

Detectie van labelvrije targetmoleculen door middel van optisch uitleesbare, antilichaam gebaseerde biosensoren

Nick Vanbergen

promotor :
dr. Luc MICHIELS

***Detectie van labelvrije targetmoleculen
door middel van optisch uitleesbare,
antilichaam gebaseerde biosensoren.***

1.	Inleiding.....	1
1.1	Instelling	1
1.2	Biosensoren	1
1.2.1	Algemeen	1
1.2.2	Detectie limiet.....	3
1.2.3	Situering.....	3
1.3	Optische, antilichaam gebaseerde immunosensor	4
1.3.1	Achtergrond	4
1.3.2	Fluorescentie	5
1.3.3	'Fluorescence Resonance Energy Transfer'	6
1.3.4	FRET paren.....	8
	Probleemstelling	9
2.	Materialen en Methoden	11
2.1	Apparatuur	11
2.1.1	Fluorimeter.....	11
2.1.2	Spectrofotometer.....	12
2.1.3	Platereader	12
2.1.4	PCR thermal cycler.....	12
2.1.5	Sequencer.....	12
2.1.6	Vacuum indamper.....	12
2.2	Materialen.....	13
2.2.1	Antilichamen en proteïne G.....	13
2.2.2	Recombinant DNA technologie.....	13
2.3	Methoden.....	14
2.3.1	Antilichaam en PG labeling	14
2.3.2	Fusie en coating van 96-well plaat met antilichaam-PG complexen ..	14
2.3.3	cDNA aanmaak.....	14
2.3.4	PCR amplificatie.....	15
2.3.5	TOPO TA klonering	15
2.3.6	Kolonie PCR.....	16
2.3.7	Plasmidebereiding (miniprep).....	17
2.3.8	Sequentie PCR	18
2.3.9	Sequencing	18
3.	Resultaten	20
3.1	Optische sensor.....	20
3.1.1	Karakterisatiemetingen	20
3.1.2	Optimalisatie	21
3.1.4	FRET metingen.....	22
3.2	Recombinante antilichaam klonering	24
3.2.1	cDNA aanmaak.....	25
3.2.2	PCR amplificatie van de volledige lichte en zware ketens	25
3.2.3	Klonering van de lichte en zware ketens van anti-PSA.....	28
3.2.4	Plasmide extractie van de geselecteerde kloons van de lichte en zware ketens van anti-PSA.....	29
3.2.5	Sequentiebepaling van de bekomen kloons van de lichte en zware ketens van anti-PSA	29
4.	Discussie.....	32
	Referenties	38

Lijst met afkortingen

FRET: *'Fluorescence Resonance Energy Transfer'* of *'Forster's Resonance Energy Transfer'*

BIOMED: Biomedisch Onderzoeksinstituut, Universiteit Hasselt

MS: Multiple Sclerose

IMO: Instituut voor Materiaalonderzoek

TCR: T cel receptor

Ig: Immunoglobuline

LC: Lichte keten van een immunoglobuline

HC: Zware keten van een immunoglobuline

PG: Proteïne G

PCR: Polymerase Chain Reaction

DNA: Desoxyribonucleïnezuur

RNA: Ribonucleïnezuur

mRNA: messenger RNA

cDNA: copy DNA, gemaakt van mRNA

V: Variabel deel van een immunoglobuline

C: Constant deel van een immunoglobuline

UV: Ultraviolet

IR: Infrarood

CRP: C-reactive protein

PSA: Prostate specific antigen

PG: Protein G

UV/VIS: Duidt aan dat een meetapparaat in het ultraviolette en zichtbare (visible) lichtspectrum kan meten.

Voorwoord

Voor de realisatie van deze thesis heb ik kunnen rekenen op de structurele, kennisgebonden en morele steun van heel wat begeleiders, collega's en vrienden.

Allereerst wil ik Prof. Dr. Piet Stinissen, directeur van het Biomedisch Onderzoeksinstituut en mijn promotor Dr. Luc Michiels bedanken voor de infrastructuur en de mogelijkheid om aan dit onderzoek deel te nemen.

Voor de technische ondersteuning en de uitgebreide kennis waar ik uit heb mogen putten wil ik ook graag Dr. Martin Van de ven, Marie-Paule Tulleners, doctoraatsstudenten Sheen Sahebali en Klaartje Somers, alsook Nestor Froidmont bedanken.

Hiernaast bedank ik graag Dr. Veerle Somers, mijn tweede beoordelaar, om de tijd te nemen om deze thesis na te lezen en bij te sturen.

Als laatste wil ik graag mijn collega, Gert Janssen bedanken voor de fijne samenwerking tijdens deze stage.

Samenvatting

Het onderzoek naar biosensoren is een *'hot topic'* in de biomedische sector. Dit project draagt hiertoe bij door een labelvrije, aan de target kant, optische immunosensor te ontwikkelen. Met behulp van deze methode kan de antilichaambinding geoptimaliseerd worden en de verkregen kennis kan gebruikt worden om de gevoeligheid van immunosensoren in het algemeen te verhogen. Het principe van de optische immunosensor is gebaseerd op *'Fluorescence resonance energy transfer'* (FRET). Met deze techniek kan niet enkel de oppervlakteverdeling van de antilichamen bestudeerd worden door middel van fluorescentie, maar gelijktijdig hun functionaliteit gecontroleerd worden.

Preliminair metingen van fluorescent gelabelde antilichaam – proteïne G complexen werden uitgevoerd op de fluorimeter en platereader. Nadat een optimalisatie van de labelingsgraad en proteïne concentratie bekomen was met behulp van de fluorimeter, werd overgegaan op de detectie van FRET. Dit fenomeen diende enkel op te treden wanneer er antilichaam-antigen interactie plaatsvond. Deze eerste constructen bleken echter moeilijk te reproduceren en vereisten tijdsroevende optimalisatie stappen. Om deze redenen werd besloten om over te stappen op een alternatieve methode.

Met behulp van recombinante DNA technologie is het mogelijk om antilichamen te voorzien van korte tags, waaraan via een enzymatische reactie fluorescente groepen gehecht kunnen worden. Deze methode vereist het eigenhandig isoleren, modificeren en recombinant kloneren van DNA maar maakt een controleerbare en reproduceerbare antilichaam labeling mogelijk.

Er werd mRNA van verschillende hybridoma cellijnen van Balb/C muizen vrijgegeven om recombinante antilichamen te produceren. De voorlopige resultaten van de cDNA, PCR amplificatie, transformatie en plasmide sequentie bepaling waren veelbelovend. Na de samenstelling van een kloneringsvector kunnen recombinant aangemaakte antilichamen in de toekomst gebruikt worden voor een nieuw type optische immunosensor te creëren. Met een stabielere fluorescente labeling kan het optreden van FRET vastgesteld worden. Vervolgens kunnen functionaliteits metingen en oppervlakte karakterisatie verbeterd uitgevoerd worden.

1. Inleiding

1.1 Instelling

Dit project wordt uitgevoerd door het Biomedisch Onderzoeksinstituut, Universiteit Hasselt (BIOMED). Het strategische plan van BIOMED omvat twee kerndomeinen, namelijk neuroinflammatie-onderzoek en biosensoren-onderzoek. In het neuro-inflammatie project wordt voornamelijk onderzoek uitgevoerd rond Multiple Sclerose (MS), een auto-immune aandoening van de hersenen. De volgende onderwerpen komen in dit domein aan bod:

- Immunologische aspecten en ziektemarkers voor auto-immuunziekten
- Oligodendrocyt-celdood, signalisatie en herstel in neuro-inflammatoire ziekten
- Klinische aspecten van multiple sclerose

Het onderzoek over biosensoren gebeurt in nauwe samenwerking met het Instituut voor Materiaalonderzoek (IMO) aan de Universiteit Hasselt en bestaat momenteel uit twee topics:

- Ontwikkeling van biosensoren op basis van diamant of synthetische polymeren
- Ontwikkeling van cel gebaseerde biosensoren

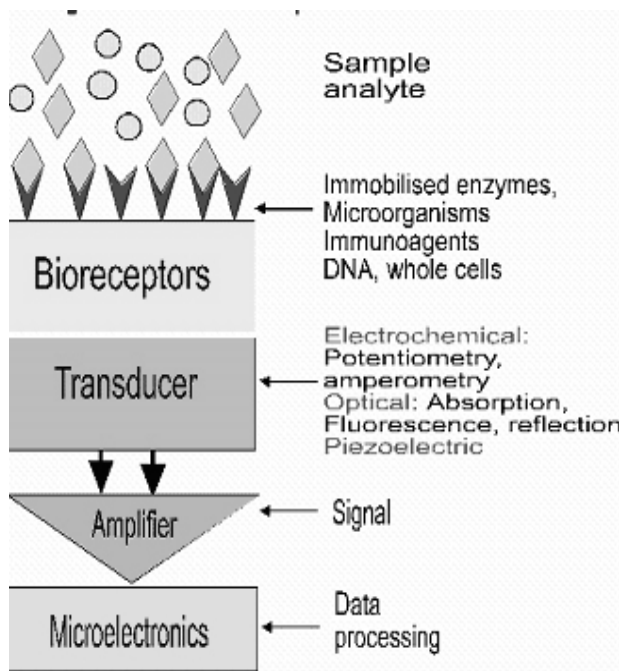
Het is het laatste domein waarvan een aantal piloot experimenten uitgevoerd zijn in dit project.

1.2 Biosensoren

1.2.1 Algemeen

Biosensoren zijn een populair fenomeen in de hedendaagse wetenschap. Verscheidene onderzoeksgroepen zijn intensief bezig met de ontwikkeling en optimalisering van deze biosensoren, waarvan verwacht wordt dat ze veel van de huidige diagnostische testen en uitgebreide analytische technieken in de laboratoria kunnen vervangen. Het doel van de ontwikkeling van biosensoren is om een compact, tijdsbesparend en eenvoudig te gebruiken meetsysteem te ontwikkelen, welk zich kan meten aan de huidige testen op niveau van sensitiviteit en specificiteit. Onderzoek hiernaar is vooral aantrekkelijk gemaakt door de mogelijkheid om heel wat druk van de laboratoria en het opgeleide personeel af te nemen op vlak van routine testen en diagnoses.

De constructie van een biosensor kan sterk verschillen tussen de types onderling, hoewel er meestal gestreefd wordt naar eenvoud en compactheid, toch kunnen er drie tot vier universele componenten herkend worden in elk type biosensor, zoals weergegeven in figuur 1. Allereerst een biologische component, daarnaast een transducer en een elektronische component als derde onderdeel, eventueel met een signaalversterker die op verschillende niveaus aanwezig kan zijn. De biologische component stelt meestal het sensoroppervlakte voor, waar interactie met de omgeving gebeurt door middel van een chemische, enzymatische



Figuur 1: Schematische voorstelling van een biosensor. Weergegeven met de volgende onderdelen: biologische component (bioreceptors), transducer, signaalversterker (amplifier) en elektronische component (microelectronics).

of fysische reactie met deze component van de sensor en het te meten substraat. De transducer is verantwoordelijk voor de omzetting van dit biochemische gebeuren in een fysisch signaal. Dit laatste wordt uiteindelijk geconverteerd in een elektronisch afleesbaar signaal, meestal een waarde die wordt weergegeven op een display of rechtstreeks door de computer kan worden ingelezen.

Het bekendste voorbeeld van een biosensor is de glucosesensor [1], welke al jaren vrij verkrijgbaar is op de markt.

Dit model sensor werkt met het enzym glucose oxidase, als biologische component, dat de aanwezige glucose zal oxideren en op die manier een spanningsverschil opbouwt wat vervolgens gemeten en afgelezen kan worden op de display. Deze sensor is gebaseerd op het principe van een galvanische cel. Naast dit voorbeeld zijn er verscheidene andere sensoren al op de markt of nog in ontwikkeling die volgens sterk uiteenlopende principes functioneren, hieronder bevinden zich onder andere de impedimetrische, de elektrochemische en de optische biosensoren. [2]Het is in deze laatste groep dat dit onderzoek zich zal focussen, meer specifiek gericht naar de optische fluorescentie sensoren. Hiermee hopen we een brug te slaan tussen de impedimetrische en optische biosensoren.

