UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023

Zborník recenzovaných príspevkov

26. apríl 2023 Bratislava, Slovenská republika Univerzita Komenského v Bratislave ISBN 978-80-223-5608-4 (tlač) ISBN 978-80-223-5609-1 (online)

Magnetické častice v bioafinitných interakciách za účelom implementácie v diagnostike onkologických ochorení

Veronika Vráblová, Anna Blšáková, Ján Tkáč

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, Bratislava 841 04, Slovenská republika; veronika.vrablova@savba.sk

Abstract

Magnetic particles in bioaffinity interactions for the purpose of implementation in the diagnosis of oncological diseases

In this study, an assay for detection of the cancer biomarker Thomsen-nouvelle (Tn) antigen on the ELISA plates format was designed and developed. The effects of size and funcional groups of magnetic beads (MBs) on the specific sensitivity of the bioaffinity interaction were studied. Four different MBs were used in the study, i.e. carboxy-modified MBs of 250 nm, 500 nm, 1000 nm and 2800 nm. In order to evaluate which MBs are the best suited for detection of the analyte anti-Tn antibodies, sensitivities of detection (slopes from calibration curves) were calculated. Then, we evaluated the effect of size on the specific sensitivity of detection of anti-Tn antibodies in order to understand the immobilisation process on nanoscale. We obtained a limit of detection (LOD) (0.31 ± 0.01) ng mL⁻¹ or (2.10 ± 0.04) pM for analyte detection. In addition, the optimal assay configuration was highly selective and enabled reliable detection of the analyte in human serum with a recovery index in the range of 102 -104%.

Keywords: anti-glycans antibody; biomarkers; magnetic beads; detection

Úvod a formulácia cieľa

Onkologické ochorenia globálne a dlhodobo partia k najčastejším príčinám smrti. Štatistiky a prognózy naznačujú, že tento trend sa v budúcnosti bez intervencie nezmení [1]. Zohľadniac špecificitu diagnózy v intenciách unikátnosti a jedinečnosti osobných faktorov, ktoré prispievajú k rozvoju ochorenia (geografický pôvod, osobná história, genetika, socioekonomické faktory, psychické rozpoloženie) a vzájomne sa ovplyvňujú, je zrejmé, že hľadanie uniformného lieku na rakovinu je prinajmenšom komplikované. Kľúčovým prvkom k zlepšeniu prognózy pacientov a zvýšeniu počtu vyliečených je skríning a skorá diagnostika. Jedným z úskalí skorej diagnostiky je nízka koncentrácia onkologických biomarkerov vo vzorkách krvi alebo iných telesných tekutín. Zvýšiť senzitivitu a selektivitu skríningových testov by mohlo použitie magnetických častíc so špeciálne upraveným povrchom. Upravené častice na obrázku 1 oplývajú novými vlastnosťami v závislosti od prítomných biomolekúl na ich povrchu. Malý objem v kombinácii s ich veľkým povrchom prispieva k zvýšeniu účinnosti detekčných testov [2].



Obr. 1. Snímka magnetických častíc zo skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM).

Komerčne dostupné častice sú pokryté vrstvou funkčných skupín, ktoré v optimálnych podmienkach umožňujú naviazanie ligandu s afinitou k analytu. Na obrázku 2 je schematicky znázornená aplikácia magnetických častíc na zvýšenie koncentrácie analytu (onkologického biomarkeru) za účelom purifikácie analytu z komplexnej vzorky (krvné sérum alebo iné telesné tekutiny) a magnetická separácia od nešpecifických biomolekúl [2-4].

SUspension Magnetic Bead-based Assay (SUMBA) je analytická metóda používaná na detekciu a kvantifikáciu proteínov, antigénov a ďalších biomolekúl v biologických vzorkách. Táto metóda využíva magnetické častice (magnetic beads), ktoré sú funkčne modifikované na zachytenie cieľových molekúl. Schéma pracovného postupu SUMBA je znázornená na obrázku 3. Prístup môže byť použitý pri skúmaní účinku vlastností rozhrania širokého spektra nanočastíc a mikročastíc na bioafinitné interakcie [3].



Obr. 2. Použitie magnetických častíc na zvýšenie koncentrácie analytu z komplexných vzoriek.



Obr. 3. SUMBA: Kroky zahrnuté vo formáte analýzy založenej na SUspension Magnetic-Bead Assay (SUMBA) použitej v súčasnej práci na detekciu AGA (anti-glykánové protilátky). Test pozostáva z nasledujúcich krokov (zľava doprava): pridanie vzorky/štandardu obsahujúceho AGA ako rakovinové biomarkery do jamky ELISA; inkubácia vzorky/štandardu s MB s imobilizovaným glykonanokonjugátom a následnou magnetickou separáciou; pridanie sekundárnej protilátky voči AGA s enzýmom poly-HRP pre amplifikáciu signálu; pridanie substrátu tetrametylbenzidínu (TMB) do jamky a nakoniec ukončenie enzymatickej reakcie H₂SO₄ a generovanie optického signálu [4].

