensek viszont ez a felület megfelelő orientációval köti meg az antitesteket. Különböző koncentrációban S típusú vírus fehérjéket áramoltattunk a mikrofluidikai csatornában és azt figyeltük, hogy mekkora mértékű lesz a kitapadásuk. Szakirodalom szerint a vírus S fehérjéje két részből áll, S1 és S2, melyek közül csak az S1 fehérje képes az antitesthez kapcsolódni. Méréseim során, mint validációs mérés, elvégeztem ezt a kísérletet az S2 fehérjével is, mely alapján megállapítható az, hogy az S2 valóban nem képes-e vagy sem az antitesthez kötődni.

Másodszor pedig a PCP felülethez S1 vírus fehérjét rögzítettünk kovalensen majd speciális antitesteket tartalmazó vegyületet áramoltattunk különböző koncentrációkban a mikrofluidikai csatornában és azt figyeltük, hogy van-e kitapadás a felületen.

A chip melyeket használtam a mérés során, négy mikrofluidikai csatornával van ellátva, ezek közül egy csatorna mindig referencia csatornaként funkcionált, a többi három csatornán pedig akár több párhuzamos mérés elvégzésére is volt lehetőségem.

A méréseim további céljai, hogy a gyógyszerkutatás és fejlesztés területén alkalmazható, jól reprodukálható és pontos legyen az általam elvégzett eljárás.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált anyagok

- Rekombináns anti-SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 antitest (ab273073) [d]
- Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S2 (ab272106) [e]
- Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 (ab273068) [f]
- Speciális fúziós fehérje (ismeretlen összetétel, lehetséges gyógyszer)
- Foszfátpuffer (PBS) tableta, pH= 7,4
- Dimetil-szulfoxid (DMSO)
- Borát puffer, pH=9
- Foszforsav (H_3PO_4)– Tween20,
- Glicin
- Szarvasmarha szérum albumin (BSA)
- Milli-Q víz (ultratiszta víz, 18,2 M Ω ·cm ellenállású 25°C-on)

4.2 Mérési módszer

A mérés különböző felületű WAVEchip-en zajlik, ezek felületének sematikus ábrája látható a 9.ábrán. A chip felületén különböző oldatok folyamatos áramoltatása zajlik. Az oldatok a WAVEsampler segítségével jutnak a chip felszínére.

PCP



PCP-PAG



9.ábra

Polikarboxilát-polimer(PCP) felületű és Protein A/G réteggel bevont PCP WAVEchip sematikus ábrája [b]

A mérést a WAVEcontrol elnevezésű programmal tudjuk nyomon követni. A mérés paraméterei, mint például a használni kívánt csatornák, az áramlási sebesség és injektálási idő ebben a programban kerülnek beállításra. A mérés több nagyobb egységből épül fel, ezeket szériáknak nevezzük. A különböző szériák pedig több, kisebb ciklusból épülnek fel. A használni kívánt oldatot a WAVEsampler mintatartó részébe helyezzük be, innen fogja a chip-re injektálni a megadott pozícióban lévő mintát, ezek a pozíciók opcionálisan változtathatóak.

4.3 Mérések menete

Először S protein antitestet immobilizáltam a protein A/G felületre majd ezen az ab272106 és ab273068 rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoproteinjeit áramoltattam.

Ezt követően az ab273068 rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) S1 glikoproteint immobilizáltam PCP felületre majd ezt követően antitest szuszpenziót és egy speciális fúziós fehérje szuszpenziót áramoltattam felette.

Részletesebben az első megközelítést szeretném bemutatni. Az immobilizált S1 fehérjén való vizsgálatok egy olyan projekt részét képezték, melynél titoktartási megállapodás áll fenn, ezért arról részletes információkat nem mutathatok be.

