Sejtszintű patológiás folyamatok vizsgálatára alkalmas részecskeszeparációs berendezés

A kifejlesztett berendezés egy olyan mintaelőkészítési rendszer és tömegspektrometriás csatoló, amely egyedülálló módon képes akár sejtszintű proteomikai, peptidomikai, lipidomikai adatokat szolgáltatni pathológiás és fiziológiás szövetekről, szövettani metszetekről, biopsziákról.

A módszer nem igényli a keresett molekulák jelölését, ismeretét, így univerzálisan alkalmas új, eddig még nem ismert pathológiás biomarkerek meghatározására.

A berendezés alkalmas sejtek, sejtcsoportok elkülönítésére és közvetlen tömegspektrometriás, tandem tömegspektrometriás vizsgálatára. A berendezés segítségével egyedülálló módon vizsgáalható egy-egy sejt vagy sejtcsoport molekuláris felépítése, így új biomarker molekulákat eredményezhet a klinikai diagnosztika és terápiás nyomonkövetés számára.

A sejtpopulációk gyors, multiparaméteres (általában 4-6 paraméter) vizsgálatára alkalmas módszer, amely során a különböző tulajdonságokkal rendelkező sejtek analizálhatóak és szétválaszthatóak. A hidrodinamikailag fókuszált sejtek egyedileg vizsgálhatóak specifikus fluoreszcens jelölés és lézer letapogatás segítségével.

Az egyedi módon megvalósított kapcsolási technika segítségével a fókuszált, különböző tulajdonságú és típusú egyedi sejtek vagy sejtpopulációk molekuláris összetétele minőségileg (kvalitatív) és mennyiségileg (kvantitatív) közvetlenül tömegspektrometriával vizsgálható. Ebben az esetben a vizsgálható paraméterek száma nem limitált. A tömegspektrometriás detektálás nem igényel semmilyen típusú jelölést vagy kémiai módosítást (label-free), de a vizsgálat során alkalmazhatóak a különböző jelöléses vagy belső kalibrációra épülő mennyiségi technikák is. Az áramlási citometriához közvetlenül kapcsolt tömegspektrometria segítségével mindazon paraméterek meghatározhatók egyedi sejtekből vagy sejtpopulációkból egyaránt, amelyek a jelenleg alkalmazásban lévő tömegspektrometriás és tandem tömegspektrometriás rendszerekkel vizsgálhatóak. Ennek értelmében a módszer alkalmas kis- és makromolekulák szerkezetének, szekvenciáinak, kémiai

módosulásainak, koncentrációinak, lokális eloszlásának és kölcsönhatásainak azonostására.

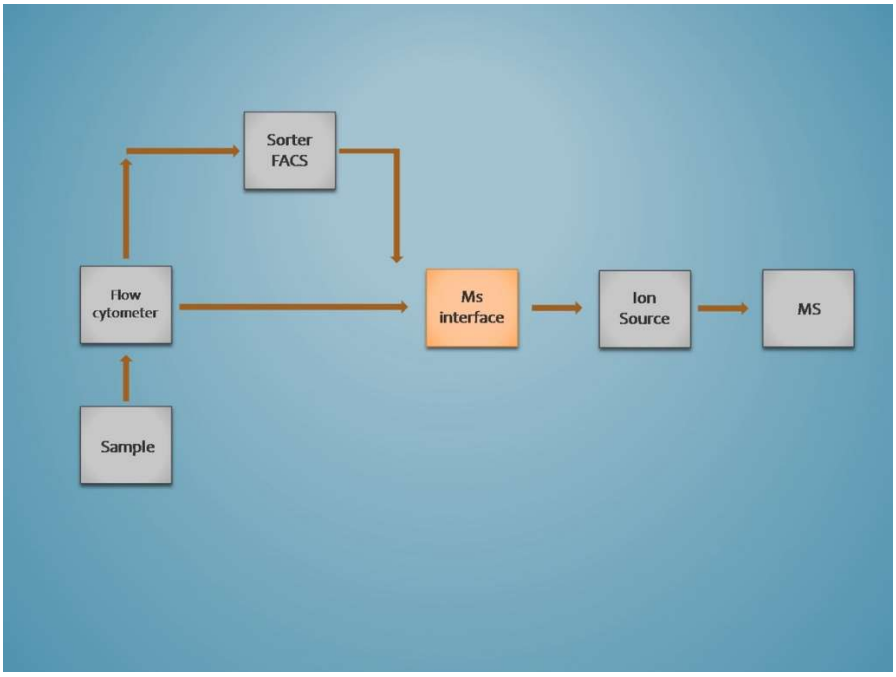
Jelen interfésszel létrehozott áramlási citométer (szorter, FACS) - tömegspektrométer online kapcsolat során a hidrodinamikailag fókuszált sejtek közé inert gáz (nitrogén, nemesgázok: argon, hélium stb.) buborékokat rétegzünk úgy, hogy egy-egy sejtet és az az körülvevő kis térfogatú folyadékot egy-egy gázbuborék választ el. Ezt a szekvenciális adagolást egy lézeres vagy optikai letapogató rendszerrel, valamint gáz adagoló rendszerrel hajtjuk végre. Ennek köszönhetően az egyedi sejtek és azok alkotó elemei egy kis térfogatú folyadékban egymástól elválasztva haladnak és kerülnek az interfész további részein keresztül a tömegspektrométer ionforrásába.