1.2.2 Detectie limiet

Een diagnosesysteem dat gebaseerd is op de herkenning van afwijkende moleculaire concentraties bij de mens dient niet enkel zeer specifiek te meten, het moet ook over voldoende gevoeligheid beschikken. De fysiologische concentraties in het menselijke lichaam liggen vaak in de grootte orde van nanomolair en zelfs picomolair of atomolair. [3] Om hierin een verandering, welke vaak op een gezondheidsprobleem duidt, te detecteren moet het type biosensor uiterst gevoelig zijn.

Verschillende onderzoeksgroepen zijn momenteel druk in de weer om hun type biosensor zo goed mogelijk te optimaliseren. Ze zweren vaak ieder bij hun eigen aanpak waarvan miniaturisatie [4, 5], concentratie van het detectiesignaal op het sensoroppervlak of het kopiëren van de natuurlijke mechanismen enkele voorbeelden zijn.

1.2.3 Situering

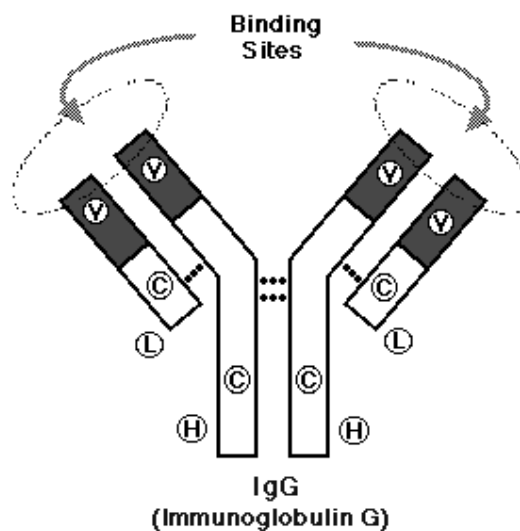
De miniaturisering is gebaseerd op nano-technologie en start vanuit het standpunt dat een verkleining van de sensor in het geheel, en dus een relatieve vergroting van de sensoroppervlakte, het toelaat om gevoeligere signalen te detecteren. Hier wordt onder andere gewerkt met geleidingscircuits die bestaan uit slechts nanometers dikke metaallaagjes, alsook interdigitale elektrodes. Dit alles dient om tot een optimaal gebruik van het sensoroppervlak te komen en dus de gevoeligheid te verhogen. [4] Een andere toepassing maakt gebruik van magnetische velden om het sensorgebied te concentreren op één bepaald detectiepunt en als het ware alle signalen op elkaar te stapelen. [6] Beide opties slagen er tot op heden in om een minimale verbetering in de detectielimiet te genereren maar geen van beide geeft voldoende verbetering om fysiologische veranderingen te meten. [4, 6] Buiten deze twee onderzoeken zijn er nog verscheidene andere groepen actief op vlak van biosensoren, met elk hun eigen aanpak.

1.3 Optische, antilichaam gebaseerde immunosensor

1.3.1 Achtergrond

Er zijn vijf antilichaamfamilies bekend in het menselijke immuunsysteem: IgA, IgM, IgG, IgD en IgE. Elk van deze antilichaamcomplexen worden aangemaakt door B-lymfocyten, zij het elk in zijn unieke context.

IgG, afgebeeld in figuur 2, waar in dit project onderzoek mee zal worden uitgevoerd, is het meest voorkomende en best gekende antilichaam. De typische dimeer structuur wordt gevormd door twee monomeren opgebouwd uit een lichte (LC) en een zware (HC) proteïneketen. Het geheel is door zwavelbruggen tot één stabiel molecuul verenigd. Beide ketens bestaan uit twee types proteïne domeinen, de constante domeinen, welk bij ieder IgG molecuul identiek is. Hiervan heeft de LC maar een enkel domein en de HC drie domeinen, waar tussen het eerste en het tweede een scharnier regio zit. Vervolgens zijn de variabele domeinen aanwezig als bindingssites van een antilichaam, welke verantwoordelijk zijn voor de herkenning van zeer specifieke antigen structuren. Het zijn deze delen welke met de TCR kunnen uitgewisseld worden en het toelaten om dit model van biosensor aan elk mogelijk targetmolecuul te adapteren.



Figuur 2: Schematische voorstelling van een IgG molecuul. Immunoglobuline G met weergave van de constante (C) en variabele (V) delen alsook de lichte (L) en zware (H) ketens.

Er wordt geopteerd om met fluorescente antilichaam labelingstechnieken te werken, hoofdzakelijk omdat deze ontwikkeling ingeschakeld kan worden in toepassingsgebieden zoals oppervlakte karakterisatie. Hiernaast levert het een efficiënte methode om de antilichaam-antigen binding na te gaan, zoals beschreven wordt in paragraaf 1.3.3, waarvan later eenvoudig een extrapolatie uitgevoerd kan worden naar de T-cel receptor van de cellulaire pathways, gebruikt in een cellulaire sensor.

1.3.2 Fluorescentie

Fluorescentie is een optisch fenomeen waar de absorptie van een foton, het excitatielicht, ervoor zorgt dat een molecule in een geëxciteerd energieniveau terecht komt. Wanneer dat molecule daarna terugvalt in haar grondtoestand, praktisch onmiddellijk, wordt een foton van een langere golflengte afgegeven, het emissielicht. Het verschil in energie tussen de geabsorbeerde en geëmitteerde fotonen komt vrij in de vorm van trillingen of warmte. De golflengte van het excitatielicht dat nodig is hangt af van de eigenschappen van het fluorescerende molecule. Deze beïnvloedt dan weer de golflengte van het emissielicht, welke altijd van een langere golflengte is, minder energie heeft dus. Het verschil tussen de excitatie- en emissiegolflengte wordt de '*Stokes Shift*' genoemd, deze is onafhankelijk van de golflengte zelf en bepaald door het type fluorofoor.

Dit fenomeen kan weergegeven worden aan de hand van de volgende formules:



S_0 en S_1 stellen respectievelijk het grondniveau en een geëxciteerd energieniveau voor in een Jablonski Diagram. [7] $h\nu$ representeert de energie van één foton, waar h de constante van Planck is en ν de frequentie voorstelt.

Enkele andere belangrijke aspecten van fluorescentie zijn '*Quantum Yield*' of kwantumopbrengst (symbool = ϕ), de verhouding van het aantal geëmitteerde fotonen over het aantal geabsorbeerde fotonen. De maximum fluorescentie kwantumopbrengst is 1.0 of 100%, dit is wanneer alle geabsorbeerde fotonen ook terug uitgezonden worden. In de praktijk ligt deze opbrengst meestal lager en een kwantumopbrengst van 0.1 of 10% wordt nog steeds gezien als redelijk fluorescent.

Een derde eigenschap is de '*Fluorescence Lifetime*', hiermee wordt de tijd dat een fluorofoor in haar geëxciteerde staat blijft voordat ze een foton emitteert bedoeld. Aangezien fluorescentie de eerste-orde kinetica [7] volgt kan deze eigenschap in de volgende formule weergegeven worden:

$$[S_1] = [S_1]_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

$[S_1]$ is de concentratie geëxciteerd fluorofoor op tijdstip = t , $[S_1]_0$ representeert de initiële concentratie onmiddellijk na excitatie. De vervalratio van de geëxciteerde staat wordt voorgesteld als volgt:

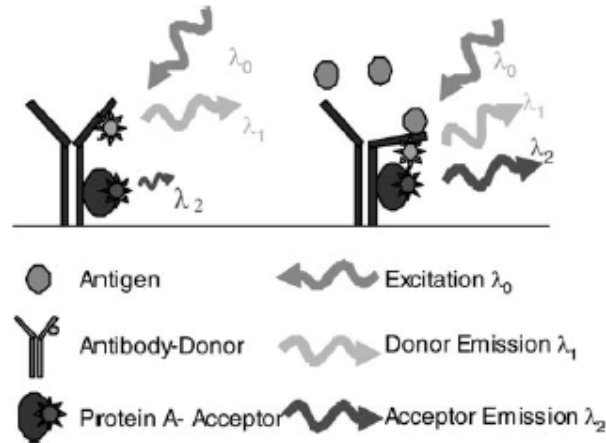
$$\tau = 1/\sum_i k_i$$

Typische vervalratios voor fotonen tussen het ultraviolette (UV) en infrarode (IR) spectrum vallen binnen het bereik van 0.5 tot 20 nanoseconden.

1.3.3 'Fluorescence Resonance Energy Transfer'

'*Fluorescence resonance energy transfer*' (FRET) biedt ons een methode aan om conformatie veranderingen van proteïnes te detecteren, zoals onder andere optreedt bij interactie van een antilichaam met antigen. Een voorbeeld van dergelijke conformatie verandering is weergegeven in figuur 3. [8] Hierbij wordt de emissie energie van één fluorofoor gebruikt om

een tweede fluorofoor te exciteren, waardoor deze laatste licht van een bepaalde frequentie uitzendt. De energieoverdracht gebeurt zonder vrijzetting van energie in de vorm van licht.



Figuur 3: Schematische voorstelling van het FRET principe bij antilichamen. FRET treedt op tussen een gelabeld immunoglobuline en een gelabeld proteïne A (variatie op proteïne G, dat in deze studie wordt gebruikt) complex, nadat een antilichaam van conformatie verandert door herkenning van het bijhorende antigen.

Dit kan enkel gebeuren wanneer beide moleculen, ook donor-acceptor paren genoemd, zich dicht genoeg bij elkaar bevinden door de antilichaam conformatie verandering. Een volgend belangrijk punt is dat de emissie frequentie van de donor in overlap ligt met de excitatie frequentie van de acceptor alsook dat beide emissie frequenties onderscheidbaar zijn van elkaar, met andere woorden zo weinig mogelijk overlappen. Deze eigenschappen worden in de volgende formule samengevat:

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

De FRET efficiëntie is gedefinieerd als E , uit de rest van de formule kan afgeleid worden dat deze efficiëntie afhangt van r , de afstand tussen donor en acceptor fluorofoor en R_0 , de Förster afstand. Deze laatste is de donor-acceptor afstand wanneer de efficiëntie gelijk is aan 50%. De Duitse wetenschapper, Theodor Förster, heeft het FRET principe ontdekt, waardoor het soms de naam 'Förster resonance energy transfer' krijgt. [7]

1.3.4 FRET paren

Om aan de vereiste parameters te voldoen is het belangrijk om de correcte donor en acceptor moleculen samen te voegen. Deze FRET paren worden gekozen aan de hand van hun excitatie en emissie spectra. In de volgende tabel wordt een overzicht gegeven van verscheidene bruikbare koppels.

Tabel 1: Overzicht van mogelijke FRET paren.

FRET paren weergegeven met de maximale excitatie en emissie golflengtes voor respectievelijk de donor en acceptor fluoroforen, alsook mogelijke opmerkingen.