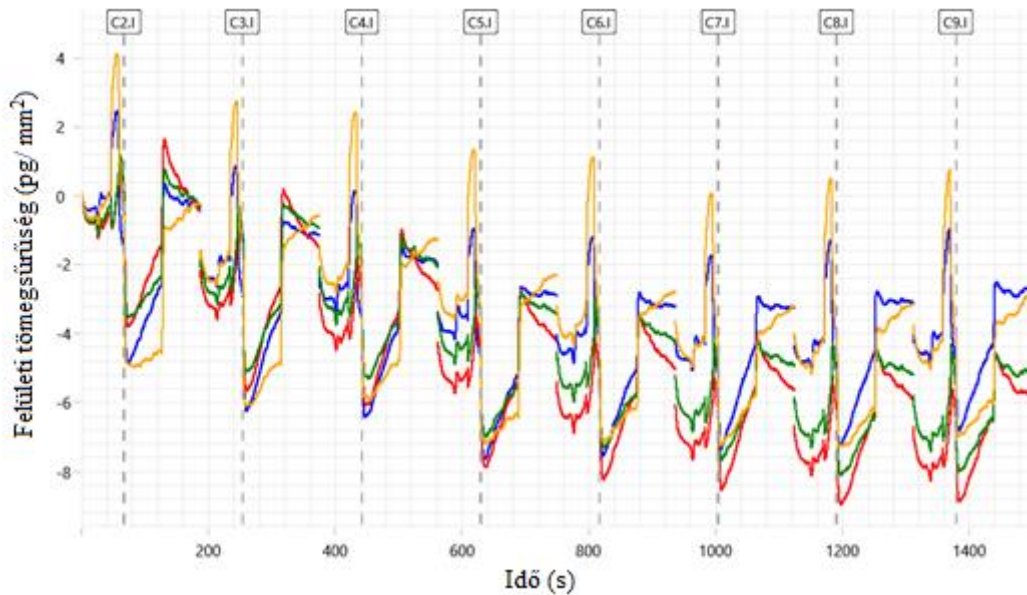
4.3.1 Stabilizáció

Amikor új chip kerül behelyezésre, szükséges egy kondicionálást elvégezni rajta (Conditioning). Ezt a folyamatot 9-es pH-s borát puffer áramoltatásával végezzük el annak érdekében, hogy a chip felszínén lévő láncok aktivált formába kerüljenek.

Ezt követi a stabilizáció (stabilization) mely során célunk az, hogy beállításra kerüljön az alapvonal. A stabilizáció során PBS puffert áramoltatunk mind a négy csatorna felületén. A stabilizációs széria több kisebb ciklusból áll melyeket startup-oknak nevezünk. A program segítségével beállíthatjuk ezeknek a startup-oknak az injektálási idejét, a disszociációs idejét, valamint az áramoltatási sebességet.

A mérésem során az injektálási idő és a disszociációs idő 60 másodperc volt az áramoltatási sebesség pedig 10 μ l/ perc.

A 10. ábrán látható egy stabilizációs széria mérési görbéje.



10.ábra

*A felületi tömegsűrűség a stabilizáció során mind a négy csatornán
(1. csatorna-kék, 2. csatorna-piros, 3. csatorna-zöld, 4. csatorna-sárga)*

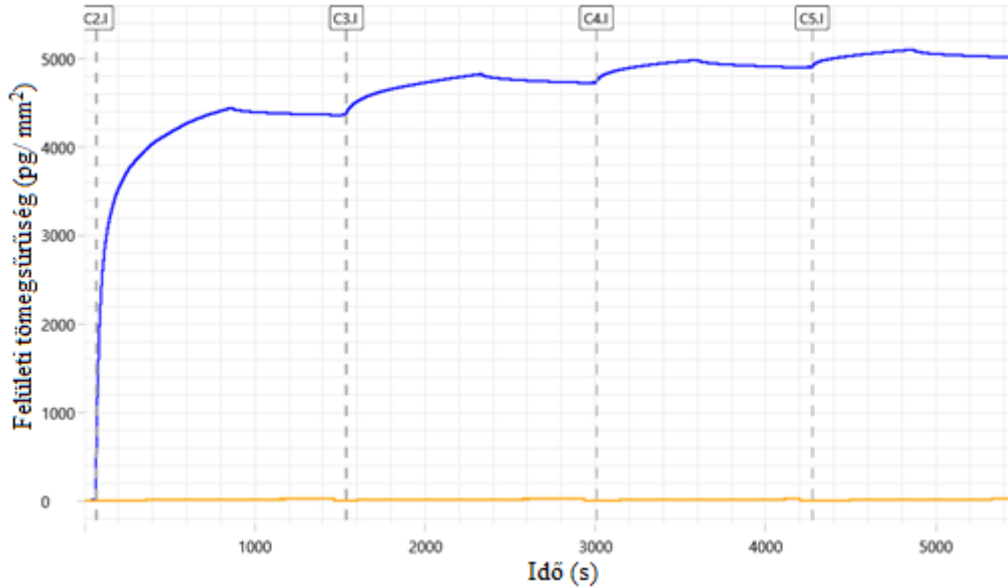
4.3.2 Immobilizáció

Az immobilizáció (immobilization) során az ab273073 nevű rekombináns anti-SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 antitestet kötjük a PCP-PAG chip felületére.

Az immobilizációs széria során négy ciklusban áramoltattuk a felület felett az antitesteket majd ezt követően egy puffer áramoltatással (startup-al) zártuk a szériát.

Az antitestek áramoltatása során az injektálási idő az első két esetben 800 másodperc volt, a disszociációs idő 600 másodperc volt, a harmadik és negyedik áramoltatás során az injektálási idő és a disszociációs idő is 600 másodperc volt. Az áramoltatási sebesség 5 μl /perc.

