

ELEKTROGRAWIMETRYCZNA DETEKcja METALOPROTEINAZY – 2 I JEJ AKTYWNEJ FORMY W OPARCIU O ENZYMATYCZNE CIĘCIE PEPTYDU ZNAKOWANEGO PRÓBNIKIEM REDOKS

Aleksandra Gajda

Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod

Promotor: prof. dr hab. Anna M. Nowicka

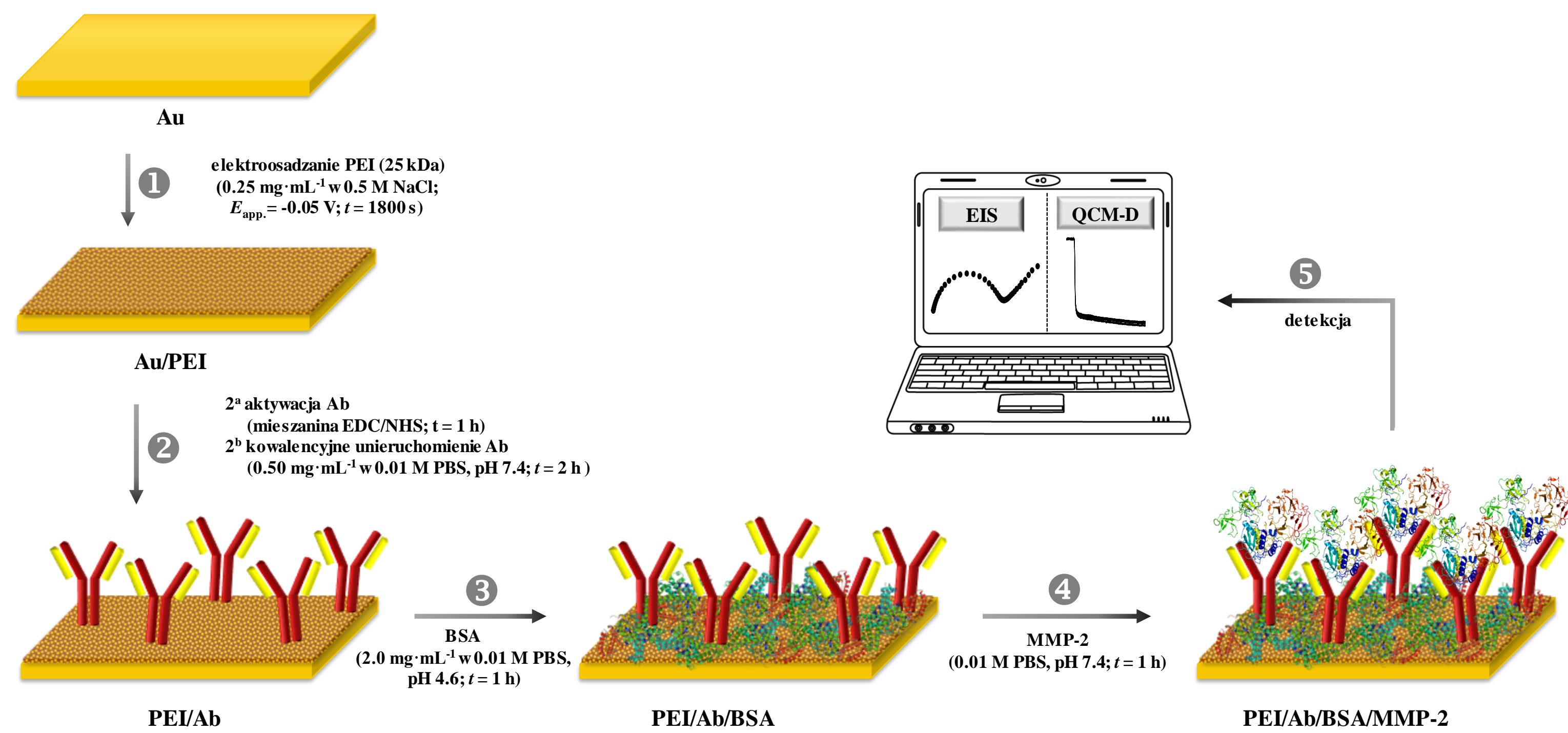
Opiekun: mgr inż. Monika K. Nisiewicz

WSTĘP I CEL PRACY

Metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMP) są to enzymy proteolityczne wchodzące w skład wielodomenowych cynkowych endopeptydaz. Ich funkcją jest między innymi degradacja białek macierzy pozakomórkowej. Ostatnie badania pokazują, że ekspresja MMP w tkankach nowotworowych jest wyższa niż w tkankach normalnych. MMP ułatwiają powstawanie przerzutów poprzez degradację błony podstawnej oraz składników macierzy pozakomórkowej. MMP-2 należy do grupy żelatynaz, degraduje kolagen typu IV oraz uczestniczy w regulacji procesu angiogenezy, która determinuje rozwój nowotworu. MMP-2 jest biomarkerem raka płuca.

