

7. Műszeres analitikai lehetőségek a klinikai laboratóriumi fehérjevizsgálatokban

Automatizáció a fehérjeanalitikában

KŐSZEGI TAMÁS

Általános szempontok

Az egyedi fehérjék kimutatására és mennyiségi meghatározására a laboratóriumi gyakorlatban jórészt specifikus molekulafelismerésen alapuló kölcsönhatások adnak lehetőséget. Leggyakrabban a mérni kívánt fehérjét arra specifikus antitesttel reagáltatják, majd az antigén-antitest reakciót valamilyen módon mérhetővé teszik. Léteznek azonban más, nem antigén-antitest alapú módszerek is, de lényegük olyan molekulák alkalmazása, melyek az adott fehérjével szoros és specifikus kölcsönhatásba lépnek (affinitásos elv).

Ebben a fejezetben elsősorban az antigén-antitest elvű méréstechnikák automatizációját ismertetjük. Az egyes módszerek bemutatásának logikája a nagy koncentrációban lévő antigének mérésétől lefelé az egyre kisebb koncentrációjú analitok mérési elvének ismertetése.

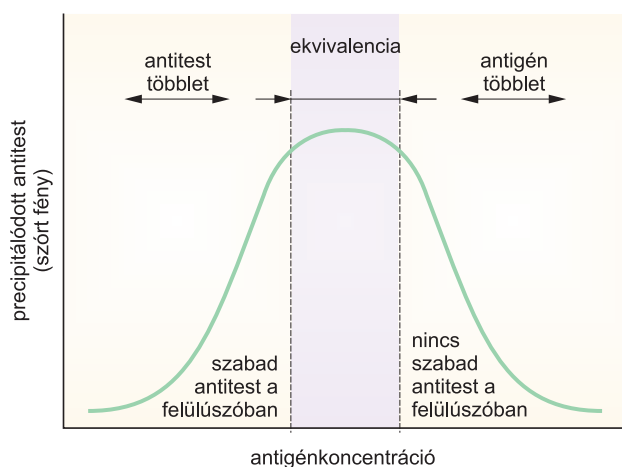
Az egyedi molekulák automatizált meghatározását az utóbbi évtizedek kétirányú fejlődése tette lehetővé. Egyrészt a műszeres analitika és a számítógépes vezérlés ugrásszerű tökéletesedése, másrészt az orvos-biológiában a monoklonális antitest technológia felfedezése és ipari méretű alkalmazásának kidolgozása. A kétféle fejlesztés ötvözése következtében az automatizált, nagy érzékenységgű és specifikus módszerek ma már széles körben elterjedtek a rutin laboratóriumi diagnosztikában, és lehetővé teszik a fehérjék kvantitatív mérését a pg/ml vagy más kifejezéssel a nano–femtomoláris nagyságrendben.

Immunprecipitáción alapuló módszerek

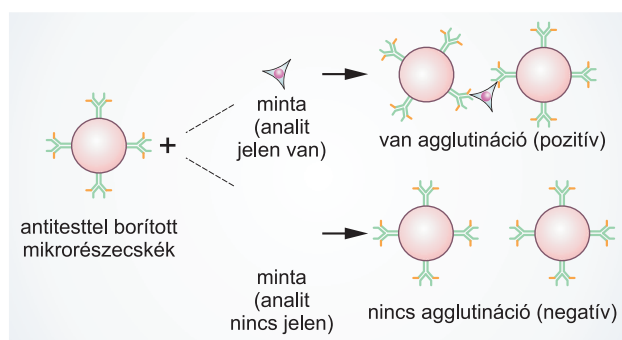
Az egyik legrégebben alkalmazott technika, amely általában szilárd hordozón lévő gél fázist használ az antigén-antitest reakció kimutatására. A gél általában agar- vagy agaróztartalmú, a hordozó lehet üveg vagy műanyag lemez. Az antigént a gélben kiképzett lyukakba viszik fel, a specifikus antitestet a gél tartalmazza. A legegyszerűbb az ún. radiális immun-diffúziós technika, ahol az antigén és az antitest diffúzió útján találkozik egymással. Gyorsabb eljárás a „rakéta”-elektroforézis és a „counter”-elektroforézis, ahol feszültségkülönbség hatására az antigén a gélben addig vándorol, amíg az antitesttel precipitátumot nem képez. Mindegyik módszernél gondos mosással el kell távolítani a gélből a ki nem csapódott fehérjéket, majd a precipitátumot fehérjefestékkel meg kell festeni. Az értékelés a precipitációs ív átmérőjének nagysága vagy az antigén diffúziójának mértéke alapján, egyszerű távolságméréssel lehetséges. Mennyiségi meghatározást standard koncentrációsorra kapott adatok alapján végezhetünk. A módszer ma már kevéssé használt, de olcsó és leolvasókészülékek (pl. CCD-kamera) segítségével automatizálható. Nagy klinikai immunológiai centrumok is alkalmazzák – főleg a radiális immun-diffúziót – előre gyártott, kereskedelmi forgalomban megvásárolható agarózgélek használatával. Az eljárás inkább félautomatizáltnak tekinthető, mert a minták bemérését általában manuálisan kell végezni. Mint minden immunreakciónál, itt is figyelni kell az optimális antigén-antitest arányra, mert bármelyik túlsúlya esetén a komplex a gélből kioldódhat, fals eredményeket produkálva.