FRET paar	Opmerkingen	Donor excitatie	Acceptor emissie
FAM - TAMRA		491 nm	566 nm
BFP - EGFP	bleking, lage kwantum opbrengst	370 nm	508 nm
ECFP - dsRED		440 nm	595 nm
Cy3 - Cy5		553 nm	665 nm
ECFP - EYFP		440 nm	527 nm
Alexa488 - Alexa555		488 nm	567 nm
Alexa546 - Alexa594		546 nm	617 nm
FITC - TRITC	bleking	495 nm	577 nm
DMACA -FITC		376 nm	520 nm
EGFP – Rhodamine 123	excitatie overlap	490 nm	528 nm
FITC - Cy3		495 nm	565 nm

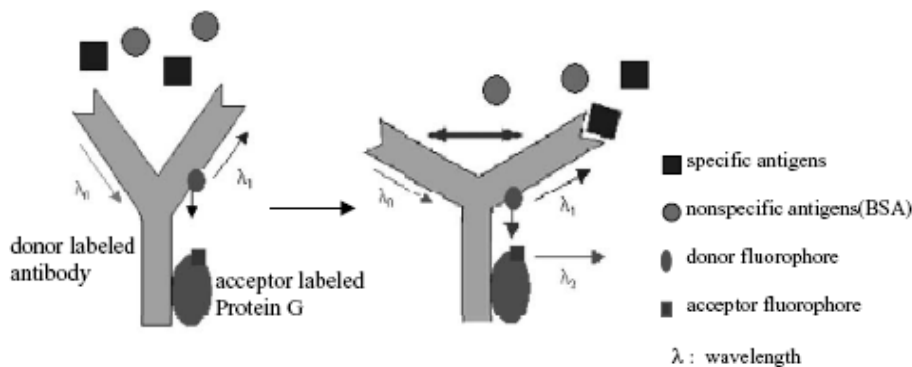
Buiten de hierboven gegeven mogelijkheden zijn er nog meerdere andere opties mogelijk. In kader van dit project wordt geopteerd om het Alexa 546 – Alexa 594 paar te gebruiken. Dit in de eerste plaats omdat Alexa fluoroforen zeer stabiel zijn en langdurige fluorescentie verzekeren. Ook zijn deze fluorescente ‘dyes’ vrij beschikbaar in commerciële labelingskits en is hun werking met het FRET principe aangetoond in voorgaande studies. [8]

Probleemstelling

Een van de bijhorende moeilijkheden bij het construeren van een biosensor is het bestuderen van de oppervlakte distributie en de biologische beschikbaarheid van aangehechte biomoleculen. Er zijn tot op heden weinig mogelijkheden om de functionele aanhechting van moleculen zoals antilichamen of enzymen op glas-, silica- of polymeer oppervlakten topografisch te bestuderen. De beschikbare methodes zijn eerder omslachtig of kunnen enkel in tussenstadia van de biosensorontwikkeling gebruikt worden, maar geven weinig of geen informatie over de biologische functionaliteit.

Een optisch uitleesbare detectie van de binding van antigen met het antilichaam is een geschikte methode om, analoog aan labelvrije impedimetrische immunosensoren, de topografische verdeling van functionele antilichamen op het sensoroppervlak te bestuderen. Een labelvrij, vanuit het target bekeken, detectiesysteem dat gebaseerd is op fluorescentie biedt niet enkel de mogelijkheid om de homogeniteit van de verdeling van antilichamen op een oppervlakte te bestuderen, maar is op zichzelf eveneens bruikbaar als immunosensor. Met behulp van deze methode kan de bindingstrategie geoptimaliseerd worden en de verkregen kennis kan gebruikt worden om de gevoeligheid van impedimetrische immunosensoren te verhogen.

De moleculaire constructie van deze labelvrije optisch uitleesbare immunosensor systemen kan gebeuren op verschillende manieren. Vooreerst worden antilichamen door middel van directe labeling voorzien van een Alexa 546 fluorescent label. Daarnaast wordt Proteïne G (PG), een 65kDa groot molecule, oorspronkelijk gedetecteerd in Streptococcus bacteriën, gelabeld met het acceptor fluorofoor Alexa 594. PG is een immunoglobuline-bindend proteïne, welk een hoge affiniteit vertoont voor de Fc fragmenten van IgG's. Het gebruikte proteïne is een recombinant van de natuurlijke vorm waarvan de affiniteit voor Albumine verwijderd is voor een uitsluitende binding van immunoglobulines. [9] Een fusie van deze twee gelabelde moleculen (figuur 4), laat toe om targetmoleculen te detecteren door middel van een energie transfer tussen donor en acceptor fluoroforen (FRET), zoals beschreven in paragraaf 1.3.3.



Figuur 4: Voorbeeld van een FRET gebaseerde immunosensor. Hier worden de conformatieverandering, en bijhorende afstands aanpassing tussen donor en acceptor, van het antilichaam bij antigeen binding weergegeven. [8]

In een alternatieve benadering worden gelabelde antilichamen aangemaakt via recombinant DNA technologie. Hierbij worden de coderende sequenties van de lichte en de zware keten uit de hybridoma cellijn geïsoleerd en via genetische recombinatie gekoppeld aan tagsequenties die toelaten om op een controleerbare manier donor en acceptor fluoroforen te koppelen aan het recombinant geproduceerde antilichaam. Deze benadering maakt het mogelijk om de exacte locatie van de fluorescente labels en de labelingsgraad beter te controleren.

Uit het mRNA van de hybridoma wordt het cDNA van de lichte en de zware keten met behulp van de 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) geamplificeerd en vervolgens overgebracht in een kloneringsvector. Na transformatie van E. Coli worden klonen geselecteerd en de sequenties worden gecontroleerd met gekende antilichaam sequenties in databases. Geschikte klonen worden vervolgens gekoppeld aan tags die als target optreden voor het O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Door middel van deze enzymatische reactie kan dan, na productie van het recombinant antilichaam, een koppeling uitgevoerd worden met verschillende fluoroforen. [10]

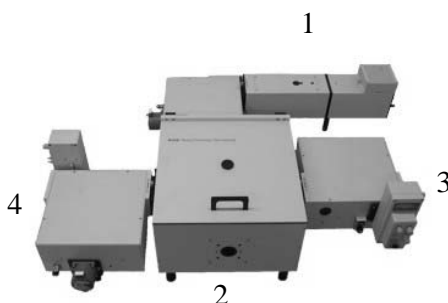
Het voordeel van zulke tag sequenties is dat deze slechts zeer korte proteïnes aanhechten aan het doelwitewit en dus weinig risico inhouden voor de functionaliteit van het originele molecuul. Meerdere tags zijn beschikbaar en specifiek, zodat labeling met verschillende fluoroforen mogelijk wordt. De labels kunnen via een enzymreactie zeer nauwkeurig aan hun specifiek tag vastgehecht worden. Het uiteindelijke resultaat is een antilichaam waarbij de lichte keten is gelabeld met een donor fluorofoor en de zware keten met een acceptor fluorofoor.

2. Materialen en Methoden

2.1 Apparatuur

2.1.1 Fluorimeter

De QM-6/2005 T-format photon-counting fluorimeter, geproduceerd door Photon Technology International (PTI), kan worden ingeschakeld om fluorescente emissie bij specifieke golflengtes alsook over een volledig spectrum te meten. Dankzij haar T-formaat kan dit in twee verschillende, of identieke settings ter controle, gelijktijdig gebeuren.



Figuur 5: QM-6/2005 fluorimeter van PTI. Weergegeven met lamp behuizing (1), meetkamer (2) en monochromatoren met fotomultipliers (3, 4)

Deze fluorimeter maakt gebruik van een 150W xenon lamp als lichtbron, welke een hoge lichtintensiteit kan produceren over een breed spectrum. Het nadeel hiervan is dat deze lamp een koelsysteem vereist tegen oververhitting. De fluorimeter heeft voor excitatie en emissie een golflengte spectrum gaande van het UV gebied, 250nm, tot aan het IR gebied, 800nm.

Er kan gewerkt worden met fluorescentie cuvetten van verschillende afmetingen, absorptie cuvetten zijn onbruikbaar door het T-formaat. Het apparaat is standaard uitgerust met een cuvethouder voor cuvetten van 10mm padlengte. De meethoogte ligt op 15mm. Kleinere cuvetten dienen voorzien te zijn van een adapter alvorens ze bruikbaar zijn.

2.1.2 Spectrofotometer

De Smartspec Plus van Bio-Rad Laboratories, inc. is een UV / VIS spectrofotometer met een meetspectrum van 200nm tot 800nm. Dit apparaat is bruikbaar om proteïnes, DNA en RNA concentratiebepalingen te doen, celcultuur groei te bestuderen, eenvoudige kinetische assays en golflengte scans met piek detecties. De Smartspect Plus maakt gebruik van kwarts absorptiecuvettes met een padlengte van 10 mm en een meethoogte van 8,5 mm.

2.1.3 Platereader

De FLUOstar OPTIMA van BMG LABTECH is een volledig geautomatiseerde micro-plate reader. Er wordt een hoge intensiteit Xenon flits lamp gebruikt als lichtbron, samen met glasvezel kabels om het licht te bundelen en naar de detector te leiden. Hierdoor beschikt de FLUOstar OPTIMA over een golflengte spectrum van 230nm tot 900nm voor de excitatie en emissie. Elk type microwell plaat van 6- tot 384-well platen kan gemeten worden in alle vier de detectiemethodes.

2.1.4 PCR thermal cycler

De ICycler en MyCycler PCR toestellen van Bio-Rad Laboratories hebben standaard een 96-well reactiemodule voor 0,2 ml tubes, platen en strips.

2.1.5 Sequencer

De 310 Genetic analyzer wordt geproduceerd door Applied Biosystems. Dit geautomatiseerd DNA sequencing apparaat maakt gebruik van een capillair om DNA fragmenten te scheiden op lengte en tot 5 verschillende gekleurde labels gelijktijdig af te lezen.

2.1.6 Vacuum indamper

De Concentrator 5301 van Eppendorf maakt gebruik van een vaste-hoek rotor en vacuüm pomp samen met een verwarmingselement om tot 144 stalen gelijktijdig te concentreren.

2.2 Materialen

2.2.1 Antilichamen en proteïne G

Voor de constructie van het FRET systeem werd gebruikt gemaakt van het Monoclonale antilichaam: Anti-CRP, 0.95mg/ml, kloon 3C2H5, lot: 3C2 280405 geproduceerd door Biomed, Hasselt.

Anti-CRP complexeert met C-reactive protein (CRP). CRP is een 25kDa groot plasmaproteïne dat wordt geproduceerd door de lever. Dit proteïne wordt in de levercellen aangemaakt en vervolgens in de bloedbaan gesecreteerd bij een acute inflammatie van hart of bloedvaten. CRP is verantwoordelijk voor de activatie en stimulatie van macrofagen en andere fagocyten, zodat de oorzaak van inflammatie kan opgeruimd worden. Dit maakt CRP ideaal als vroegtijdige merker voor atherosclerose, hartinfarcten en andere hart- en vaatziekten. [11] Aangezien het bovendien in relatief grote concentraties circuleert, is CRP een ideaal target proteïne voor de ontwikkeling en optimalisatie van biosensoren.

Het recombinant proteïne G, 1mg/ml, lot: 60605800 werd verkregen bij Invitrogen, Zymed te San Francisco, US. PG is een immunoglobuline-bindend proteïne, welk een hoge affiniteit vertoont voor de Fc fragmenten van IgG's. Het gebruikte proteïne is een recombinant van de natuurlijke vorm waarvan de affiniteit voor Albumine verwijderd is voor een uitsluitende binding van immunoglobulines

2.2.2 Recombinant DNA technologie

Voor de recombinante antilichaam constructie wordt gekozen voor het antilichaam tegen Prostate Specific Antigen (PSA). Dit is een serine protease enzyme dat praktisch uitsluitend geproduceerd wordt door de prostaatklier cellen. Dit proteïne kan in zeer lage concentraties gedetecteerd worden in het bloed van gezonde mannen maar wordt sterk verhoogd wanneer er sprake is van kanker of andere vormen van schade aan de prostaat. Om deze reden is PSA momenteel een veelvuldig gebruikte merker voor het vroegtijdig opsporen van prostaat kanker, in de gelokaliseerde en gemetastaseerde vorm. [12]

Messenger RNA voor de antilichaam constructie wordt verkregen uit hybridoma cellijnen van Balb/C muizen: 4C8, 6D8, 3E6 en 2F8. Alle cellijnen zijn aangemaakt binnen Biomed, Hasselt.

2.3 Methoden

2.3.1 Antilichaam en PG labeling

De antilichaam en PG labeling met Alexa 546 en Alexa 594, respectievelijk wordt uitgevoerd met een labelingskit. De fluorescente labels werden verkregen uit de kits: Alexa fluor 594 Monoclonal Antibody Labeling Kit, A-20185, en Alexa fluor 546 Monoclonal Antibody Labeling Kit, A-20183, beide afkomstig van Invitrogen, Molecular Probes te Paisley, UK. De bijgeleverde instructies worden hiervoor opgevolgd.