Celem pracy magisterskiej było opracowanie procedury oznaczania różnych form metaloproteiny-2. MMP-2 jak i pozostałe metaloproteiny syntetyzowana jest w organizmie w postaci nieaktywnej zwanej formą proaktywną. Aktywacja MMP odbywa się przez usunięcie prodromy, w wyniku czego następuje odsłonięcie miejsca aktywnego enzymu, czyli cynku katalitycznego.

KONSTRUKCJA IMMUNOSENSORA DO OZNACZANIA CAŁKOWITEGO STĘŻENIA MMP-2



W celu unieruchomienia przeciwciała wprowadzono warstwę pośredniczącą, kationowy polimer polietylenoiminy (PEI). Modyfikację powierzchni elektrody filmem PEI przeprowadzono poprzez przyłożenie niewielkiego, ujemnego potencjału. Następnie powstałą warstwę stabilizowano w buforze PBS. Przeciwciała aktywowano przez godzinę w mieszaninie EDC/NHS. Kroplę zaktywowanego przeciwciała nałożono na powierzchnię elektrody i pozostawiono na 2 h pod przykryciem w temperaturze 4 °C. Niezajętą przez przeciwciała powierzchnię PEI zablokowano za pomocą surowicy albuminy wołowej (BSA). Immunosensor poddano oddziaływaniu z metaloproteinazą-2. Jako techniki detekcji zastosowano mikrowagę kwarcową z dyssypacją energii (QCM-D) oraz elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS).

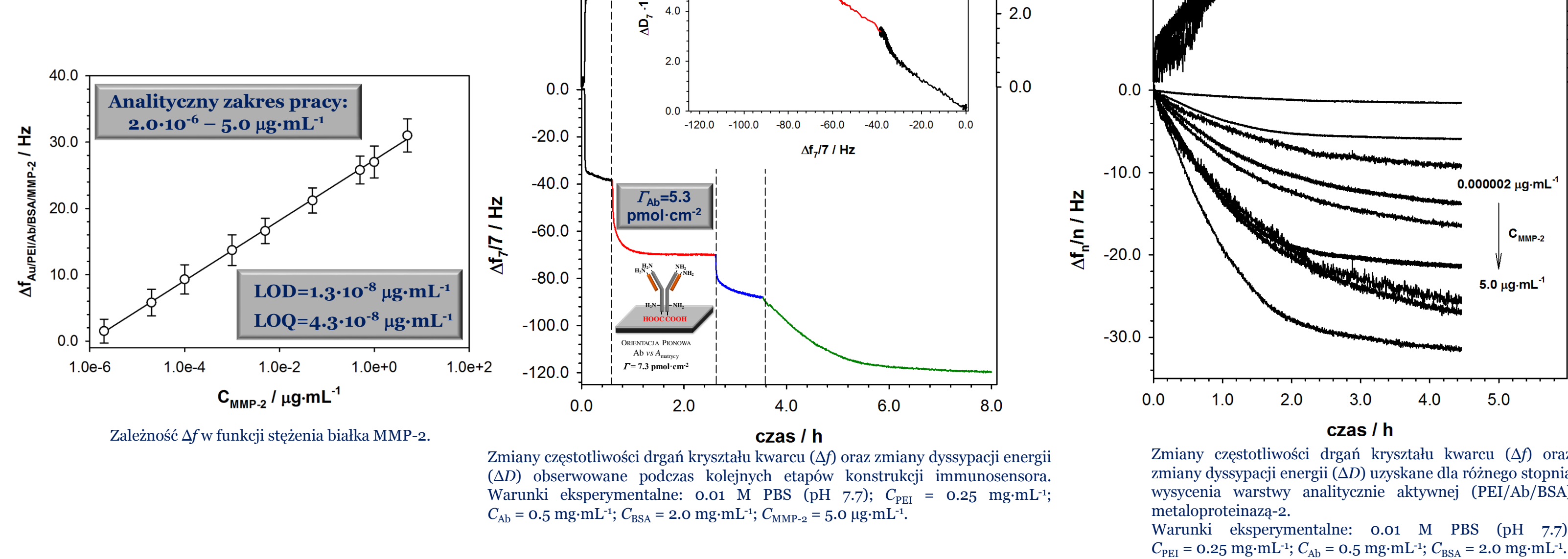
CHARAKTERYSTYKA ANALITYCZNA IMMUNOSENSORA DO OZNACZANIA CAŁKOWITEGO STĘŻENIA MMP-2