Immunturbidimetriás módszerek

Az immunturbidimetriás módszerek a diffúziós eljárások továbbfejlesztett változatai. Itt a reakció csőben vagy küvettában megy végbe, a szem számára láthatatlan a képződött immunkomplex, nincs szükség festési műveletekre. Már e tényekből is következik, hogy a technika jóval érzékenyebb mennyiségi meghatározást tesz lehetővé a precipitációs eljárásokhoz képest. A módszer alapelve, hogy a fény hullámhosszával összemérhető méretű immunkomplexek keletkezzenek, melyek a rendszert megvilágító monokromatikus fényt szórják. Ez úgy lehetséges, hogy poliklonális antitestet alkalmaznak, az immunglobulinok mindkét antigénköti helye aktív kell hogy legyen (bivalens). A fehérje antigén általában elég nagy ahhoz, hogy több epitóppal is rendelkezze, ezért a poliklonális, bivalens antitestpopuláció képes áthidalni a molekulák közti távolságot és létrehozni a



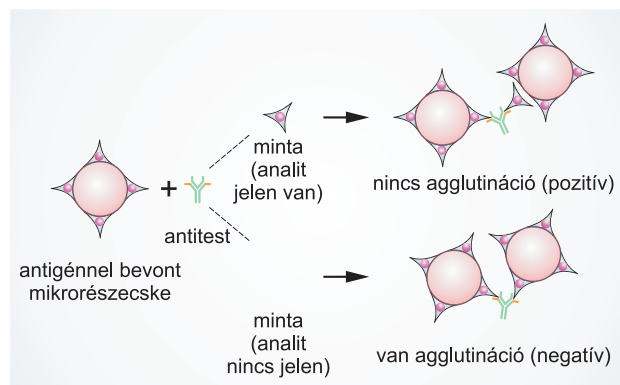
7-1. ábra. Az antigén-antitest arány hatása az immunkomplex fényszórására (Heidelberger-Kendall-görbe)



7-2. ábra. A latexerősített direkt immunturbidimetriás mérés elve

megfelelő méretű komplexet. Itt is érvényes az optimális antigén-antitest arány elve (az ekvivalenciaelv), mert ellenkező esetben az immunkomplex mérete kicsiny marad, és a rendszer nem képes a detektálására (7-1. ábra), ami az immunkomplex fényszórásán alapul. Az ábráról az is leolvasható, hogy a turbidimetriás technika relatíve nagy antigénkoncentrációt igényel az optimális detektálási körülményekhez. Ha ez a feltétel nem teljesül, akkor az ún. direkt turbidimetria érzékenységét meg kell növelni a kis koncentrációban jelen lévő antigének kimutatásához. Ezt úgy lehet elérni, hogy a specifikus antitestet standard méretű részecskékhez (általában latexgömböcskékhez) kötik. Itt is fontos körülmény, hogy az antigénnek kellően nagyoknak (több epitóppal rendelkezőnek) kell lennie az immunkomplexek kialakulásához. Az érzékenységnövelés a latexszemcsék fényszórásnövelő tulajdonságán alapul. A módszer sematikus áttekintése a 7-2. ábrán látható.

Egy epitóppal rendelkező, kisméretű peptid antigének kimutatására a direkt turbidimetria nem alkalmas, mert nem tud keresztkött immunkomplex létrejönni. A problémát a kompetitív elvvel lehet áthidalni. A tesztrendszerben mikrorészecskékhez vagy albuminhoz kötik standard mennyiségben a kimutatni kívánt fehérje antigént. A specifikus antitestet és a kötött antigént tartalmazó rendszerben a minta hozzáadására vetélkedés alakul ki a tesztben lévő standard mennyiségű antitest és a minta/teszt antigén között. Az immunkomplexek kialakulása és így a fény szóródása is fordítottan arányos a kimutatni kívánt analit koncentrációjával (7-3. ábra).



7-3. ábra. A kompetitív, erősített immunturbidimetria elve

A TURBIDIMETRIÁS JEL MÉRÉSE

A turbidimetria alapja a mintán áthaladó monokromatikus fény szóródás miatti intenzitásának csökkenése (látszólagos abszorbanca). A mérés geometriájának sematikus ábrázolása a 7-4. ábrán látható.

