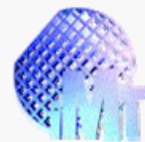




Influența factorilor de suprafață și mediu asupra reacției antigen-anticorp



Monica Simion,¹ Lavinia L. Ruță,² Mihaela Matache,² Lucia Cotorjan,^{1,2} Irina Klepș,¹ Mihaela Miu,¹ Adina Brăgaru,¹ Codruța C. Paraschivescu²

¹Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Microtehnologie (IMT), 077190, București, România

²Universitatea din București, Facultatea de Chimie, Catedra de Chimie Organică, 050663, București, România

e-mail: monica.simion@imt.ro; moni304ro@yahoo.com

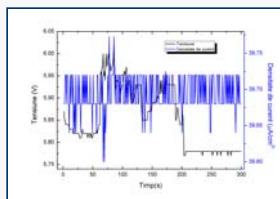
Introducere

Microarray de proteine au evoluat remarcabil în ultimul deceniu, devenind un instrument important în studiul proteinelor.¹ Suprafețele de siliciu poros reprezintă un substrat atractiv de utilizat în imobilizarea proteinelor², datorită structurii tridimensionale.³

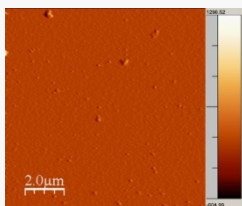
Imobilizarea proteinelor și realizarea reacției antigen-anticorp pe suprafețe solide este influențată de factorii de mediu precum umiditatea, temperatura sau pH-ul soluțiilor tampon dar și tipul suprafeței utilizate.

Prepararea suprafețelor de siliciu poros

Suprafața de siliciu poros (PS) a fost obținut prin porozificare electrochimică a substratului de tip p cu orientare cristalografică (100), 5-10 Ω cm folosind soluție de electrolit 1:2:1 HF, etanol și apă deionizată, la o densitate de curent 40 mA/cm², timp de 300s.

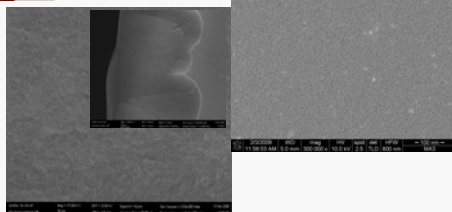


Curba curent/tensiune în timpul procesului de porozificare

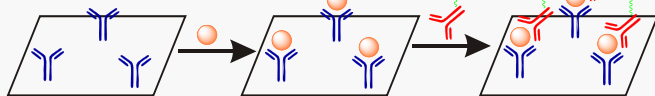


Analiza AFM a siliciului poros

Analiza SEM a suprafeței de siliciu poros obținute având diametrul porilor de 3-5 nm



Fabricarea biochip-urilor



Imobilizarea anticorpilor pe suprafață la diferite concentrații

Hibridizarea cu proteina de interes

Detectia fluorescență a complexului imun

Pentru studiile de influență a factorilor de mediu asupra imobilizării proteinelor pe suprafețe solide, au fost utilizate albumina serică bovină (BSA) și anticorpi monoclonal anti-uman CRP (soarece, mCRP) și policlonal anti-human CRP (capră, pCRP), marcate fluorescent cu Cy3. Pentru evaluarea influenței soluțiilor tampon (pH, concentrație, vâscozitate) asupra imobilizării proteinelor s-au folosit patru concentrații de proteine între 0.75 mg/mL și 0.21875 mg/mL diluții seriale. Experimente preliminare utilizând o serie de tamponi: tampon fosfat, (pH=7.4), tampon citrat (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M și 1M în PBS, pH=8.6), tampon comercial pentru printare (1X procurat de la firma Telechem pH=7.4), în aceleași condiții de temperatură și umiditate au arătat tamponul citrat 0,25 M în PBS și tamponul comercial ca fiind cele mai eficiente. Studiile au fost realizate pe suprafețe: comerciale funcționalizate cu funcțiuni epoxi și aldehidice, precum și pe suprafețe de siliciu poros nanostructurat.

Mulțumiri:

Acest proiect a fost realizat cu sprijinul financiar acordat de Ministerul Educației, Cercetării, Tineretului și Sportului, grant PNII 11023/2007.

Influența pH-ului soluțiilor tampon asupra imobilizării anticorpilor pe suprafețe

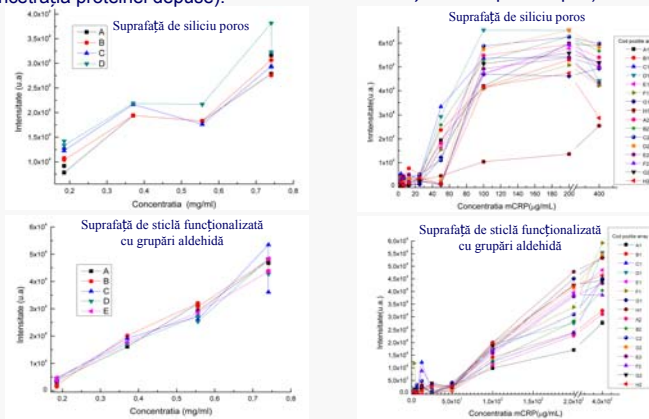


Influența tamponului de printare asupra imobilizării mCRP și pCRP pe suprafețe evaluate (intensitatea fluorescenței în funcție de concentrația anticorpului depus)

Teste de reproductibilitate între array-uri

Teste de reproductibilitate între array-uri pe suprafețe de siliciu poros și de sticlă funcționalizate cu grupări aldehidice utilizând BSA marcat fluorescent și printat în patru diluții seriale între 0,4 și 0,05 mg/mL (intensitatea fluorescenței în funcție de concentrația proteinei depuse).

Teste de reproductibilitate între array-uri pe suprafețe de siliciu poros și de sticlă funcționalizate cu grupări aldehidice utilizând mCRP marcat fluorescent și printat în opt diluții seriale între 0,4 și 3,125 x 10⁻³ mg/mL (intensitatea fluorescenței în funcție de concentrația anticorpului depus).



mCRP pCRP



Imaginea scanată cu anticorpii imobilizați fluorescent pe suprafața de siliciu poros

Dimesiunea pinului solid : 200 microni
Mărimea spoturilor: 200-200 microni,
distanța între spoturi 100 microni

Concluzii și perspective:

Microarray de anticorpi pe suprafețe de siliciu conferă :

- ✓ Background scăzut;
- ✓ Eficiență mare în imobilizarea proteinelor (la concentrații sub 100 μg/mL);

Rezultate încurajatoare pentru prepararea biochip-urilor de anticorpi CRP pe suprafețe de siliciu poros cu aplicații în diagnostic

Bibliografie:

- Westhuyzen J., *Ann Clin Lab Sci.* **2000**, 30(2), 133–143;
- Ressine, A., Ekstrom, S., Marko-Varga, G., Laurell, T., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6968-6974; (b) Steinhauer, C., Ressine, A., Marko-Varga, G., Laurell, T., Borebaeck, C.A.K., Wingren, C. *Anal. Biochem.* **2005**, 341, 204–213;
- Ressine, A., Corin, I., Järäs, K., Guanti, G., Simone, C., Marko-Varga, G., Laurell, T., *Electrophoresis* **2007**, 28, 4407–4415;
- Cullis, A.G., Canham, L.T., Calcott, P.D.J., *J. Appl. Phys.* **1997**, 82(3), 909-965;
- Lin, T. L. and Wang, K. L. *Appl. Phys. Lett.* **1986**, 49, 1104