

OTKA Témapályázat zárójelentés

Kétszer 1D kapilláris elektroforézis chip technológia

Élettelen természettudományok

OTKA T042897

Dr. Kilár Ferenc

Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar
Bioanalitikai Intézet
egyetemi tanár
biológiai tudomány doktora

2003-2005

4500 eFt*

* a megítélt összeg kétszer csökkent az OTKA Bizottság döntése következtében

A KUTATÁSI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

Dr. Kilár Ferenc

Az analitikai kémia, bioanalitika az elmúlt években újabb nagy kihívás elé került. Egyszerű és összetett szervezetek géntérképeinek ma már sorozatban történő meghatározása után a kapott adatokra alapozva a megfelelő fehérje-állomány, a *proteom*, megismerése következett. A feladat nehézségét növeli és növelte hogy akár egy sejt fehérje-állományának összetételét kell meghatározni. A két-dimenziós gél-elektroforézis módszer alkalmas fehérjék izoformáinak, genetikai mutánsainak, és különböző poszt-transzlációs származékainak feltérképezésére. Bár a módszer a ma használatos számítógépes kiértékelő módszerek segítségével már majdnem automatizálható technikaként tekinthető, mégis érdemes volt más elválasztási módszerek keresése.

A kapilláris elektroforézis technika jó lehetőséget kínál olyan új módszerek kidolgozására, amelyek lehetővé teszik nagyon kis anyagmennyiségek automatizált egy és két-dimenziós analízisét.

A „kétdimenziós” kapilláris elektroforézis módszer kifejlesztéséhez először az egy-egy dimenzióban folytatott analízisek vizsgálata vált szükségessé. A tesztelés és a kapcsolandó módszerek egymáshoz illesztése volt elsősorban a pályázathoz kapcsolódó munka tartalma. A kétdimenziós poliakrilamid gél-elektroforézis az egyik irányban izoelektromos fókuszálást, arra merőlegesen általában SDS-gélelektroforetikus elválasztást alkalmaz. A kapott kétdimenziós képet általában alakfelismerő szoftverek segítségével analizálva lehet megállapítani a minta összetételét, a festéssel detektálható fehérjekomponenseket. Ezt a technikát csak valamilyen polimer-mátrix alkalmazásával (elsősorban poliakrilamid gél) lehet megvalósítani, és a komponensek megfestésének (detektálásának) is jól körbejárható határai vannak. A szabad oldatokban (*free solution*) végrehajtható kapilláris izoelektromos fókuszálás technika teljes mértékben automatizálható. Ennek kidolgozása során mindkét módszer, a két-lépéses (*two-step CIEF*) és az egy lépéses (*one-step CIEF*) technika alkalmasnak bizonyult a nagy

érzékenységgű és szelektivitású meghatározásokra. A pályázatban részvevő kutatók több eredményt közöltek, illetve új módszereket fejlesztettek ki a kapilláris izoelektromos fókuszálás terén. A munkáról több közlemény, és összefoglaló könyvfejezet született. Az izoelektromos fókuszálással elválasztott komponensek a 2D gélelektroforézisben a második dimenziót alkotó gélben történő vándorlásuk során válnak el egymástól. A kapilláris izoelektromos fókuszálással elválasztott komponensek további szétválasztása csak akkor lehetséges, ha a kapott zónákat egymástól elkülönítve, a kapillárisból kijuttatva vetjük alá valamelyik másik elektroforetikus elválasztási módszernek. A kapillárisból való kijuttatást mindkét féle CIEF technika biztosíthatja, de az egy lépéses technika esetében a külső nyomás alkalmazása valószínűleg mindenképpen szükséges (az endozmotikus áramlás sebessége ugyanis a folyamat során az eltávozó amfolitok miatt folyamatosan változik). Az izoelektromos fókuszálás során elválasztott, fókuszált zónáknak a második kapillárisba való bejuttatásához megfelelő összetétellel kell és lehet a komponenseket bejuttatni ahhoz, hogy a zóna-elektroforézis elvégezhető lehessen. A kidolgozandó módszerben ez a lépés nemcsak egy-egy kiválasztott zóna további elektroforetikus analízisét jelenti. Megfelelő detektálást alkalmazva az első kapilláris végénél az összes fókuszált frakció, egymás után, de időben elválasztva a második kapillárisba, mintha injektált minta lenne, bejuttatható és tovább analizálható. Ennek alapját az biztosította, hogy az izoelektromos fókuszálás mobilizálási lépését időben fel lehet függeszteni, és ez alatt az idő alatt egy-egy mintazónának a második kapillárisban való elválasztását el lehet indítani, esetleg teljesen el lehet végezni. Megfelelő időközöket alkalmazva a mobilizálási lépés során a második kapillárisba („második dimenzió”) szekvenciálisan bejuttatott zónák analízise végrehajtható. A módszer kidolgozása során kétféle dimenzióban történt fejlesztés. Először a hagyományos kapilláris elektroforetikus készülékek alkalmazásával kidolgoztunk kapilláris izoelektromos fókuszálás-körülményeke. Ehhez felhasználtuk a jelenleg rendelkezésre álló automatikus, valamint két moduláris kapilláris elektroforézis készülékeket, azok detektorait. Beállításra került az ITP-CZE kapcsolt kapilláris elektroforetikus rendszer, amelyben egymás után kapcsolt két „makro”-kapillárisban izotachoforetikus mintakoncentráció után zóna-elektroforetikus elválasztást lehet végrehajtani. A készülék módosításait a felvázolt projektben terveztük megtenni, ugyanakkor erre a csökkentett pénzügyi fedezet miatt nem lehetett megtenni. Ennek ellenére a kidolgozott technikák alkalmasak a kétszer 1D módszer adaptálására.

A projekt ütemezése során izoelektromos fókuszálás és zónaelektroforézis kísérleteket folytattunk különböző analitikai célokkal. Ebben szerepelt bakteriális fehérjék vizsgálata, optikai izomerek elválasztása, speciális detektálási technikák (pl. fluoreszcens) alkalmazásának megvizsgálása. A már rendelkezésre álló PrinCE moduláris „1D” kapilláris elektroforézis készüléken a kapilláris izoelektromos fókuszálás mobilizálási lépésének pulzáló módú elvégzésére a készülék alkalmas. *Uncoated* (kezeletlen) és *coated* (fedett) kapillárisok alkalmazásának összehasonlítása történt. Standard fehérjekeverékek és bakteriális sejtlizátumok analízise izoelektromos fókuszálással, tipikus izoelektroferogramok gyűjtése történt. A második dimenzió, vagyis elsősorban a zóna-elektroforetikus elválasztások esetében is több lépést végeztünk. Az injektált zónákat alkotó pufferhatású amfolit-komponensek és a második dimenzióban használt SDS együttes jelenléte elektroforézisre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A témában közreműködő hazai és külföldi kutatók az elmúlt két évtizedben a projektben felvázolt kutatási területeken dolgoztak és dolgoznak. Szakmai eredményeik felölelik a kapilláris elektroforézis metodikai-technikai fejlesztésében és különböző alkalmazásokban való munkáik eredményeit.

Pécs, 2006. február 28.

Dr. Kilar Ferenc