Materiál a metódy

Chemikálie a materiály: Tablety fosfátového pufru fyziologickej soli (PBS, 10 mM fosfátový pufor, 0,0027 M chlorid draselný a 0,137 M chlorid sodný, pH 7,4), tablety PBS-TWEEN (PBST, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,05% detergent TWEEN 20, 10 mM fosfátový pufr, pH 7,4), sérový hovädzí albumín z (BSA), 1-Etyl-3-[3-dimetylamínopropyl]karbodiimid hydrochlorid (EDC), N-hydroxysukcinimid (NHS), 2-(N-morfolino)etán-sulfónová kyselina (MES), kyselina sírová (H₂SO₄) boli zakúpené od spoločnosti SigmaAldrich (USA). Pierce[™] streptavidín poly-HRP (HRP = chrenová peroxidáza) konjugát bol získaný od spoločnosti Thermo Fisher Scientific (USA).

Pufre a reagenty: PBST premývací pufor (PBS s 0,05% Tween 20); blokačné činidlo (0,1% BSA v PBST); Tris HCl (0,050 M, pH 7,4); 25 mM MES, pH 6,0; 25 mM glycín v 0,01 M PBS a 0,1 M sodný fosfát (pH 7,0).

Glykonanokonjugáty: Tn antigén (α -D-GalNAc) viazaný na BSA (Tn-BSA; ~ 20 glykánov na proteín) bol získaný od spoločnosti GLYcoDiag (Francúzsko).

Protilátky: Použité nasledujúce primárne protilátky: protilátka proti Thomsen Friedenreich antigénu (CD176) (Antibodies online, ABIN3025629, Nemecko); protilátka voči sialyl-Tn antigénu (Antibodies online, ABIN2151589, Nemecko); protilátka proti sialyl-Tn antigénu (Genetex, GTX82967, klon sTn 219). Primárna protilátka anti-Tn GOD3-2C4 (2C4), myšia IgG1κ protilátka špecifická pre syntetické Tn antigény a Tn antigény slizníc. V experimentoch bola ako sekundárna protilátka použitá Goat anti-Mouse IgG H&L (Biotin; ab 6788; Abcam, UK). Magnetické častice: Nanomag®-D magnetické častice s funkčnou skupinou karboxyl (d = 250 nm) a Nanomag®-D magnetické častice s funkčnou karboxylovou skupinou (d = 500 nm) sme obdržali od spoločnosti Micromod (Nemecko). Magnetické častice s funkčnou karboxylovou skupinou DynaBeads MyOne (d = 1000 nm) a Dynabeads M-270 s karboxylovou kyselinou na svojom povrchu (d = 2800 nm), sme zakúpili od spoločnosti Thermo Fisher Scientific (USA).

SUMBA (SUspension magnetic bead-based assay) Objemy 3, 5, 10 alebo 20 µL magnetických častíc (každého z prípravkov) boli pridané do jamiek ELISA platničky. 100 µL roztoku s rôznymi koncentráciami anti-glykánových protilátok (AGA) sme pridali do platničky a inkubovali pri izbovej teplote za mierneho miešania po dobu 1 h. Sekundárnu biotinylovanú protilátku (0,5 mg mL⁻¹) sme inkubovali súbežne so streptavidínom a poly-HRP v pomere 1:1. Platničku sme pripevnili na magnet a následne premyli trikrát s 250 µL PBST. 200 µL sekundárnej protilátky konjugovanej s poly-HRP sme pridali do každej jamky a nechali reagovať 1 h pri konštantnom miešaní. Po troch premytiach sme pridali 100 µL roztoku 1-Step Ultra TMB-ELISA na vygenerovanie signálu. Reakciu sme ukončili po 10 minútach pridaním 100 µL 1 M kyseliny sírovej. ELISA platničku sme miešali po dobu 5 s a zmerali sme absorbanciu pomocou multi-Mode čítačky (Synergy HT BioTek, Vermont, USA) pri vlnovej dĺžke 450 nm. Senzitivitu sme vypočítali ako smernicu kalibračnej krivky pomocou lineárneho prispôsobenia v softvéri OriginPro 2019b s kalibračnou krivkou zostavenou pre každý zo štyroch objemov magnetických časticíc a pre všetky typy skúmaných magnetických častíc za použitia analytov o koncentrácii v rozmedzí od 0,1 ng m L^{-1} do 100 ng m L^{-1} a kontrolou (t.j. čistým pufrom s koncentráciou analytu 0 ng m L^{-1}).