2.3.2 Fusionering en coating van 96-well plaat met antilichaam-PG complexen

Fusies van gelabeld PG met gelabeld antilichaam worden verkregen door beide oplossingen overnacht te incuberen op 4°C. Dit kan uitgevoerd worden in twee settings:

Ofwel worden de moleculen opgelost in Phosphate Buffered Saline (PBS), stock 10x PBS (1.30M NaCl , 50.0mM Na₂HPO₄, 20.0 mM KH₂PO₄) in de gewenste concentraties en incubatie overnacht, waarna de coating op 96-well platen gebeurt met toevoeging van coatingbuffer (20.0mM Na₂CO₃, 30.0mM NaHCO₃, 2.0mM NaN₃) en een tweede overnacht incubatie op 40°C.

Een tweede optie is om de fusionering en coating gelijktijdig laten op te gaan door het antilichaam en PG in coatingbuffer op te lossen en overnacht te incuberen in een 96-well plaat op 4°C.

2.3.3 cDNA aanmaak

Het verkregen RNA dient te worden omgezet in copy DNA (cDNA) alvorens dit geamplificeerd kan worden. Dit gebeurt door middel van de volgende reversed transcriptase reactie: 5xEZ buffer, 250mM bicine, 575mM kalium acetaat, 40% glycerol; 10mM MnCl₂;

3,2µmol dNTP's in een 10mM concentratie; 2,5U/µl rTth DNA polymerase en 15µM Oligo dT primer. Hierbij wordt 5µl mRNA toegevoegd en het geheel aangevuld met RNase vrij water tot een totaal reactievolume van 20µl.

Deze reactie wordt op 70°C gehouden voor 15 tot 30 minuten, waarna het geheel op ijs gezet wordt en bewaard wordt bij -20°C. Alle reagentia komen uit de cDNA synthese kit van Applied Biosystems, New Jersey.

2.3.4 PCR amplificatie

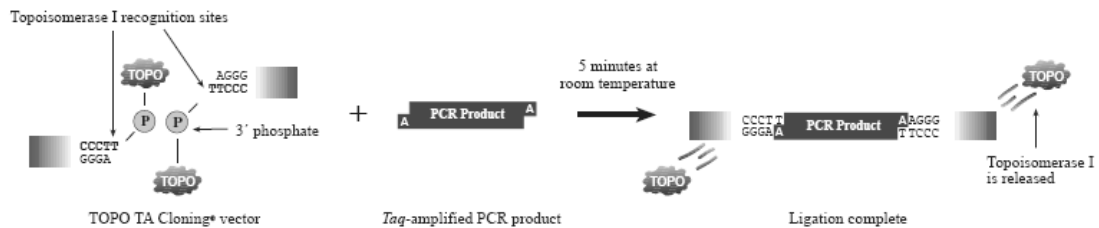
Voor de PCR amplificatie wordt 5µl cDNA in een 20µl reactievolume gebruikt, hierin zit PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200µM van elke dNPT, 1µM van elke primer en 1 unit Taq DNA polymerase. Het standaard PCR programma houdt een eerste denaturatiestap van 5 minuten op 94°C in, gevolgd door 40 cycli waarin 20 seconden gedenuatureerd wordt op 94°C, 20 seconden op 55°C voor de annealing en 40 seconden op 72°C voor de elongatie. Dit wordt gevolgd door een finale elongatiestap van 6 minuten op 72°C, waarna het geheel bewaard wordt op 4°C.

Controle van de PCR fragmenten dient te gebeuren door middel van een 1% agarose gel, waarin ze gedurende 30 minuten bij 150V gescheiden worden. Er wordt gebruik gemaakt van een 100 bp ladder met een maximale meetlengte van 2000 bp. Indien de verkregen bandjes van de verwachte lengte zijn kunnen deze uitgesneden en opgezuiverd over sephadex kolommen worden.

2.3.5 TOPO TA klonering

Allereerst dienen enkele platen met LB agar, waaraan 1µl ampicilline per ml agar toegevoegd is, gegoten te worden, zodat deze tijdig kunnen afkoelen. Om de transformatie reactie in te zetten worden de volgende componenten samengevoegd: 0,5 tot 2µl PCR product, 1µl pCR-TOPO vector en het geheel aanvullen met MilliQ tot een totaal volume van 5µl.

Deze reactie wordt licht opgemengd en 5min op kamertemperatuur geïncubeerd. Hierna wordt het reactiebuisje kort afgedraaid en op ijs bewaard.



Figuur 6: Topo transformatie met behulp van topoisomerase I. Een schematische weergave van de ligatiereactie die optreedt met behulp van Topoisomerase I. In de eerste stap wordt het gefosforyleerd topoisomerase I aan de herkenningssites van het plasmide, vervolgens wordt het PCR product, geamplificeerd met Taq en voorzien van adenosine uiteindes, gecapteerd door Topoisomerase I. Het PCR product zal ligen en het plasmide sluiten, terwijl Topoisomerase I defosforyleert en zich verwijderd van het plasmide.

Er wordt 2µl van de transformatie reactie aan een buisje One Shot Top-10 competente E. Coli cellen toegevoegd en lichtjes gemengd. De reactie wordt op ijs geïncubeerd gedurende 30 minuten, waarna de cellen voor 30 seconden in een waterbad van 42°C geplaatst worden voor de heat shock stap. De Top-10 cellen dienen gedurende twee minuten te recupereren op ijs. Vervolgens wordt er 250µl SOC medium (2% tryptone, 0.5% gistextract, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 10.0mM MgSO₄, 20.0mM glucose) aan de tubes toegevoegd en worden de E. Coli cellen gedurende 30 minuten bij 37°C horizontaal geschud aan 150-200 tpm om de ampicilline selectie te laten opgaan. Tijdens deze fase kunnen de afgekoelde LB platen gecoat worden met 40µl X-galactose, wat egaal uitgestreken wordt over de oppervlakte. Nadat de E. Coli cellen voldoende opgegroeid zijn kunnen ze worden verdeeld over de platen door 100µl cellen toe te voegen en uit te strijken. Hierna worden deze platen overnacht bij 37°C bewaard.

2.3.6 Kolonie PCR

Geïsoleerde witte of licht blauwe kolonies worden aangeprikt met een pipetpunt en opgelost in 20µl SOC medium gebruikt als vloeibaar medium voor bacteriegroei. Hiermee wordt een kolonie PCR uitgevoerd, volgens het protocol van de amplificatie PCR. Na de PCR reactie worden de producten op een 1% agarose gel geladen en gedurende 30 minuten bij 150V gescheiden.

Tabel 2: Sequenties van de M13 Primers voor kolonie PCR

De M13-FOR en M13-REV primers zijn bijgevoegd in de TOPO kit en hechten aan specifieke locaties op de plasmiden, nabij het insert.

Kolonie PCR Primers

M13-FOR 5' – CTGGCCGTCGTTTTAC – 3'

M13-REV 5' – CAGGAAACAGCTATGAC – 3'

Een geslaagde transformatie reactie geeft een DNA fragment weer dat ongeveer 100 bp groter is dan het eigenlijke verwachte insert, dit doordat er korte stukken van de TOPO vector mee geamplificeerd zijn.

Na controle worden de geselecteerde kolonies opgegroeid in vloeibaar SOC medium, waaraan 0,1% ampicilline toegevoegd wordt. Dit gebeurt overnacht op 37°C terwijl de buisjes geschud worden aan 150 - 200 tpm.

2.3.7 Plasmidebereiding (miniprep)

Alvorens met de plasmide extractie te beginnen wordt er een bacteriestock aangelegd. Hiervoor wordt 500µl bacteriecultuur samengevoegd met 500µl glycerol 60% en opgemengd. Deze stock wordt bewaard op -80°C.

De volledige bacteriecultuur wordt overgebracht in epjes, welke gecentrifugeerd worden op 14.000 tpm. Het supernatans wordt hiervan verwijderd, waarna de pellet geresuspendeerd wordt in 100µl resuspensiebuffer (50.0mM glucose, 25.0mM Tris-HCL, 10.0mM EDTA) hierbij wordt 0.3µl RNase toegevoegd. Nadat de pellet geresuspendeerd is met behulp van vortexen kan 200µl lysisbuffer (0.4M NaOH, 2% SDS) toegevoegd en opgemengd worden. Dit geheel dient 5 minuten op ijs te staan alvorens er 150µl neutralisatiebuffer (5M kaliumacetaat, 11,5% azijnzuur) wordt bij gedaan om de pH te neutraliseren gedurende de volgende 5 minuten op ijs.

Deze reactie wordt op 13.000 tpm gecentrifugeerd gedurende 10 minuten, waarna het supernatans wordt overgebracht in een nieuw epje en de procedure herhaald wordt. Na deze

tweede centrifugatiestap kan het supernatans opgezuiverd worden over Sephadex G-50. Hierop volgen twee wasstappen, in de eerste wordt 1000µl 100% ethanol toegevoegd op -20°C. Het geheel wordt bij -20°C bewaard gedurende minstens een uur om de precipitatie reactie op te laten gaan. Na de precipitatie volgt een centrifugatiestap van 30 minuten op 13.000 tpm bij 4°C. De tweede wasstap gebeurt op 4°C en maakt gebruik van 500µl 70% ethanol en een centrifugatie van 15 minuten op 13.000 tpm. Als laatste wordt het pellet zo volledig mogelijk afgepipeteerd en opgedroogd in de Concentrator. Dit pellet kan worden opgelost in 20-50µl MilliQ water, afhankelijk van de hoeveelheid plasmide DNA.

2.3.8 Sequentie PCR

Alvorens de sequentie bepaling kan ingezet worden dient het plasmide insert met behulp van een sequentie PCR geamplificeerd te worden. Deze reactie zal op willekeurige nucleotidelengtes een gelabeld ddNTP inbouwen, wat automatisch verdere verlenging van dat DNA segment verhindert. De verhoudingen aan ddNTP's en dNTP's in de Big Dye reactie is zo samengesteld dat er amplicons van elke mogelijke lengte geproduceerd worden, welke vervolgens in de sequencer afgelezen kunnen worden.

De gebruikte kit: Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing, is van Applied Biosystems, Californie. De bijgeleverde instructies werden opgevolgd voor de preparatie van de sequentie PCR.

Om de plasmides te controleren op een correcte transformatie wordt een sequentie bepaling uitgevoerd op de plasmidestalen. Hiervoor wordt een Big Dye PCR mix gebruikt, deze mix bevat dNTP's, alsook fluorescent gelabelde ddNTP's en een taq polymerase van ABI

2.3.9 Sequencing

Alvorens het product van een sequentie PCR in de sequencer geladen kan worden wordt het opgezuiverd over Sephadex G-50 om de vrije NTP's en primersequenties te verwijderen. Hierna wordt er 15-20 µl formamide toegevoegd zodat er minstens een totaal volume van

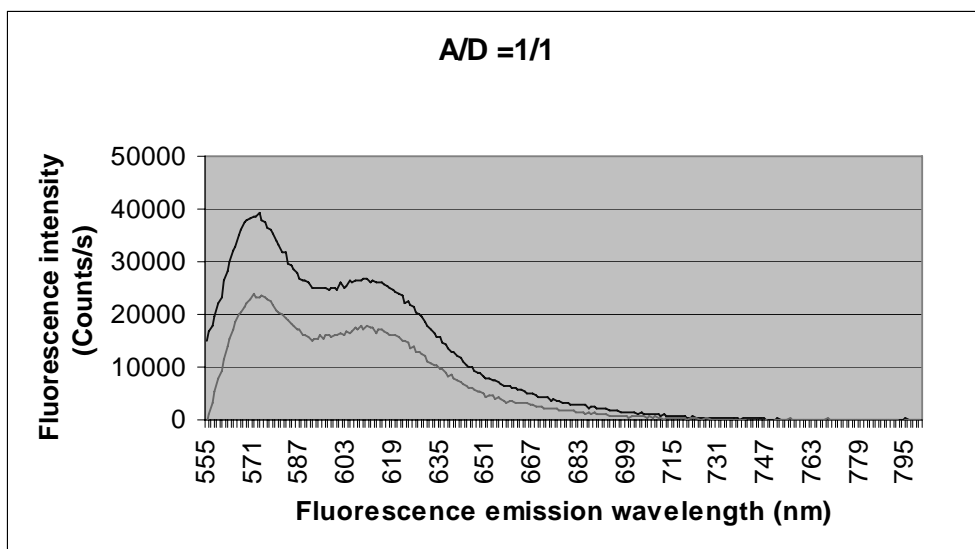
25µl aanwezig is. Nadat de stalen in sequentie epjes geplaatst zijn, kunnen ze door het apparaat geanalyseerd worden.