ANALIZA QCM-D

Badania wykonane przy użyciu mikrowagi kwarcowej dostarczyły informacji na temat morfologii poszczególnych warstw. Obserwowane zmiany wartości Δf oraz ΔD podczas kolejnych etapów jego modyfikacji świadczą o tworzeniu kolejnych warstw immunosensora. Na podstawie zmian dyssypacji energii względem częstotliwości można zauważyć, że każda warstwa była monowarstwą, o czym świadczy tylko jeden zakres liniowości. Dla trzech pierwszych zależności nachylenia są takie same, co pokazuje, że w każdej warstwie cząsteczki miały identyczną orientację. Zmiana następuje w ostatnim etapie, ponieważ wówczas zmienia się kąt nachylenia przeciwciała względem powierzchni elektrody.

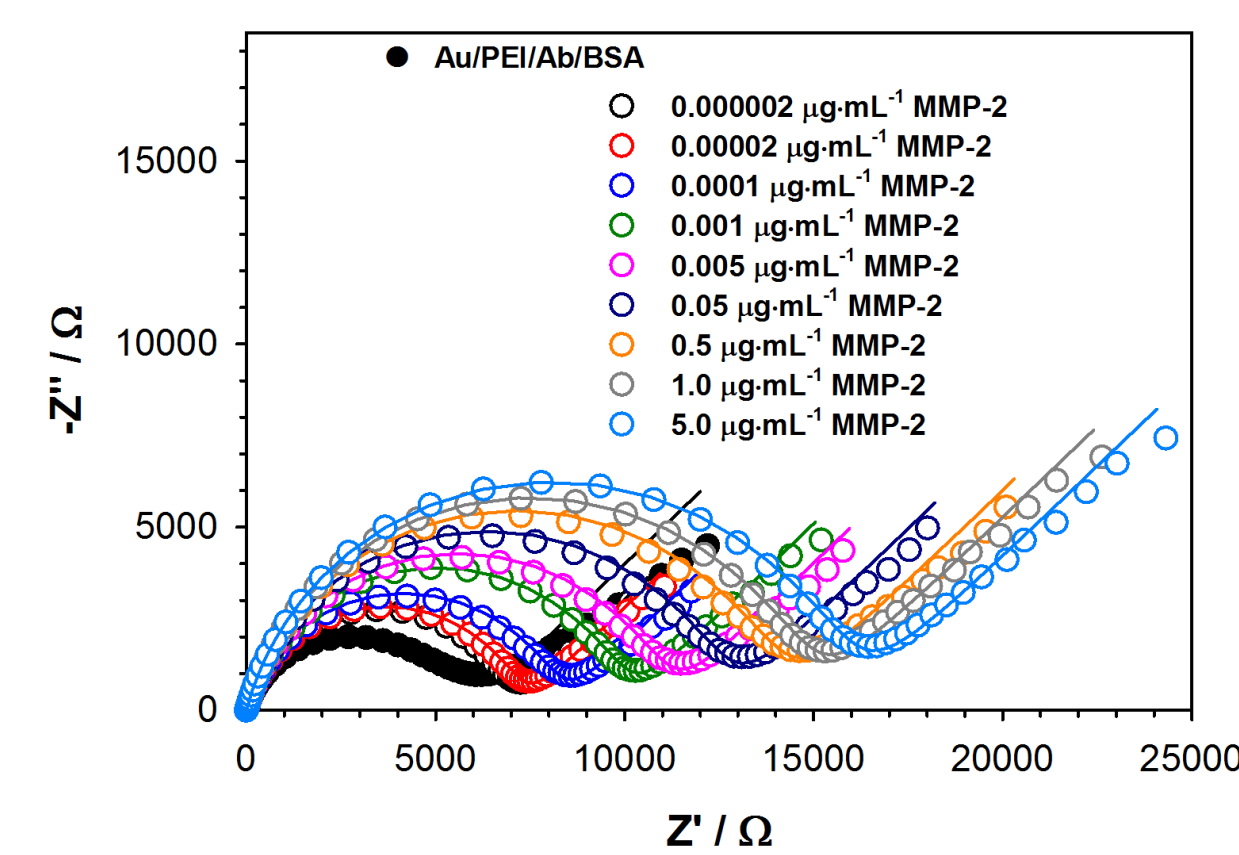
Granica wykrywalności: $LOD = \frac{3\sigma}{a}$
Granica oznaczalności: $LOQ = 3.3 \cdot LOD$

σ : odchylenie standardowe wartości Δf dla najmniejszego stężenia MMP-2
 a : nachylenie krzywej kalibracji