Első alkalommal csak az 1.csatornára immobilizáltunk antitestet. A 11. ábrán látható az immobilizáció görbéje, melyről leolvasható, hogy összességében a négy ciklus alatt ~ 5000 pg/mm^2 lett a felületen az antitestek tömegsűrűsége.



11.ábra

Az ab273073-as S1 antitest első immobilizációja az 1.csatornára, négy ciklusban mely végeredménye ~ 5000 pg/mm² felületi borítottság

4.3.3 Kinetika

A kinetikai széria és az immobilizáció között egy stabilizációs széria is lefutott, ahol puffer (PBS) áramoltatás történt. Azért, hogy stabilizálja a felszínt és a rá került antitesteket. Az immobilizált antitestek, valamint az S2 fehérje között létrejövő kölcsönhatások vizsgálatára szolgál a kinetikai széria (kinetics).

A kinetikai széria ciklusai az alábbiak szerint alakulnak:

- 20 startup (puffer áramoltatás)
- Minta oldat különböző koncentrációkban, minden harmadik mintát egy vakminta (blank) követ. Az 1. táblázatban látható, hogy melyik mérés során milyen koncentráció tartományban készítettük el a mérendő oldatokat. (3× hígítás)
- DMSO kalibráció: törésmutató kalibráció

Az általam vizsgált S proteinek pufferei, vakmintái és koncentráció tartományai

Vizsgált minta	Puffer	Vakminta	Koncentráció tartomány
ab272106	PBS	PBS	0,83 nM – 43 fM
ab272106	PBS, 0,1% BSA	PBS, 0,1% BSA	100 nM – 45,725 pM
ab273068	PBS, 0,1% BSA	PBS, 0,1% BSA	100nM – 15,24 pM
ab273068	PBS, 0,1% BSA	PBS, 0,1% BSA	1 μM – 152,416 pM

1.táblázat

A különböző mérések során változtatott paramétereket az alábbi (2. táblázat) foglalja össze.

Az elvégzett mérések során változó paramétereket összefoglaló táblázat

			1.mérés	2.mérés	3.mérés	4.mérés
Minta			ab272106 S protein	ab272106 S protein	ab273068 S protein	ab273068 S protein
Puffer			PBS	PBS 0,1% BSA	PBS 0,1% BSA	PBS 0,1% BSA
Immobilizáció			ab273073 Anti S1 antitest	ab273073 Anti S1 antitest	ab273073 Anti S1 antitest	ab273073 Anti S1 antitest
Kinetikai paraméterek	Injektálási idő (s)	Minta	60	200	200	180
		Vak minta	60	200	200	180
		DMSO kal.	60	200	60	60
	Disszociációs idő (s)	Minta	60	600	600	700
		Vak minta	60	600	600	700
		DMSO kal	60	600	60	60

	Áramoltatási sebesség (μl / perc)	Minta	30	55	55	30
		Vak minta	30	55	55	30
		DMSO kal.	30	55	30	30
Felszín stabilizálása a kinetikai mérés előtt			PBS	PBS 0,1% BSA	PBS 0,1% BSA	PBS 0,1% BSA
Regeneráció			H ₃ PO ₄ – Tween20	H ₃ PO ₄ – Tween20	H ₃ PO ₄ – Tween20	H ₃ PO ₄ – Tween20, glicin

2.táblázat

4.3.4 Regeneráció

A kinetikai széria utána egy regenerációs széria következik. Mivel a PCP protein A/G rétege nem képes kovalensen megkötni az antitesteket ezért egy regenerációs ciklus során ezek eltávolíthatók a felületről. A regenerálást foszforsav és Tween20 keverékének áramoltatásával érjük el.

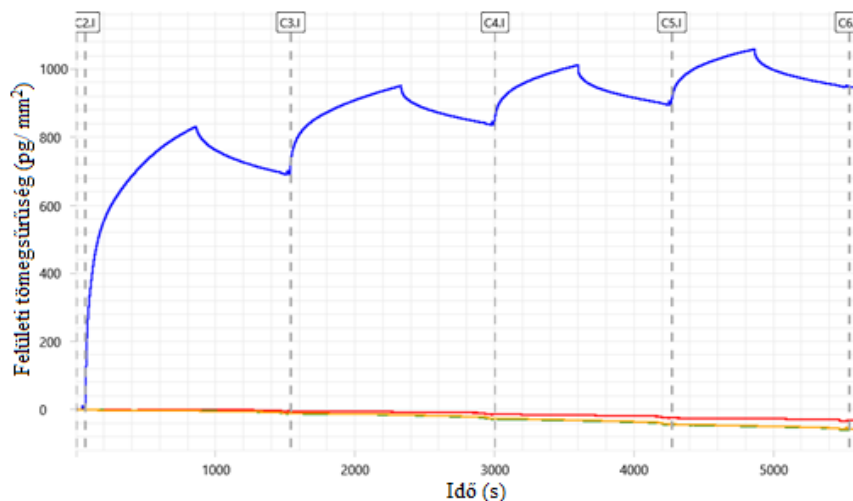
5. Eredmények

5.1 Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S2 (ab272106) vizsgálata

A mérések során történt pár paraméterbeli változás, amely a 2. táblázatban látható. Ezek a mérések a rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S2-vel (ab272106) az 1.-es csatornán történtek.