3. Resultaten

3.1 Optische sensor

3.1.1 Karakterisatiemetingen

Als piloot experiment worden anti-CRP en PG gelabeld met behulp van antilichaam labelingskits: Alexa fluor 546 en Alexa fluor 596, respectievelijk. Dit gebeurt volgens het bijgevoegde protocol met een standaard concentratie van 0.95mg/ml voor anti-CRP en 1mg/ml voor PG. Een verdunningsreeks wordt samengesteld voor beide moleculen. Met deze verdunningsreeksen worden verscheidene karakterisatiemetingen uitgevoerd op de PTI fluorimeter. Er worden volledige spectra opgenomen, te beginnen van 250 nm tot aan 800 nm voor elke conditie. Hetzelfde wordt uitgevoerd met fusies, welke in oplossing overnacht gefusioneerd werden, tussen Anti-CRP en PG. Om de optimale verhouding tussen de acceptor (A), Alexa 546, en de donor (D), Alexa 594, vast te stellen worden de fusies uitgevoerd in verschillende A/D verhoudingen: 1/5, 1/2, 1/1, 2/1 en 5/1. Hiervan blijkt een 1/1 verhouding beide fluorescente labels voldoende in beeld te brengen, zodat een verschil in beide optimaal detecteerbaar is. Om deze redenen wordt verder gewerkt met een A/D verhouding van 1/1.



Figuur 7: Fluorescentiespectrum van A/D = 1/1. Geeft een emissiespectrum weer over de breedte van 555 nm tot 800 nm, gemeten op de fluorimeter, bij excitatie op 540 nm. Twee grafieken zijn ontstaan door de twee monochromatoren en verschillen enkel in intensiteit. De eerste piek geeft het donor molecule weer, terwijl de tweede piek het acceptor fluorofoor representeert.

Aan de hand van deze voorlopige metingen worden de optimale emissie- en excitatiemeetpunten bepaald voor het verdere verloop van dit onderzoek. De emissie wordt voortaan uitgevoerd bij 510 of 540nm, terwijl donor excitatie gemeten wordt bij 570nm en acceptor excitatie bij 612nm.

3.1.2 Optimalisatie

Door middel van een UV/Vis spectrofotometer wordt de concentratie en labelingsgraad van elke individuele labeling gemeten. De gelabelde anti-CRP en PG oplossingen worden apart gemeten op de volgende golflengtes respectievelijk: 280nm en 558nm, 280nm en 590nm. Met deze informatie kan de concentratie van het aanwezige proteïne alsook deze van de aanwezige fluorescente labels bepaald worden. Deze twee waarden laten het toe om de gemiddelde labelingsgraad vast te stellen per molecule.

Tabel 3: Weergave van de proteïneconcentraties voor anti-CRP en PG voor de verschillende labelingsgraden

De concentraties van anti-CRP en PG zijn weergegeven in molair, voor de verschillende labelingsgraden: proteïne over label

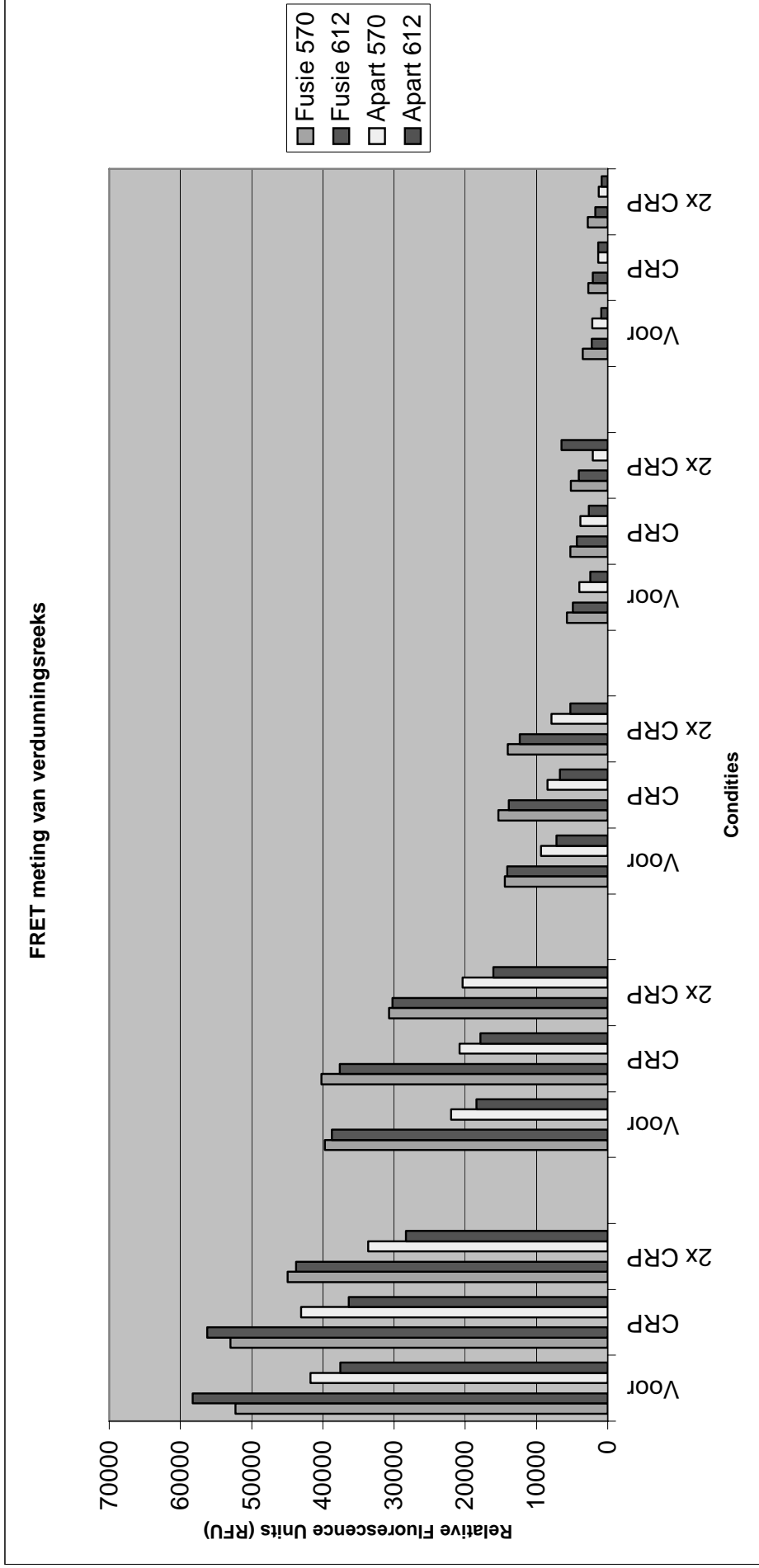
<u>Anti-CRP</u>		<u>Proteïne G</u>	
P/L:	Conc.:	P/L:	Conc.:
1/1	1,24.10 ⁻⁶ M	1/2	0,07.10 ⁻⁶ M
1/2	2,09.10 ⁻⁶ M	1/4	0,06.10 ⁻⁶ M
1/4	1,34.10 ⁻⁶ M	1/8	0,03.10 ⁻⁶ M

Met behulp van deze data in worden de labelingscondities aangepast om een breder spectrum van gelabelde proteïnen te verkrijgen. Anti-CRP en PG worden gelabeld in de volgende verhoudingen proteïne over fluorescent label (P/L): 1/1, 1/2, 1/4 en 1/8. Dit resultaat wordt bekomen door ofwel de labelingsduur, ofwel de hoeveelheid ongelabeld proteïne, ofwel de hoeveelheid Alexa label aan te passen. De proteïneconcentraties die bepaald werden voor deze condities zijn weergegeven in tabel 2.

3.1.4 FRET metingen

Verschillende fusies worden bereid door combinaties van een equimolaire hoeveelheid anti-CRP en PG samen te stellen met verschillende labelingsgraden. Al deze fusies worden gecoat op de bodem van 96-well platen in de optimale concentratie, samen met een blanco en de bijhorende anti-CRP en PG labelingen apart wordt hiervan de fluorescentie intensiteit van donor en acceptor gemeten met behulp van de FLUOstar plaatlezer. Nadat de ongebonden waarden bepaald zijn wordt er een gelijke concentratie CRP toegevoegd aan de fusies, welke we gedurende enkele minuten laten incuberen alvorens we een nieuwe fluorescentiebepaling uitvoeren. Van voorgaande onderzoeken op het gebied van immunosensoren is geweten dat antigen-antilichaam interacties zich voordoen binnen één tot drie minuten na toevoeging van het antigen. [4] Deze stap wordt nog een tweede keer herhaald na een 10 minuten durende wachtperiode wanneer een tweede dosis CRP op de antilichamen losgelaten wordt. Vervolgens worden de drie bekomen fluorescentie intensiteit paren vergeleken en bestudeerd op de aanwezigheid van FRET.

Uit de verscheidene condities die gemeten zijn, worden hier de waarden weergegeven voor een verdunningsreeks van de fusie tussen anti-CRP en PG, beiden met een gemiddelde labelingsgraad van twee fluorescente groepen per molecule (1/2). De originele concentraties, weergegeven in tabel 2, worden gelijkgesteld aan deze van het anti-CRP en vervolgens 25x verdund. Hiermee wordt een verdunningsreeks opgesteld van vijf verschillende concentraties, met verdunningsstappen van 2x.



Figuur 8: FRET metingen van een verdunningsreeks

'Fluorescence resonance energy transfer' meting met de FLUOstar plate reader van een verdunningsreeks van de anti-CRP en PG fusie, beiden met een gemiddelde labelingsgraad van twee fluorescente groepen per molecule (1/2). Verdunningen: x25, x50, x100, x200, x400 gestart vanuit de concentratie weergegeven in tabel 2. De eerste twee kolommen stellen de relatieve fluorescentie van de fusie bij 570 nm en 612 nm, respectievelijk, voor. De volgende twee kolommen geven de som van de fluorescentie voor de aparte anti-CRP en PG moleculen weer bij 570 nm en 612 nm. Deze waarden zijn weergegeven per verdunning voor de drie condities, Voor: gemeten zonder toevoeging van CRP; CRP: gemeten na een eerste CRP toevoeging, 2x CRP: gemeten na een tweede toevoeging van CRP.

De bovenstaande figuur 8 geeft de verdunningsreeks weer van anti-CRP en PG, beiden moleculen met gemiddeld twee labels. De fluorescentie wordt gemeten in '*Relative Fluorescence Units*' (RFU), dit voor drie condities welke aan het begin van deze paragraaf reeds besproken werden. De eerste kolom, gemeten bij 570 nm, stelt de fluorescentie van het anti-CRP met donor fluorofoor voor, terwijl de volgende kolom, gemeten bij 612 nm, deze voorstelt van het PG met acceptor fluorofoor. In de realiteit zijn dit enkel de voornaamste bijdragen aan beide intensiteiten. De fluorescentie van PG zal nog steeds een kleine invloed hebben op de fluorescentie gemeten bij 570 nm door de breedte van het emissiespectrum, hetzelfde geldt voor anti-CRP en de meting bij 612 nm. De twee hierop volgende kolommen dienen als controle, ze stellen ook de fluorescentie intensiteiten bij 570 nm en 612 nm voor, maar de som van het apart gemeten anti-CRP en PG. In deze kolommen kan uiteraard nooit sprake zijn van FRET detectie.