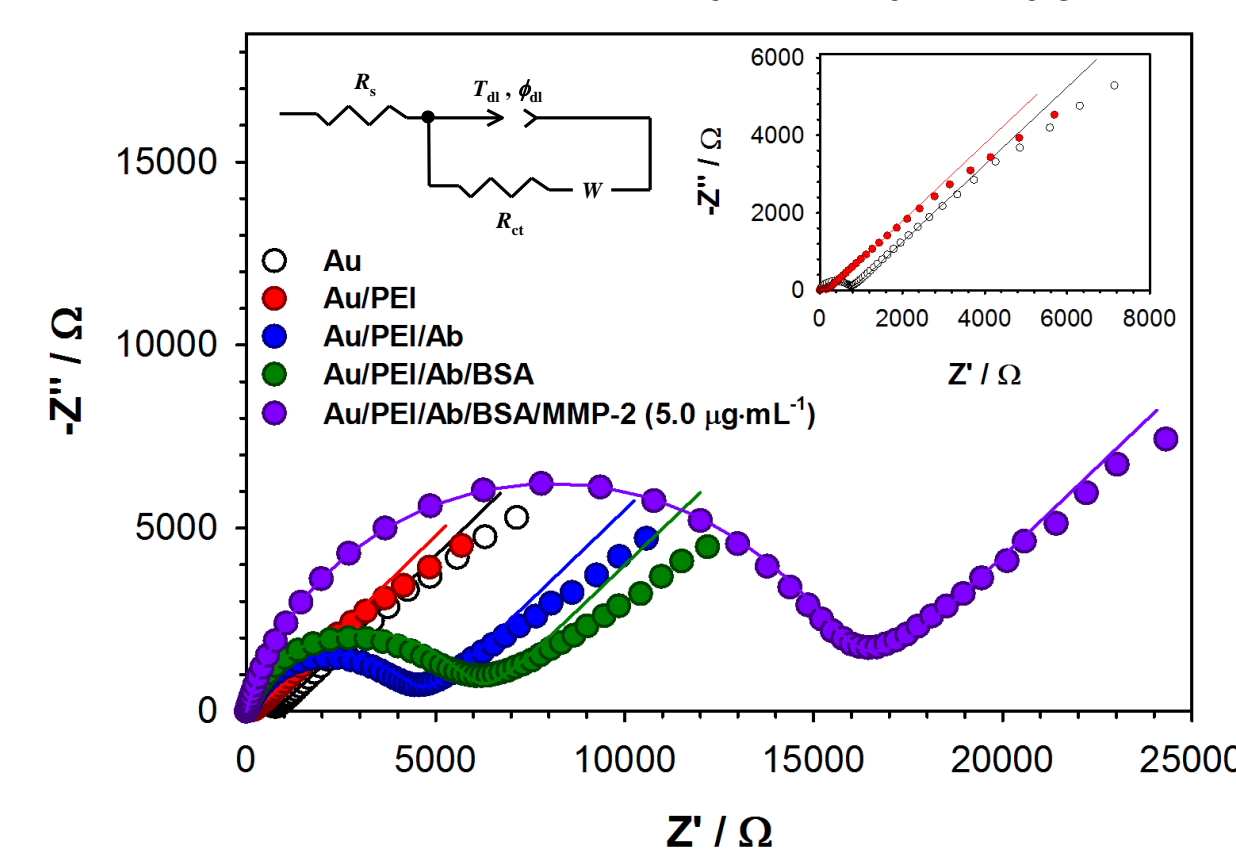


ANALIZA EIS

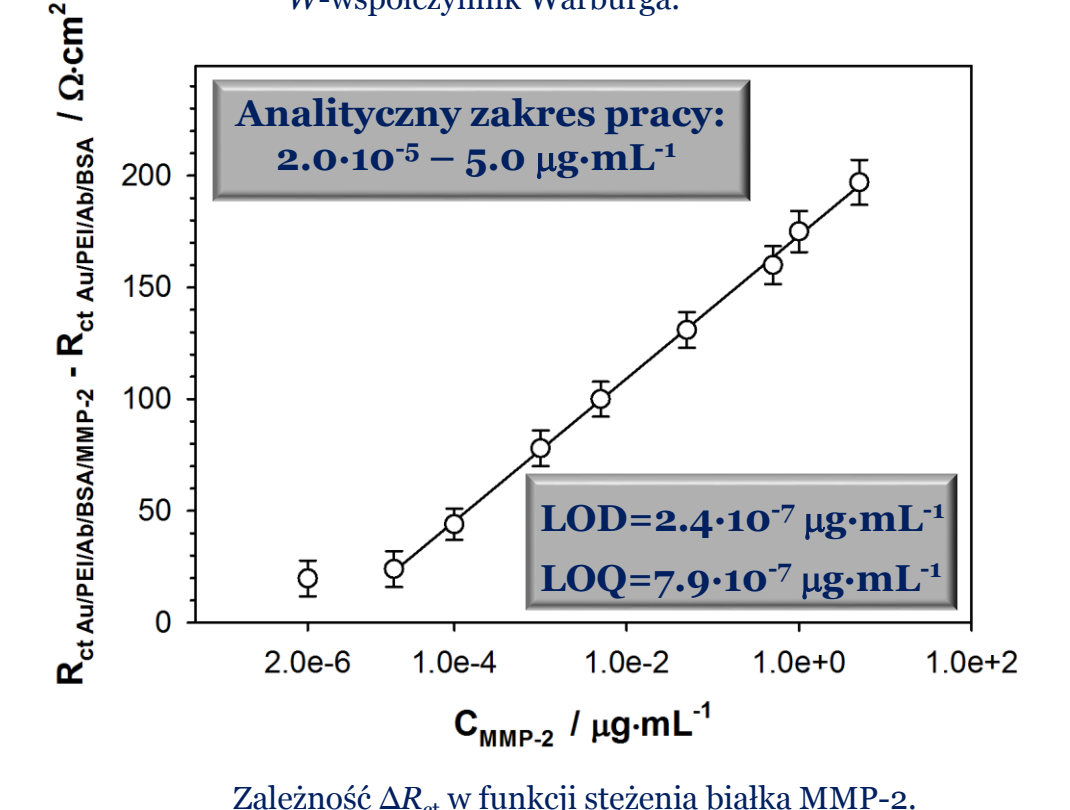
Widma Nyquist'a zarejestrowane dla kolejnych etapów modyfikacji powierzchni elektrody wykonane w obecności równomolowej mieszaniny żelazocyjanów (II i III). Zaprezentowany kształt jest typowy dla procesów kontrolowanych dyfuzyjnie. Po wprowadzeniu PEI średnica półkola zmniejszyła się, ponieważ ujemnie naładowany próbnik redoks przyciągany jest przez dodatnio naładowany film polimeru. Natomiast unieruchomienie przeciwciała, nałożenie warstwy BSA i wprowadzenie MMP-2 prowadziło do zwiększenia się średnicy półkola, a zatem zwiększaniem wartości oporu przeniesienia ładunku.