Az első immobilizáció során összességében a négy ciklus alatt ~ 5000 pg/mm² lett a felületen az antitestek tömegsűrűsége. (11. ábra)

Az első mérés során elvégzett regenerációt követően ismér immobilizáltuk az 1.csatornára az ab273073 antitestet, viszont ebben az esetben csak ~ 1000 pg/mm² felületi borítottságot tudtunk elérni. Ez látható a 12. ábrán.

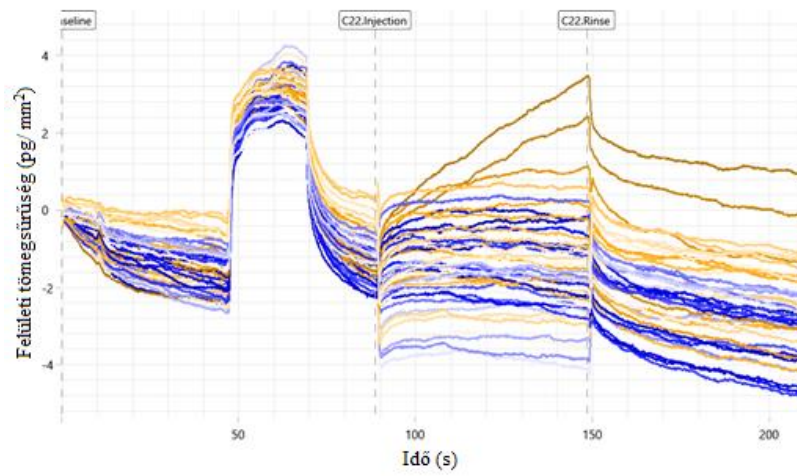


12.ábra

Az ab273073-as S1 antitest második immobilizációja az 1.csatornára, négy ciklusban mely végeredménye ~ 1000 pg/mm² felületi borítottság

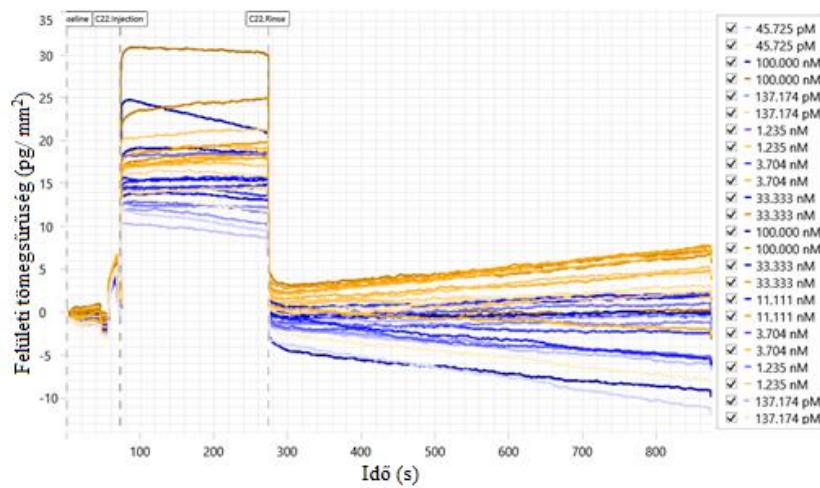
Ha megvizsgáljuk a kapott kinetikai görbéket láthatjuk, hogy mindkét esetben a 4.-es csatornán (sárga) amely a referencia csatorna volt, nagyobb jelet kaptunk, mint az 1.-es csatornán (kék) ahol immobilizálva volt az antitest (ab273072). A 13. és 14. ábrán láthatjuk. Ebből arra következtethetünk, hogy a rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S2 (ab272106) nem kötődik az S1 antitestekhez. Ezt a mérést betudhatjuk

validációs mérésnek, mely során kiderült, hogy az S1 antitest nem tud kötést kialakítani az S protein S2 részével.