Deze resultaten zijn gelijkaardig aan de metingen van de andere condities, buiten een dalende trend over de tijd is er geen duidelijk FRET signaal gemeten. Er wordt dan ook geopteerd om deze experimenten stil te leggen en alternatieve technieken aan te boren. De mogelijkheden van recombinant DNA technologie bij de constructie en fluorescente labeling van antilichamen worden onderzocht in het vervolg van dit project.

3.2 Recombinante antilichaam klonering

mRNA vanuit vier verschillende hybridoma cellijnen: 3E6, 6D8, 4C8 en 2L8 werd ter beschikking gesteld. Deze cellijnen secreteren elk een IgG, wat zal gebruikt worden voor de verdere constructie van een recombinant antilichaam met twee ingebouwde tagsequenties. Hiervoor dienen de lichte en zware keten, zowel de variabele delen en constante delen, van dit antilichaam geïsoleerd te worden.

3.2.1 cDNA aanmaak

Het mRNA van alle vier hybridoma cellijnen wordt omgezet in cDNA met behulp van Oligo dT primers, zoals beschreven in paragraaf 2.3.3. Er is een voldoende lange reactietijd voorzien van 30 minuten, aangezien de te ontwikkelen cDNA fragmenten tot 1300 basenparen, voor de zware keten, kunnen bevatten. Het geïsoleerde cDNA wordt bij -20°C bewaard voor PCR amplificatie.

3.2.2 PCR amplificatie van de volledige lichte en zware ketens

Alvorens het cDNA bruikbaar is om in een plasmidevector te importeren dient dit geamplificeerd te worden met behulp van PCR technieken. Hiervoor wordt het protocol gebruikt dat beschreven is in paragraaf 2.3.4.

Het cDNA wordt geamplificeerd in twee condities. Een eerste conditie bevat de primers voor amplificatie van enkel de variabele delen van de lichte en zware ketens. In deze conditie wordt enkel gebruik gemaakt van cellijnen 3E6 en 6D8. In de tweede conditie worden de volledige lichte en zware ketens geamplificeerd vanuit de vier cellijnen. De gebruikte primers zijn per conditie weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Gebruikte primers voor PCR amplificatie

Onderstaande tabel geeft de primer paren, met benaming en sequentie, weer voor de verschillende PCR amplificaties, alsook deze gebruikt in de sequentie bepaling voor langere amplicons. Conditie 1 geeft enkel de primers weer voor de amplificatie van de variabele delen, terwijl conditie 2 de primers bevat voor de amplificatie van de volledige ketens. De V_h -FOR (aangeduid met *) is een gedegeneerde primer.

Conditie 1: Variabele delen van 3E6 en 6D8

Primers lichte keten:	V_k -REV	5' – GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC – 3'
	V_k -FOR	5' – GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA – 3'
Primers zware keten:	V_h -REV	5' – TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC – 3'
	V_h -FOR	* 5' – AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG – 3'

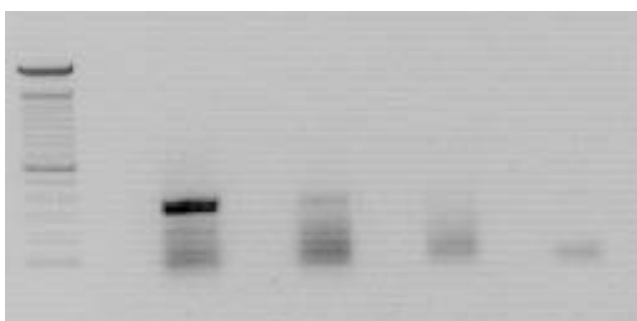
Conditie 2: Volledige ketens van 3E6, 6D8, 4C8 en 2L8

Primers lichte keten:	L_c -REV	5' – TAACACTCATTCTGTTGAAGCTC – 3'
	V_k -FOR	5' – GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA – 3'
Primers zware keten:	H_c -REV	5' – GGGAGGGGTGGAGGTAGGTGTCAG – 3'
	V_h -FOR	* 5' – AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG – 3'

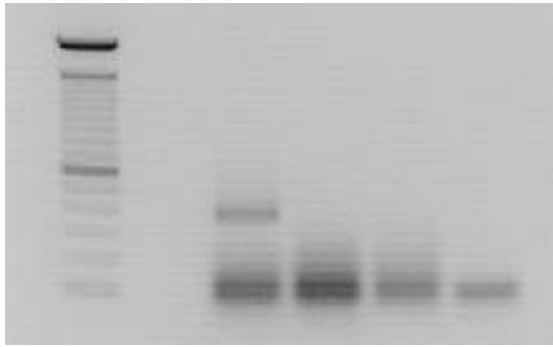
De PCR amplificatie van de variabele delen van het anti-PSA, welke ongeveer een lengte van 300 bp hebben, zijn volledig uitgevoerd volgens het hierboven beschreven protocol. De volledige lichte en zware ketens zijn door mogelijke variaties in het variabele deel niet eenvoudig te amplificeren. Deze problemen kunnen omzeild worden door gebruik te maken van gedegenereerde primers of de PCR condities te variëren. Ook hun lengtes die respectievelijk rond de 1000 bp en 1400 bp liggen, vereisen enkele aanpassingen van het standaard PCR programma, onder meer in de duur van de finale elongatiestap. Om deze reden zijn er kleine variaties op het originele PCR programma toegepast zodat uiteindelijk ook deze sequenties geamplificeerd kunnen worden.

Als controle wordt er na de PCR reactie een agarose gel elektroforese uitgevoerd, volgens het protocol beschreven in paragraaf 2.3.4, waarbij de bekomen DNA fragmenten gescheiden worden op lengte.

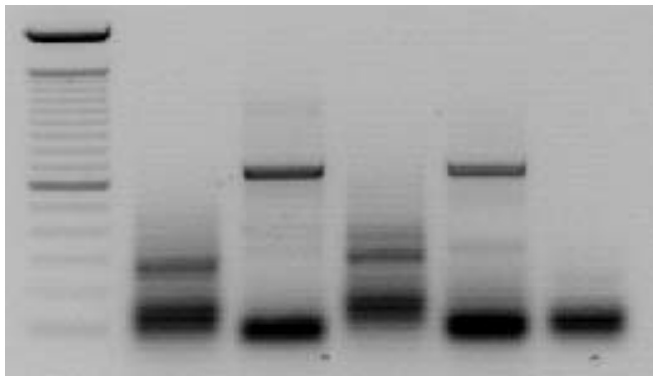
Figuur 9 en 10 geven de PCR amplificatie weer van de variabele delen van de lichte en zware ketens van het 3E6 en 3D8 hybridoma cDNA. In beide amplificaties werd enkel voor 3E6 (figuur 9 en 10, laan 2) een PCR amplicon bekomen van de correcte lengte (± 300 bp), bruikbaar voor klonering.



Figuur 9: Agarose gelelektroforese van PCR amplificatie van het variabel deel van de lichte anti-PSA keten, 3E6 en 6D8. Agarose gelelektroforese (1% agarose) van PCR amplicons bekomen na amplificatie van 3E6 en 6D8 cDNA met behulp van de primers beschreven in tabel 3. Laan 1: 100 bp ladder, laan 2: leeg, laan 3: 3E6, laan 4: 6D8, laan 5: cDNA controle, laan 6: PCR controle.

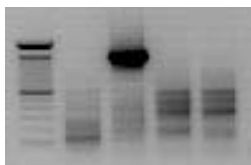


Figuur 50: Agarose gelelektroforese van PCR amplificatie van het variabel deel van de zware anti-PSA keten, 3E6 en 6D8. Agarose gelelektroforese (1% agarose) van PCR amplicons bekomen na amplificatie van 3E6 en 6D8 cDNA met behulp van de primers beschreven in tabel 3. Laan 1: 100 bp ladder, laan 2: leeg, laan 3: 3E6, laan 4: 6D8, laan 5: cDNA controle, laan 6: PCR controle.



Figuur 61: Agarose gelelektroforese van PCR amplificatie van de volledige lichte anti-PSA keten, 3E6 en 6D8. Agarose gelelektroforese (1% agarose) van PCR amplicons bekomen na amplificatie van 3E6 en 6D8 cDNA met behulp van de primers beschreven in tabel 3. Laan 1: 100 bp ladder, laan 2: zware keten 3E6, laan 3: lichte keten 3E6, laan 4: zware keten 6D8, laan 5: lichte keten 6D8, laan 6: PCR controle.

De volledige lichte keten werd geamplificeerd vanuit het cDNA van de 3E6 en 6D8 cellijnen, wel is er op te merken dat de amplificatie van de zware keten onder deze condities niet succesvol was.



Figuur 72: Agarose gelelektroforese van PCR amplificatie van volledige zware keten van anti-PSA, 4C8, 2L8 en 11F9. Partiële agarose gelelektroforese (1% agarose) van PCR amplicons bekomen na amplificatie van 3E6 en 6D8 cDNA met behulp van de primers beschreven in tabel 3. Laan 1: 100 bp ladder, laan 2: 4C8, laan 3: 2L8, laan 4: 11F9, laan 5: 11F9.

De amplificatie van de volledige zware keten is enkel geslaagd voor de 2L8 cellijn, waar deze een sterk geconcentreerd bandje weergeeft.

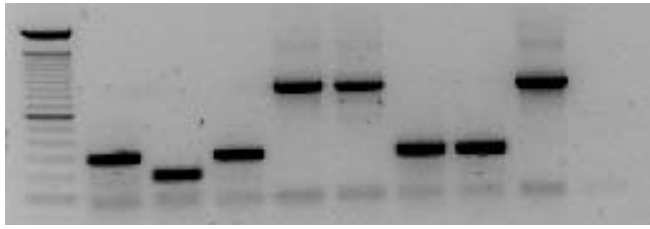
3.2.3 Klonering van de lichte en zware ketens van anti-PSA

De verkregen PCR amplicons worden ingevoegd in TOPO TA cloneringsvectoren met behulp van topoisomerase I. De transformatie van de variabele delen kan uitgevoerd worden met de standaard aangegeven incubatietijd zoals beschreven in paragraaf 2.3.5. Het is echter gebleken dat langere DNA fragmenten een hogere ligatie efficiëntie vertonen indien de incubatietijd verlengd wordt tot 15 à 30 minuten. Hiervoor wordt 1µl zoutoplossing van 1.2 M NaCl en 0.06 M MgCl₂ toegevoegd aan de transformatiereactie. Deze zoutoplossing verhindert het topoisomerase om herhaald te binden en zo het PCR product te beschadigen.

De bekomen recombinanten worden overgebracht in competente E. Coli cellen door middel van een heat shock perforatie, welke vervolgens uitgespreid en opgegroeid worden op LB agar platen, zoals beschreven in paragraaf 2.3.5.

Vervolgens worden voor elke recombinant verscheidene kolonies, welke door de Xgal screening raakten, geselecteerd. Voor de lichte en zware variabele delen worden ieder vijf kolonies geselecteerd voor de 3E6 en vijf voor de 6D8 hybridoma lijn.

Ter controle wordt een kolonie PCR uitgevoerd op de geselecteerde kolonies, deze maakt gebruik van de M13 forward en reverse primers, welke aanhechten op de TOPO vector, in de nabijheid van het ingebouwde PCR product. Aangezien een kolonie PCR enkel tot doel heeft het aanwezige DNA te amplificeren wordt deze uitgevoerd als beschreven in paragraaf 2.3.4. De resultaten van deze PCR reactie worden vervolgens ook gescheiden op grootte via een agarose gelelektroforese.