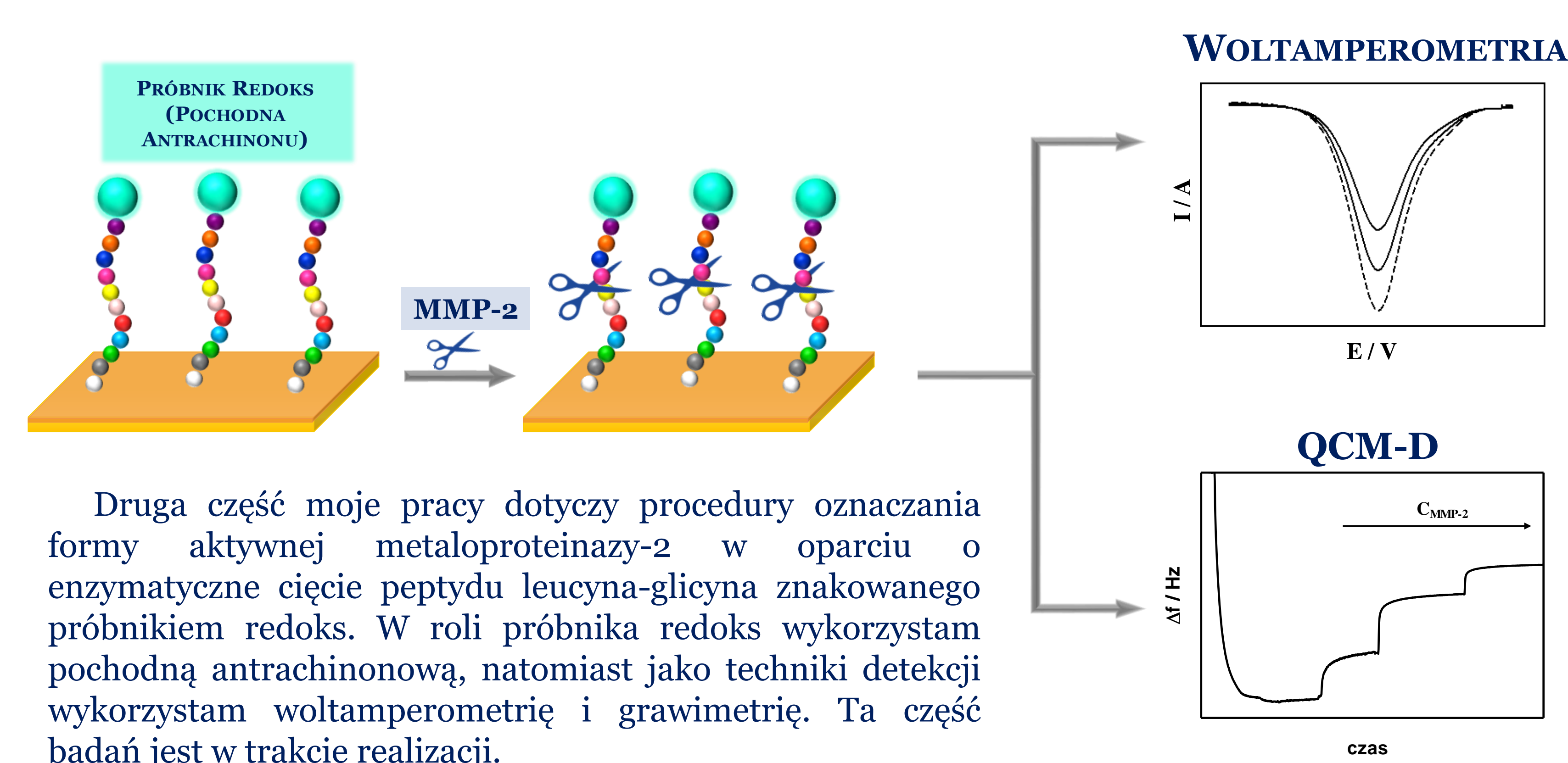
Widma Nyquista zarejestrowane dla różnych stężeń MMP-2. Warunki eksperymentalne: 0.01 M PBS (pH 7.4); 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-}; $E_{app} = 242$ mV; elektroda Au ($\phi = 1.6$ mm). Linie ciągłe – krzywe dopasowane teoretycznie przy użyciu programu FRA; punkty – wyniki eksperymentalne.