13.ábra

Az ab272106 S protein kinetikai görbéje az első mérés során



14.ábra

Az ab272106 S protein kinetikai görbéje a második mérés során

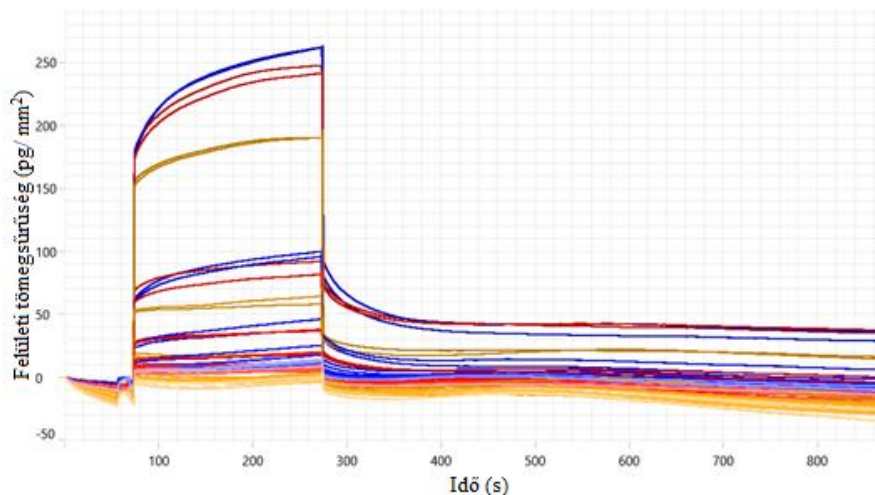
5.2 Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 (ab273068) vizsgálata

A mérések során történt pár paraméterbeli változás, amely a 2. táblázatban látható. Ezek a mérések a rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1-el (ab273068) történtek.

Újabb immobilizációt hajtunk végre, de ebben az esetben az 1. és a 2. csatornát is igénybe vesszük melyeken ~ 700 pg/mm² felületi borítottságot tudunk elérni.

Amennyiben értékelhető jelet kapunk, vagyis ha az 1. és 2. csatornán nagyobb a jel mint a referencia csatornán akkor a WAVEcontrol program segítségével kiértékelhetjük a kapott eredményeket. A kiértékelés során a program a referencia csatorna jelével és a DMSO kalibrációval korrigálja a kapott görbéket és különböző kinetikai paramétereket számol mint például a disszociációs állandó.

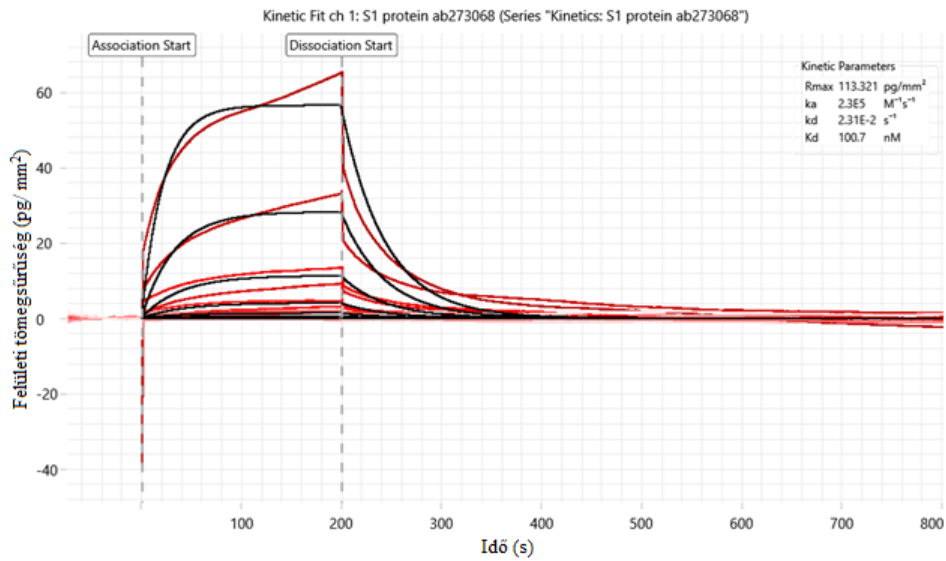
A harmadik elvégzett mérés során a kapott kinetikai görbékről megállapíthatjuk, hogy mind az 1. és 2. csatornán is nagyobb a jel mint a referencia csatornán, tehát ebből arra következtethetünk, hogy kitapadt az ab273068 S protein a felületre. (15. ábra)