Figuur 83: Voorbeeld van een kolonie PCR. Ligatie van de volledige lichte keten van 3E6 (laan 2 - 5) en 6D8 (laan 5 - 9). Laan 1 bevat een 100 bp ladder voor lengtebepaling. Enkel het bandje in laan 5, 6 en 9 duidt op een succesvolle transformatie.

De kolonies waarvan de transformatie geslaagd is worden vervolgens opgegroeid in vloeibaar soc medium voor de plasmide extractie.

3.2.4 Plasmide extractie van de geselecteerde kloons van de lichte en zware ketens van anti-PSA

De E. Coli cultuur wordt aan de hand van de procedure beschreven in paragraaf 2.3.7 gezuiverd zodat enkel de geproduceerde plasmides met hun anti-PSA inserten overblijven. Aangezien er niet voor elke kolonie voldoende materiaal aanwezig is onduidelijke pellets te vormen kan een 3µl Genelute toegevoegd worden bij de precipitatiestap.

3.2.5 Sequentiebepaling van de bekomen kloons van de lichte en zware ketens van anti-PSA

Als laatste controle wordt een sequentiebepaling uitgevoerd voor de plasmide-inserten van iedere kloon, volgens het protocol beschreven in paragraaf 2.3.8 en 2.3.9. Afhankelijk van de insertlengte wordt ofwel enkel de M13-REV of een combinatie van verschillende primers gebruikt, aangezien een sequentieanalyse enkel bruikbaar is voor een lengte van 400 tot 500 bp. Voor beide variabele delen volstaat één enkele M13 primer, maar de volledige lichte en zware ketens maken gebruik van beide M13 primers alsook de V_k -FOR en V_h -FOR, samen met de Lc-REV en Hc-REV. Per sequentie PCR reactie kan uiteraard maar één enkele primer gebruikt worden. Dit geeft bijgevolg vier overlappende sequenties voor de lichte en zware ketens welke naderhand manueel tot de volledige sequentie kunnen samengevoegd worden.

```
[GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA]GCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACT
GTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGAAATATTCACGATTATTTAGCATGGTATC
AGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGC
AGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTC
AAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTT
GGAGTACTACATTCACGTTTCGGCTCG[GGGACCAAGCTGGAGATCTAAC]
```

Figuur 94: Sequentie van het variabele deel van de lichte keten van anti-PSA verkregen uit 3E6 hybridomas, 322 bp. Mutaties zijn gemarkeerd, de forward en reverse primers worden aangeduid tussen vierkante haken en de PvuII – site, welke een belangrijke rol speelt in het creëren van de uiteindelijke vector, is in het vet weergegeven.

```
[AGGTCCAAGTGCAGSAGTCWGG]AGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGATATCCTGCAAGTCTACTGGSTACACATTCAGTGAAGTACTGGATAGAGTGGG
TAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTACCTGGAAG
TGGTAGTACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGAT
ACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTG
CCGTCTATTTCTGTGCAAGAAGGAAAGTTGGTACGGTGGACTACT[GGGGCCAAG
GGACCACGGTCACCGTCTCCTCA]
```

Figuur 105: Sequentie van het variabele deel van de zware keten van anti-PSA verkregen uit 3E6 hybridomas, 350 bp. Mutaties zijn gemarkeerd, de forward en reverse primers worden aangeduid tussen vierkante haken en de PvuII – site, welke een belangrijke rol speelt in het creëren van de uiteindelijke vector, is in het vet weergegeven.

```
[GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA]TCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACA
GTCAGCATCACTTGCCATGCAAGTCAAGGCATTAGCAATAATATAGGGTGGTTGC
AGCAGAAACCAGGGAAAGTCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGG
AAGATGGAGTTCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCAGATTATTCTCT
CACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGCCTATTACTGTGTACAGTAT
GCTCAGTTTCCTCGGACGTTTCGGTGGGA[GGGACCAAGCTGGAGATCTAAC]
```

Figuur 16: Sequentie van het variabele deel van de lichte keten van anti-PSA verkregen uit 6D8 hybridomas, 322 bp. Mutaties zijn gemarkeerd, de forward en reverse primers worden aangeduid tussen vierkante haken en de PvuII – site, welke een belangrijke rol speelt in het creëren van de uiteindelijke vector, is in het vet weergegeven.

```
[AGGTCCAAGTGCAGSAGTCWGG]ACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAAATTCAGTACTCTGTTGTAAGCTGGG
TGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTATCCTGGAA
GTGGTAGTATTTTCTACAATGAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCAAATTGACTGCAGA
CAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACAGCTGAGGACTCT
GCGGTCTATTTCTGTGGAAGGGGGGACTACT[GGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA]
```

Figuur 117: Sequentie van het variabele deel van de zware keten van anti-PSA verkregen uit 6D8 hybridomas, 335 bp. Mutaties zijn gemarkeerd, de forward en reverse primers worden aangeduid tussen vierkante haken en de PvuII – site, welke een belangrijke rol speelt in het creëren van de uiteindelijke vector, is in het vet weergegeven.

```
[GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA]GCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACT
GTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGAAATATTCACGATTATTTAGCATGGTATC
AGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGC
AGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTC
AAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTT
GGAGTACTGCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAGATAAAACGGGCTG
ATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGG
AGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAAATTCTACCCCAAAGACATCAATGTC
AAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT
GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACC
AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
TCAACTTCACCCATTGTCAA[GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTA]
```

Figuur 128: Sequentie van de volledige lichte keten van anti-PSA verkregen uit 3E6 hybridomas, 644 bp. Mutaties zijn gemarkeerd, de forward en reverse primers worden aangeduid tussen vierkante haken en de PvuII – site, welke een belangrijke rol speelt in het creëren van de uiteindelijke vector, is in het vet weergegeven.

```
[GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA]GCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACT
GTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGAAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATC
AGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGC
AGAAGGTGTACCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCGGGCACACAGTTTTCTCTG
AAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGCGTTATTACTGTCAACATGTTT
ATGGTACTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTG
ATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGG
AGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTC
AAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT
GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACC
AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
TCAACTTCACCCATTGTCAA[GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTA]
```

Figuur 13: Sequentie van de volledige lichte keten van anti-PSA verkregen uit 6L8 hybridomas, 644 bp. Mutaties zijn gemarkeerd, de forward en reverse primers worden aangeduid tussen vierkante haken en de PvuII – site, welke een belangrijke rol speelt in het creëren van de uiteindelijke vector, is in het vet weergegeven.

De sequenties van de variabele delen van de lichte en zware keten en de volledige anti-PSA lichte keten worden vergeleken met online en private databases. De sequentie van de zware keten van anti-PSA, verkregen uit hybridoma cellijn 2L8, zijn momenteel enkel partieel gekend en worden hier bijgevolg niet weergegeven. Verdere sequentiebepaling en de opstelling van de uiteindelijke kloneringsvector zijn in uitvoering.

4. Discussie

In dit onderzoek is op een unieke manier ingegaan op de nood voor verdere optimalisatie van biosensoren, met als doel de detectielimiet van zulke sensoren te verlagen. De nadruk van de gekozen aanpak ligt op de oppervlakte studies van immunosensoren. Er wordt namelijk gestreefd naar een eenvoudig systeem dat het toelaat om de functionele aanhechting en topografische verdeling van antilichamen op hun sensoroppervlak te bestuderen. Om deze redenen wordt een optisch uitleesbare biosensor ontwikkeld, waarbij een antilichaam-antigen interactie wordt uitgevoerd met behulp van FRET. Aangezien optische fluorescentie metingen enkel uitgevoerd worden indien men beschikt over de geschikte voorzieningen en deze apparatuur relatief duur en plaats innemend is, is deze sensor niet direct geschikt als point-of-care toepassing. De bedoeling is echter om deze optische immunosensor te gebruiken als referentiemethode en vervolgens het gelijklopende onderzoek naar een impedimetrische immunosensor te vereenvoudigen. Deze laatste kan geminiaturiseerd en gecommmercialiseerd worden als een point-of-care systeem dat de geneeskundigen in ziekenhuizen of private praktijken aan hun patiënten kunnen aanbieden.

De gebruikte methodes zijn gebaseerd op het werk van Grant et al. [8], en werden aangepast aan een zelfontwikkeld antilichaam tegen CRP. Aangezien er gebruik werd gemaakt van algemene labelingsprocedures, waarmee de vrije lysine residuen van het te labelen proteïne geïsoleerd worden, was het nodig om extensieve optimalisatie experimenten uit te voeren. Er werden dan ook verschillende condities uitgetest waaronder vijf antilichaam-proteïne G verhoudingen gecombineerd werden met vier verschillende labelingsgraden voor anti-CRP en PG, zoals beschreven in paragrafen 3.1.1 en 3.1.2.

Er moet opgemerkt worden dat de bepalingen van de labelingsgraad in paragraaf 3.1.2, theoretische waarden zijn. Hier wordt een gemiddelde labelingsgraad berekend maar deze kan mogelijk sterk afwijken van de werkelijke situatie. Een labelingsgraad van twee fluorescente labels per molecule beschrijft een normaal verdeelde populatie waarvan het gemiddelde aantal labels per molecule, twee is. Hierdoor is het realistischer om aan te nemen dat er een beperkt aantal moleculen aanwezig zijn met twee labels, samen met moleculen die ofwel geen, één, drie of vier labels hebben. In deze laatste kan quenching optreden door de aanwezigheid van te veel fluoroforen waardoor het FRET signaal gemaskeerd wordt.

Bij het vaststellen van FRET wordt gekeken naar twee golflengtes, 570 nm en 612 nm, welke respectievelijk de donor en acceptor voorstellen. Volgens de theorie treedt FRET enkel op indien een geschikt antigeen, hier CRP, bindt op het antilichaam construct. [8] Dit zou weerspiegeld worden in de metingen als een stijging van de acceptor fluorescentie die samengaat met een daling van de donor fluorescentie, na toevoeging van CRP. De donor geeft namelijk energie af aan de acceptor, maar aangezien deze overdracht geen 100% effectiviteit heeft zal de stijging van de acceptor minder uitgesproken zijn dan de daling van de donor.

Deze resultaten werden niet opgemerkt in de uitgevoerde experimenten, zoals te zien is in paragraaf 3.1.3. Wanneer figuur 8 bestudeerd wordt, is er enkel een dalende trend over de condities op te merken maar geen significante verschuiving in fluorescentie intensiteit van donor naar acceptor waarden. De daling over de tijd, niet te verwarren met de daling van de concentratiereeks zelf, is mogelijk te verklaren door een geringe afname van fluorescentie als gevolg van blootstelling aan licht. [13] De lichtbundel die gebruikt wordt voor de excitatie, heeft een intensiteit die hoog genoeg is om een gedeeltelijke afbraak van de fluorescente moleculen te veroorzaken. Wanneer CRP dient toegevoegd te worden komen de fluorescente moleculen ook in aanraking met externe lichtbronnen in het laboratorium, wat verder bijdraagt aan de afbraak van de Alexa labels. Het toevoegen van CRP zelf kan ook quenching veroorzaken doordat de CRP moleculen de fluorescentie energie absorberen.

Er zijn verscheidene verklaringen mogelijk voor de afwezigheid van een FRET signaal na toevoeging van CRP. Het antilichaam of antigeen dat haar functionaliteit verliest, labels die te ver van elkaar, of simpelweg te weinig aanwezig zijn ofwel labels die te dicht op elkaar zitten, waardoor er constant sprake zou zijn van FRET, zijn de meest waarschijnlijke verklaringen alsook een combinatie van bovenstaande oorzaken. Onze vermoedens gaan uit naar de laatste mogelijkheid, zodat er sprake kan zijn van FRET zelfs voor toevoeging van CRP. Dit vermoeden wordt versterkt wanneer de eerste conditie, zonder CRP van de fusie in de hoogste concentratie, vergeleken wordt met de controles van de vrije anti-CRP en PG moleculen (figuur 8). Er kan opgemerkt worden dat de waarden bij 612 nm hoger liggen dan deze bij 570 nm, terwijl dit in de controles niet het geval is. Deze gegevens duiden op mogelijke FRET activiteit van het moment dat de donor en acceptor moleculen fusioneren, waardoor verdere FRET activiteit bij toevoeging van het antigeen niet meer meetbaar is. Deze trend zet zich verder in de tweede conditie waar wel CRP toegevoegd wordt, maar er treedt geen versterking

van de al aanwezige FRET op. In de volgende conditie vermindert het FRET signaal, waarschijnlijk te wijten aan de grote hoeveelheid CRP die aanwezig is en quenching kan veroorzaken. Mogelijke redenen waarom de trend zich niet verderzet bij lagere verdunningen in de reeks, kunnen zijn dat de proteïne concentratie in deze stalen te laag is om duidelijk door de apparatuur gedetecteerd te worden. Bovendien zijn de metingen veel gevoeliger aan invloeden van quenching.