Az interfész teljes hosszában, jól meghatározott pontokon különböző funkciójú bemeneti és kimeneti nyílások helyezkednek el. A kimeneti nyílások az éppen vizsgálni nem kívánt sejtek, sejt lizátumok rendszerből való eltávolítására szolgálnak. Ezeken a nyílásokon keresztül adott esetben csökkenthető az áramlási sebesség is ha ezt az analitikai igények megkövetelnék. A feleslegessé vált gázbuborékokat is egy hasonló kimeneti nyíláson keresztül távolítjuk el (gáztalanító), mielőtt azok elérnék az analitikai interfészegységeket. Az eltávolító nyílások működése során egy szelep rendszer lép működésbe, amely kommunikál a lézeres letapogató rendszerrel, így tudjuk, hogy mikor melyik sejteket, sejt lizátumokat távolítjuk el. A bemeneti nyílásokon keresztül az analitikai egységekhez szükséges oldattokat, folyadékokat, reagenseket tudjuk a rendszerbe juttatni.

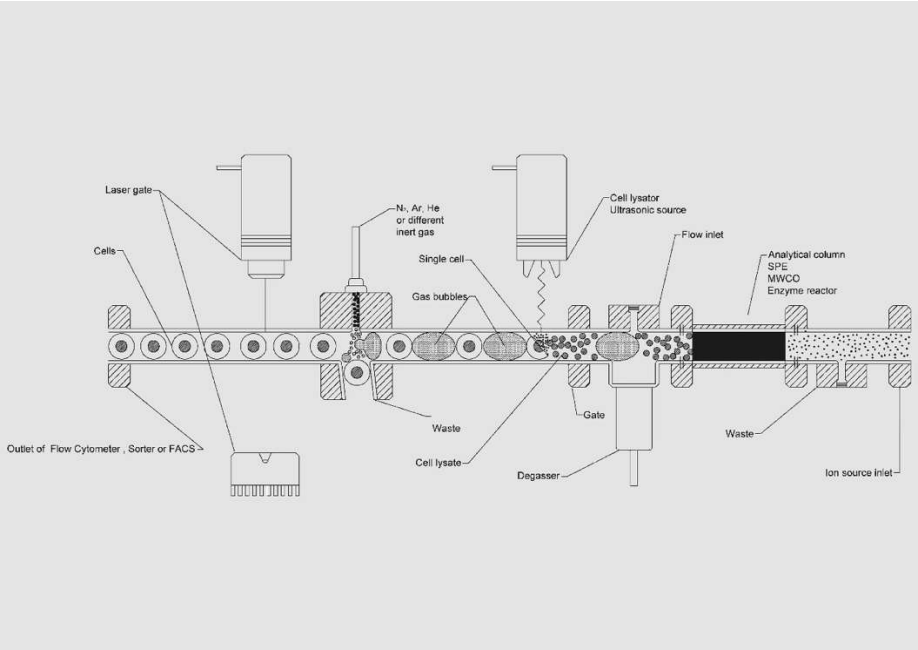
Az elválasztott egyedi sejtek különböző besugárzási módszerekkel szétbonthatóak (lizálhatóak), a lizálás történhet nagyenergiájú ultrahang, UV, IR, femtoszekundumos lézer segítségével, a lizátor típusát a felhasználás célja határozza meg. Az interfész további részegységeivel különböző mintaelőkészítő lépések elvégezhetőek, például szilárd fázisú extrakció, analitikai elválasztás, méretkizárásos frakcionálás, enzimatikus emésztés. A különböző funkciójú részegységek a felhasználók igényei szerint variálhatóak cserélhetőek, a rendszer MS készülék és ionforrás típustól függetlenül használható.

Jelen interfész segítségével a rutin proteomikai, peptidomikai, metabolomikai és lipidomikai vizsgálatok jelentős része elvégezhető, valamint a technika alkalmazható különleges diagnosztikai eljárások kifejlesztésére pl. teljes vér tömegspektrometriás

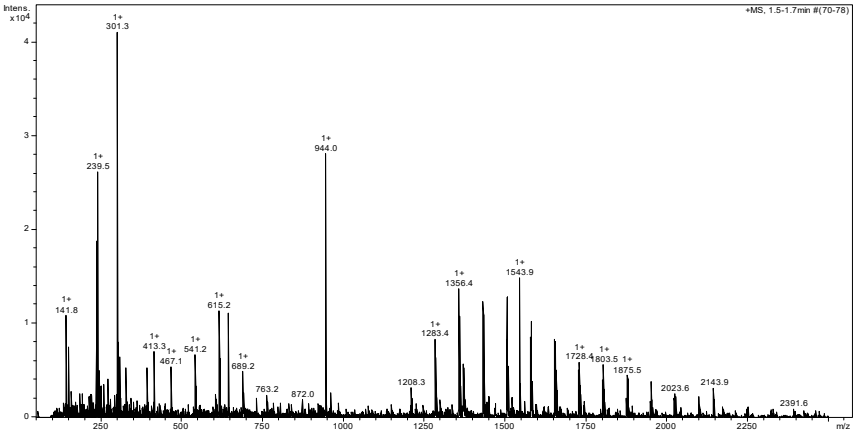
diagnosztikája, illetve egy-sejt képalkotási (single cell imaging) és egy-sejt analitikai (single cell proteomics, single cell peptidomics, single cell metabolomics, single cell lipidomics) vizsgálataira.



1. ábra: A módszer főbb egységeinek hierarchiája



2. ábra: Az egysejtszintű felbontást lehetővé tevő részegység felépítése és működésének vázlata



3. ábra: Szöveti biopsziából elkülönített egy sejt tömegspektromeztriás vizsgálatának eredménye (pozitív mód, ESI ionizáció). Az ábrán főként peptidek és lipidek molekuláris jelei láthatóak.

Kromat Kft.

Pályázat címe: Sejtszintű felbontással rendelkező jelölésmentes molekuláris patológiai vizsgálatokra alkalmas tömegspektrometriás berendezés kifejlesztése

Pályázati azonosító: 2019-1.1.1-PIACI-KFI-2019-00393

KROMAT