15.ábra

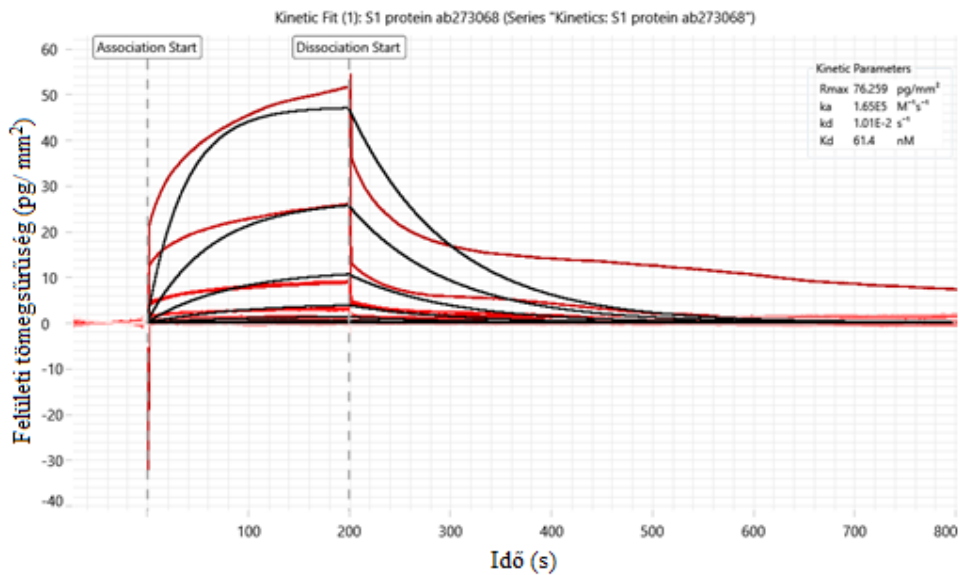
Az ab273068 S protein kinetikai görbéje az 1. és 2. csatornán (1. csatorna-kék, 2. csatorna-piros, 4. csatorna-sárga)

A WAVEcontrol program kiértékelő részének segítségével az alábbi ábrákat kaptam.(16. és 17. ábrák)



16.ábra

Kinamikai illesztés a Kinetic 1:1 modellt alkalmazva különböző ab273089 S1 protein oldatok korrigált felületi tömegsűrűség-idő mérési görbére (az 1-es csatornán a 4-es referenciacsatornával korrigálva)



17.ábra

Kinamikai illesztés a Kinetic 1:1 modellt alkalmazva különböző ab273089 S1 protein oldatok korrigált felületi tömegsűrűség-idő mérési görbére (az 2.-es csatornán a 4-es referenciacsatornával korrigálva)

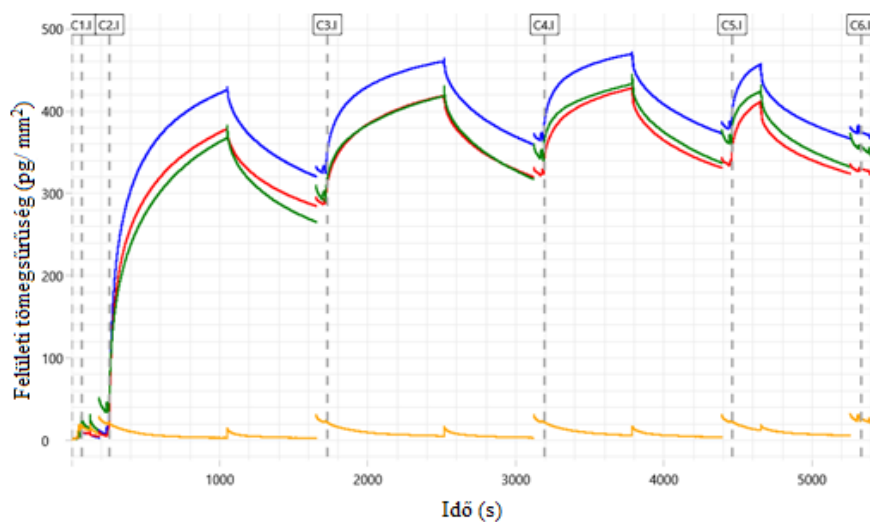
A két csatornán a program a referencia (4-es csatorna) jelével és a DMSO kailbrációval korrigálta a kapott jelet. Az így kapott görbékre illesztéssel valamint különböző szimulációkkal disszociációs állandókat kaptunk.

Az 1.-es csatornán: K_d értékére 100,7 nM-t kaptunk, amíg a 2-es csatornánál 61,4 nM.

Mivel egyértelműen van kölcsönhatás az S1 protein és a felületre kötött antitestek között ezért megismételtük ezt a mérést, csak ez esetben nagyobb kezdeti koncentrációról indultunk.

Ismét az ab273073 antitestet immobilizáljuk a chip felszínére, ebben az esetben az 1., 2. és a 3. csatorna is használatban volt. A 4. csatornát referencia csatornaként alkalmaztuk.