Widma Nyquista zarejestrowane dla poszczególnych etapów konstruacji immunosensora. Warunki eksperymentalne: 0.01 M PBS (pH 7.4); 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-}; $E_{app} = 242$ mV; elektroda Au ($\phi = 1.6$ mm). Linie ciągłe – krzywe dopasowane teoretycznie przy użyciu programu FRA; punkty – wyniki eksperymentalne. Obwód zastępczy Randlesa: T_{dl} – parametr pojemnościowy elementu stało-fazowego, ϕ_{dl} – parametr pojemnościowy elementu stało-fazowego, R_{ct} – opór przeniesienia ładunku, W – współczynnik Warburga.



SENSOR DO OZNACZANIA AKTYWNEJ FORMY MMP-2



Druga część mojej pracy dotyczy procedury oznaczania formy aktywnej metaloproteiny-2 w oparciu o enzymatyczne cięcie peptydu leucyna-glicyna znakowanego próbnikiem redoks. W roli próbniaka redoks wykorzystam pochodną antrachinonową, natomiast jako techniki detekcji wykorzystam woltamperometrię i grawimetrię. Ta część badań jest w trakcie realizacji.

PODSUMOWANIE

Zaproponowany immunosensor do oznaczania całkowitego stężenia MMP-2 łączy specyficzność immunoreakcji z wysoką czułością oznaczania.

Modyfikacja powierzchni elektrody odpowiednią warstwą receptorową wykorzystującą kationowy polimer PEI umożliwił kontrolę orientacji unieruchamianych cząsteczek przeciwciała z uzyskaniem największej możliwej wydajności detekcji metaloproteiny-2. Wykorzystanie grup aminowych PEI pozwoliło na prostopadłe zorientowanie cząsteczek przeciwciała w warstwie receptorowej, zwiększając jego czułość i poprawiając granicę wykrywalności. Przedstawiony czujnik pozwalał na oznaczenie metaloproteiny-2 na poziomie około $1.3 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ponadto obecność w roztworze potencjalnych interferentów MMP-2 nie zaburzała wyników pomiaru. Z powyższych badań wynika, iż zaproponowany immunoczuJNIK może być wykorzystany do detekcji MMP-2 w próbkach krwi.

Dalsza część pracy będzie poświęcona procedurze oznaczania formy aktywnej metaloproteiny-2 w oparciu o enzymatyczne cięcie peptydu leucyna-glicyna znakowanego próbnikiem redoks. W roli próbniaka redoks wykorzystana będzie pochodna antrachinonowa, natomiast jako techniki detekcji woltamperometria i grawimetria.