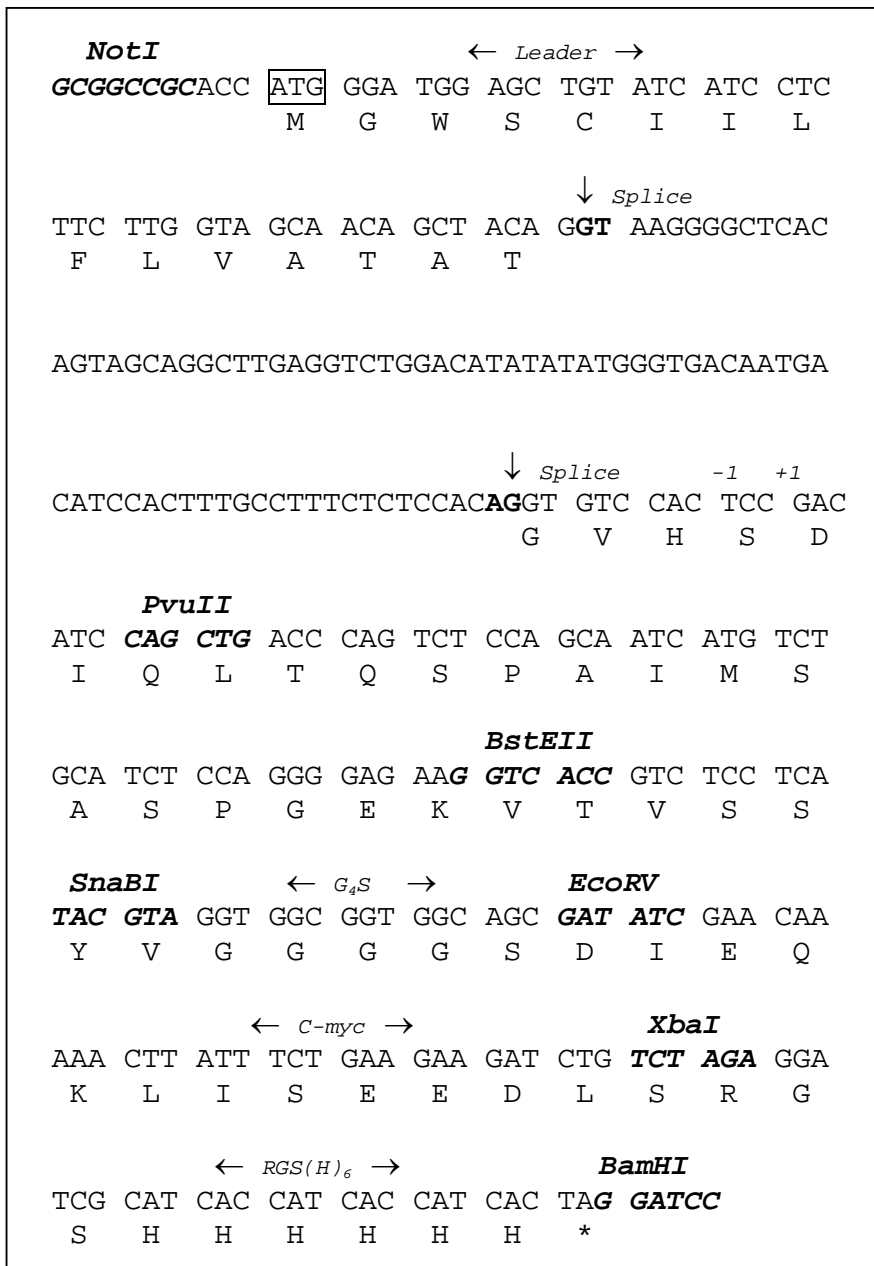
De tot nog toe gebruikte labelingsmethode hechte fluorescente moleculen op willekeurig beschikbare lysines van de antilichamen of PG via een ongecontroleerde fusie. [8] bijgevolg is een controle van het aantal labels en hun exacte positie op de molecule onmogelijk, wat de reproduceerbaarheid bemoeilijkt. Een bepaling van het aantal fluoroforen per targetmolecule is gebaseerd op statistische verdelingen en reflecteert maar gedeeltelijk de werkelijke situatie. Om beide voorgaande redenen blijkt deze opstelling zeer moeilijk te optimaliseren en reproduceren. Er werd dan ook beslist om over te gaan naar de alternatieve methode, waar recombinant aangemaakte antilichamen voorzien worden van tags met fluorescente labels.

Het alternatieve concept bestaat eruit om een kloneringvector te prepareren waarin de variabele delen van elk willekeurig antilichaam ingebracht kunnen worden. Zodat vervolgens een recombinant antilichaam gecreëerd wordt met de geselecteerde variabele delen, gevolgd door een korte tagsequentie, de constante domeinen en onderaan het Lc-domein, een tweede tagsequentie. Door deze opbouw kan een antilichaam gelabeld worden met twee verschillende fluorescente groepen, welke zich op een gekende locatie bevinden. Hiermee worden de moeilijkheden met de voorgaande methode omzeild en verkrijgt men een homogener antilichaam labeling, waarbij ook de positie van het label gekend is.

Er wordt vertrokken vanuit vier verschillende muizen hybridoma cellijnen: 3E6, 6D8, 4C8, 2L8. Hieruit worden de verschillende onderdelen voor anti-PSA: de variabele delen van lichte en zware keten, alsook de volledige lichte en zware ketens, geïsoleerd. De sequentiebepalingen van deze isolaties zijn te zien in figuur 19 tot en met 24. De gevonden sequenties werden geverifieerd aan de hand van databases, zodat mogelijke puntmutaties opgespoord konden worden. In de lichte keten uit cellijn 3E6 werd een puntmutatie gedetecteerd waardoor een cytosine is vervangen door een thymine op positie 415. Deze mutatie resulteert in de vervanging van een leucine in een fenylalanine in het constante domein. Aangezien fenylalanine een grotere benzeenring als zijgroep bezit zou deze mogelijk

een verstoring in de antilichaam conformatie kunnen veroorzaken. Buiten het verschil in zijgroepen zijn deze twee aminozuren echter beide elektrisch neutraal en hydrofoob. Dit samen met het feit dat de mutatie zich in het Fc domein bevindt en niet het functionele gedeelte kan betekenen dat de mutatie voor weinig complicaties zorgt. Een tweede kloon werd geïsoleerd uit de 2L8 cellijn, welke de mutatie niet bleek te bezitten. De volledige sequentiebepaling van de zware keten wordt verwacht in het volgende stadium van dit project.

De zware en lichte ketens worden na isolatie en controle samengevoegd in een pFv-MycH₆ kloneringvector, deze experimenten werden nog niet volledig uitgevoerd omwille van tijdsgebrek. Om deze redenen volgt hier enkel een theoretische bespreking van het vervolg van dit project.



Figuur 14: Multiple cloning site van pFv-MycH₆

De multiple cloning site van pFv-MycH₆ met leader, splice, linker en tag sequenties. De restrictie sites zijn weergegeven in het vet, met de benoeming er boven.

Door gebruik te maken van de restrictiesites in de multiple cloning site van de pFv-MycH₆ vector, te zien in figuur 25, kunnen het variabele domein en de constante domeinen geïnserteerd worden, samen met twee tag sequenties. De eerste tag wordt tussen het variabele en de constante delen geplaatst, terwijl een tweede tag achter aan het constante domein, in het

Fc gebied komt. Er worden restrictiesites voorzien rond het variabele segment zodat uitwisseling van dit segment mogelijk is. Een kloneringvector voor de lichte keten en één voor de zware keten wordt voorzien. Dit zorgt ervoor dat de kloneringvector kan aangepast worden voor om het even welk IgG antilichaam te produceren, zolang de variabele sequentie beschikbaar is.

Het uiteindelijke resultaat van de klonering is een eukaryote cellijn welke recombinante antilichamen secreteert, voorzien van twee verschillende tags. Aan de hand van specifieke enzymatische reacties kunnen deze tags voorzien worden van fluorescente labels. Met dit antilichaam kan de ontwikkeling van een optisch uitleesbare antilichaam gebaseerde biosensor verder gezet worden. Deze methode is reproduceerbaar en kan voor elk ander antilichaam gebruikt worden. Dit in tegenstelling tot de lysine labeling van anti-CRP - PG complexen, een proces dat weinig controleerbaar en moeilijk reproduceerbaar is, zeker voor nieuwe antilichaam-PG complexen

Verdere experimenten in de ontwikkeling van een optische immunosensor dienen om de verschillende oppervlakteaansluiting mogelijkheden te bestuderen, alsook om een efficiënte methode te bekomen om deze oppervlaktelocalisatie te bestuderen. Er kan gewerkt worden met verschillende ondergronden waaronder glas, silica, polymeren en nanokristallijn diamant. Hiernaast dient de optimale aansluitingsmethode geselecteerd te worden, fysische adsorptie, covalente binding, etc. die functioneel de beste resultaten oplevert. Voor het in beeld brengen van de fluorescente antilichamen op het oppervlakte en de dichtheitsbepalingen zal gebruik worden gemaakt van fluorescentie microscopie.

Referenties

1. Bessman, S. P. and R. D. Schultz (1974). Progress toward a glucose sensor for the artificial pancreas. *Adv Exp Med Biol* **50**(0): 189-96.
2. Nakamura, H. and I. Karube (2003). Current research activity in biosensors. *Anal Bioanal Chem* **377**(3): 446-68.
3. Guan, K. L. and J. E. Dixon (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* **192**(2): 262-7.
4. Cooreman, P., R. Thoelen, et al. (2005). Impedimetric immunosensors based on the conjugated polymer PPV. *Biosens Bioelectron* **20**(10): 2151-6.
5. Bonroy, K., F. Frederix, et al. (2006). Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers. *J Immunol Methods* **312**(1-2): 167-81.
6. Lagae, L., R. Wirix-Speetjens, et al. (2005). Magnetic biosensors for genetic screening of cystic fibrosis. *IEE Proceedings* **152**(4): 393-400.
7. Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second ed. New York, Kluwer Academic Publishers.
8. Ko, S. and S. A. Grant (2006). A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron* **21**(7): 1283-90.
9. Sjobring, U., L. Bjorck, et al. (1991). Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties. *J Biol Chem* **266**(1): 399-405.
10. Jongsma, M. A. and R. H. Litjens (2006). "Self-assembling protein arrays on DNA chips by auto-labeling fusion proteins with a single DNA address." *Proteomics* **6**(9): 2650-5.
11. Sukhija, R., I. Fahdi, et al. (2007). Inflammatory markers, angiographic severity of coronary artery disease, and patient outcome. *Am J Cardiol* **99**(7): 879-84.
12. Nakamura, T., T. Etsunaga, et al. (2007). Prostate cancer screening at Tatebayashi City in Gunma prefecture--results of screening with PSA alone between 2003 and 2005. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **98**(4): 619-28.
13. Haugland, R. P. (1995). Coupling of monoclonal antibodies with fluorophores. *Methods Mol Biol* **45**: 205-21.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Detectie van labelvrije targetmoleculen door middel van optisch uitleesbare, antilichaam gebaseerde biosensoren

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Nick Vanbergen

Datum: **19.06.2007**