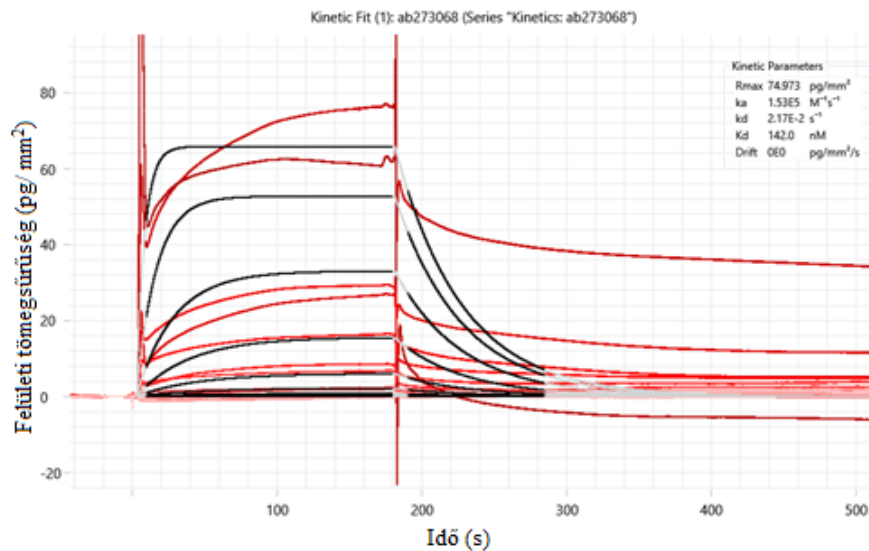
Ez volt az első alkalom, hogy a 3-as csatornára is immobilizáltunk antitesteket, viszont a várakozásainkkal ellenben erre a csatornára sem immobilizálódott több antitest mint a korábban már használt 1. és 2. csatornákra. Ezt megfigyelhetjük a 18. ábrán.



18.ábra

Az ab273073-as S1 antitest negyedik immobilizációja az 1.,2. és 3.csatornára, négy ciklusban mely végeredménye ~300-400 pg/mm² felületi borítottság

A negyedik mérés az előző reprodukciója volt, ezért a 3. csatornát vizsgáltam meg, hiszen ez volt az újonnan immobilizált csatorna. (19. ábra)



19.ábra

Kinetikai illesztés a Kinetic 1:1 modellt alkalmazva különböző ab273089 S1 protein oldatok korigált felületi tömegsűrűség-idő mérési görbére (az 3-as csatornán a 4-es referenciacsatornával korigálva)

Az illesztés alapján a K_d értéke 142 nM, ami az előzőekhez hasonlóan elfogadható tartományba esett.

5.3 Rekombináns humán koronavírus SARS-CoV-2 tüske (spike) glikoprotein S1 (ab273068) immobilizációja

A cél az volt, hogy kiderítsük lehetséges-e az S1 protein immobilizációjával megvalósítani azt, hogy antitesteket detektáljunk. PCP réteghez kovalensen kötöttük az ab273068 S proteint és antitest szuszpenziót, valamint speciális összetételű szuszpenziót áramoltattunk felette. Viszont a mérés során nem volt kitapadás tapasztalható, tehát ebben a formában nem alkalmazható ez az eljárás. Ennek valószínűsíthetően az az oka, hogy az S1 fehérje amikor a PCP felülethez kovalensen köt, olyan konformáció változáson esik át mely során elveszíti azt a képességét, hogy az antitest kötődni tudjon hozzá.

6. Összefoglalás

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a GCI technika alkalmazható arra, hogy megállapítsuk az adott antitesthez képes-e kötődni a vírus felszínét alkotó fehérjék valamelyike. A GCI jelölésmentes optikai bioszenzoros technika kiválóan alkalmazható vírus fehérjéinek vizsgálatára hiszen érzékenysége nagy (0.01 pg/mm^2). A műszer egy program által vezérelt ezért könnyen automatizálható, valamint nyomon követhető a kísérlet.

A mérőfelületként szolgáló WAVEchip négy mikrofluidikai csatornával van ellátva így ezzel lehetővé teszi azt, hogy több párhuzamos mérést végezzünk el, valamint referencia csatorna alkalmazására is lehetőségünk van.

Az egyes mérések során mindig valamilyen paraméter változtatásra került, hogy megtaláljuk a legmegfelelőbb körülményeket ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk milyen mértékű az S1 és S2 proteinek kitapadása. Várakozásaink szerint beigazolódott az, hogy az S2 protein nem tud kötést létrehozni az immobilizált antitesttel. A kísérletet megismételve bizonyossá vált a feltevésünk s ez bebizonyította azt, hogy a GCI technika alkalmazható az S proteinek vizsgálatára. Ez a mérés felfogható egyfajta validációs mérésnek is.

Továbbiak során az S1 proteinnel végeztük el a kísérletünket, melyből egyértelműen kijelenthető, hogy az S1 protein kitapadt az immobilizált antitestre.