Výsledky a diskusia

V tejto práci sme vykonali integráciu metódy SUMBA do formátu ELISA platne s použitím magnetu pre magnetickú separáciu. Glykán prítomný na povrchu BSA v podobe glykonanokonjugátu bol kovalentne imobilizovaný na magnetické častice (MB). Modifikované MB sme následne použili na interakciu so vzorkou alebo štandardom obsahujúcim AGA ako nádorový biomarker. V nasledujúcom kroku sme do systému aplikovali peroxidázou (poly-HRP) označenú sekundárnu anti-AGA protilátku na generovanie optického signálu. Prvým parametrom, ktorý sme optimalizovali v tejto práci, bol účinok zriedenia enzýmu poly-HRP na citlivosť testu (obrázok 4 A). Optimalizáciou sme odhalili najvyššiu citlivosť (t.j. sklon lineárneho kalibračnej krivky) detekcie anti-Tn protilátky pri zriedení 1 000 x, t.j. $(0,0845 \pm 0,0020)$ mL ng⁻¹; avšak pri vyššej koncentrácii analytu sme pozorovali tvorbu zrazenín ako výsledok enzymatickej premeny substrátu. Zriedenie anti-Tn protilátky 5 000 x viedlo k priaznivej citlivosti detekcie (0,0206 \pm 0,0029) mL ng⁻¹ bez vzniku agregátov zabraňujúcim stanoveniu pri vlnovej dĺžke 450 nm. Optimálne podmienky (t. j. 5 000-násobné riedenie pre poly-HRP; 3 µl Dynabeads® M270) sme použili na skúmanie špecificity detekcie analytu (obrázok 4 B). Výsledky naznačujú veľmi špecifickú detekciu analytu pre anti-Tn protilátku v porovnaní s inými AGA, t.j. anti-sTn protilátkou a anti-T protilátkou.



Obr. 4. Efekt riedenia enzýmu poly-HRP na senzitivitu a detekciu anti-Tn protilátok (A) a špecificita detekcie anti-Tn glykánových protilátok skúmaná použitím iných anti-STn a aniti-T (B).

Obrázok 5A znázorňuje závislosť špecifickej senzitivity od dvoch parametrov magnetických častíc (veľkosť MB v nm a hmotnosť MB vyjadrenej v mg). Zo skonštruovaného 3D grafu v sekcií s označením A vidíme, že najlepšiu špecifickú senzitivitu sme získali za použitia najmenšieho objemu (3 µl) v kombinácii s najväčšími MB, t. j. 2800 nm. Správanie častíc s veľkosťou 250 nm bolo odlišné od zvzšných druhov MB, pričom najvyššiu špecifickú senzitivitu sme dosiahli pri hmotnosti častíc 0,10 mg. Zo získaných dát sme usúdili, že použitím väčších MB je možné dosiahnuť vysokú špecifickú senzitivitu detekcie.

Pri skúmaní vplyvu hmotnosti MB na špecifickú senzitivitu sme pozorovali výrazný pokles so zvyšujúcou sa hmotnosťou MB pre tri rôzne veľkosti MB, t. j. 500 nm, 1000 nm a 2800 nm (obr. 4B), pričom najvyššia hodnota pre hmotnosť MB 0,03 mg bola $0,150 \pm 0,003$ ml ng⁻¹/mg MB.



Obr. 5. 3D grafy závislosti veľkosti a hmotnosti magnetických častíc (MB) od senzitivity (A) a LOD (B) pre detekciu AGA (anti-Tn protilátok) Boli použité nasledujúce farby pre rôzne hmotnosti MB (vyjadrené v mg) v skúšobnom systéme: 0,03 mg (červená), 0,05 mg (modrá), 0,10 mg (zelená) a 0,20 mg (oranžová).

Záver

Predkladaná práca sa zameriava na hľadanie riešení súčasných lokálnych aj globálnych problémov v spojitosti s výskytom onkologických ochorení a skúma využitie upravených magnetických častíc. Je potrebné poznamenať, že okrem vplyvu veľkosti častíc, je nutné venovať pozornosť aj povrchovým vlastnostiam ako je rozdelenie náboja na povrchu magnetických častíc v súvislosti s ich tendenciou sa zhlukovať vplyvom elektrických príťažlivých a odpudivých síl, čo ovplyvňuje schopnosť biokonjugácie molekúl.

Poďakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby, ITMS: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H., Ferlay J., Siegel R. L. et al. (2021) CA: CA Cancer J. Clin., 71(3), p. 209
- [2] Mani V., Chikkaveeraiah B.V., Rusling J.F. (2011) Expert Opin. Med., 5(5), p. 381
- [3] Blšákova A., Květoň F., Lorencová L. et al. (2022) Anal. Chim. Acta., 1195: p. 339444.
- [4] Vráblová V., Blšákova A., Lorencová L. et al. (2023) Anal. Chim. Acta., 1242: p. 340794