A rekombináns anti-SARS-CoV-2 spike glikoprotein S1 antitest (ab273073) egy specifikus antitest melyhez való kötődés alapján megállapítható, hogy a vizsgált mintában található-e S1 fehérje. Mérések alapján láthattuk, hogy az S2 fehérjére sem ad specifikus jelet. Tehát bizonyosan megmondható, hogy a vizsgált minta tartalmaz-e (S1) vírus fehérjét vagy sem.

Mivel a műszer kis minta igényű a továbbiakban ez a módszer lehetővé is tehetné azt, hogy akár pár csepp vérből megállapítható legyen, hogy az fertőzött-e koronavírussal.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Gerecsei Tamásnak és Dr. Horváth Róbertnek a sok segítségért, tanácsért és útmutatásért. Köszönöm Dr. Horváth Róbertnek, a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport vezetőjének azért, hogy lehetőséget kaphattam megismerkedni az optikai bioszenzoros technikákkal, valamint köszönöm a lehetőséget, hogy megismerhettem a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport tagjait, akik türelmesen és segítőkészen bármilyen felmerülő kérdésben segítségemre voltak.

Valamint szeretném megköszönni a sok segítséget és türelmet konzulensemnek, Dr. Bonyár Attilának.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Tóth Kingának a segítőkészségéért és támogatásáért.

Felhasznált irodalom

- [1]. Dániel Patkó: Nagyérzékenységű jelölésmentes bioszenzorika: optikai, mikrofluidikai fejlesztések a fehérjék, baktériumok és extracelluláris vezikulák felületi kitapadásainak detektálásához, Doktori Értekezés, 2015.
- [2]. Horváth Róbert: Optikai Hullámvezető szenzorok Biofizikai Alkalmazásai, ELTE Doktori Értekezés, 2001.
- [3]. Kovács Noémi: Fehérjeadszorpció jelölésmentes és valós idejű monitorozása optikai bioszenzorral, Diplomamunka, 2011.
- [4]. Daniel Patko, Kaspar Cottier, Andras Hamori, Robert Horvath: Single beam grating coupled interferometry: high resolution miniaturized label-free sensor for plate based parallel screening. In: Optics Express, 2012, Vol. 20, No. 21, p. 23162-23173,
- [5]. Peter Kozma, András Hámori, Sándor Kurunczi, Kaspar Cottier, Róbert Horváth: Grating coupled optical waveguide interferometer for label-free biosensing. In: Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 155 (2), p. 466-450.
- [6]. Peter Kozma, András Hámori, Kaspar Cottier, Sándor Kurunczi, and Róbert Horváth: Grating coupled interferometry for optical sensing. In: Applied Physics B, 2009, vol 97, p. 5-8
- [7]. Balka Gyula, Bálint Ádám, Cságola Attila, Farsang Attila, Kiss István, Zádori Zoltán: A coronavirusok biológiája, különös tekintettel a SARS-CoV-2-re és a COVID-19-re. In: Magyar állatorvosok lapja, 2020, 142. p. 259-277.
- [8]. E. R. Gaunt , A Hardie, E. C. J. Claas, P Simmonds, K. E. Templeton: Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. In: Journal of Clinical Microbiology, 2010, Aug, p. 2940-2947
- [9]. E. J. Snijder, E. Decroly, J. Ziebuhr: The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. In: Advances in virus research, 2016, 96. p. 59-126
- [10]. Jinsung Yang, Simon J. L. Petitjean, Melanie Koehler, Qingrong Zhang, Andra C. Dumitru, Wenzhang Chen, Sylvie Derclaye, Stéphane P. Vincent, Patrice Soumillion & David Alsteens: Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. In: Nature Communications, 2020, vol 11, Article number: 4541
- [11]. Fang Li: Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. In: Annu. Rev. Virol. 2016. 3:237–61

Internetes hivatkozások:

- [a]. Krishna Sriram, Paul Insel, and Rohit Loomba: What is the ACE2 receptor, how is it connected to coronavirus and why might it be key to treating COVID-19? The experts explain. [Online] The Conversation, 2020, <https://theconversation.com/what-is-the-ace2-receptor-how-is-it-connected-to-coronavirus-and-why-might-it-be-key-to-treating-covid-19-the-experts-explain-136928> [2020.10.16]
- [b]. www.creoptix.com [2020.10.16]
- [c]. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23311> [2020.10.17]
- [d]. <https://www.abcam.com/sars-cov-2-spike-glycoprotein-s1-antibody-cr3022-ab273073.html> [2020.10.22]
- [e]. <https://www.abcam.com/recombinant-human-coronavirus-sars-cov-2-spike-glycoprotein-s2-fc-chimera-ab272106.html> [2020.10.22]
- [f]. <https://www.abcam.com/recombinant-human-coronavirus-sars-cov-2-spike-glycoprotein-s1-active-ab273068.html> [2020.10.22]