Az optimális detektálási körülményekhez nagyon sok tényezőt kell figyelembe venni.

Hullámhossz

A direkt (nem erősített) méréseknél az ultraibolya tartomány (340 nm körül) a legmegfelelőbb. Mikro-részecskék alkalmazásánál a részecskeméret (és ennek megfelelően az immunkomplex mérete) döntő, a mérettel arányosan nő a hullámhossz. Általában 40–60 nm méretű részecskéket alkalmaznak, amelyek önmagukban kevésbé szórják a fényt, de az immunreakció során méretük növekszik és a fényszórás lényegesen erősebbé válik. Detektálásra, megvilágító fényforrásként 340–360 nm-es fényt alkalmaznak.

Hőmérséklet

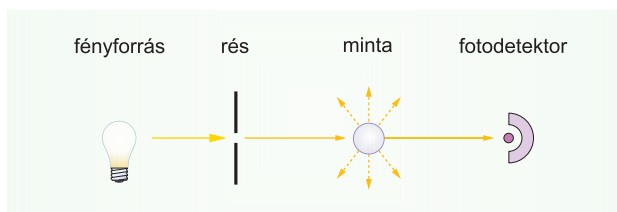
A hőmérséklet emelkedésével gyorsul a reakciókinetika, ugyanakkor az antigén-antitest komplex stabilitása csökken. A legtöbb készülék a mérést 37 °C-on végzi.

Végpontos vagy kinetikus mérés?

A *végpontos mérés* technikailag egyszerűbb, de sok hibalehetőséget rejt magában, pl. az ekvivalenzó-nától messze eső tartományt nem jelzi, így a lineartartományon kívül eső minták koncentrációjának mérése bizonytalanná válik.

A *kinetikus módszer* kétféle lehet:

- Adott időegységenként végzett mérés.
- Folyamatos mérés.



7-4. ábra. Turbidimetriás jel detektálásának elve

Mindkét esetben fontos, hogy a készülék a reakció indításához képest igen rövid időn belül (< 5 s) képes legyen az első mérési pont felvételére, ez jelenti a kiindulási (vak) értéket. A kinetikus detektálással követni tudjuk az immunkomplexek kialakulásának sebességét és mérni a telítéshez szükséges időtartamot. Ezek alapján a készülék érzékeli a linearitási tartományon kívül eső antigénkoncentrációt és jelzi a felhasználónak, hogy hígítás szükséges (vagy akár automatikusan hígít és újramér). A kinetikus mérés nagyobb érzékenységet is eredményez.

Részecskeszámlálós elv

Mind a direkt, mind a kompetitív módszereknél használható mérési mód. A vérszámolás elvéhez hasonlóan a mikrorészecskék meghatározott méretű nyíláson haladnak át, ahol impedanciás vagy optikai elv alapján működő rendszer (ún. ablak diszkriminátor) csak a szabad részecskéket számlálja, a dimer vagy nagyobb komplexeket figyelmen kívül hagyja. Ez a detektálási technika a turbidimetriás eljárás érzékenységét jelentősen növeli.

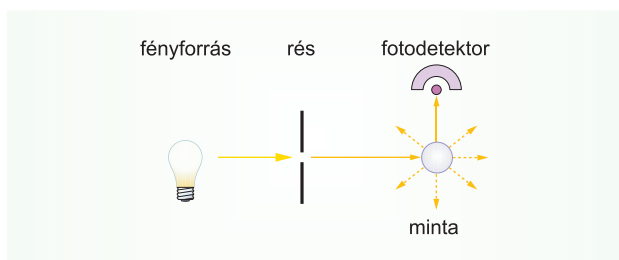
EGYÉB MEGFONTOLÁSOK

Az alkalmazott antitestek sajátosságai

A poliklonális antitestek általában jobb eredményt adnak, mint a monoklonálisak. Ennek oka a jobb komplexképző (áthidaló) sajátossággal és a nagyobb aviditással magyarázható. Az affinitáskromatográfiával tisztított antitestek jobb eredményt adnak, mint a tisztítatlan antiszérumok. A részlegesen emésztett IgG molekulák, (Fab2') fragmentek használata előnyösebb a teljes antitestnél, és a reumatoid faktor (RF) kötő rész elvesztése miatt az RF-fel nem mutatnak interferenciát. Biotinnal jelzett antitestek és streptavidinnal borított mikrorészecskék használata növeli a rendszer érzékenységét és stabilitását.

Az alkalmazott közeg sajátosságai

A reakciós közeg (puffer) összetétele döntően befolyásolja az antigén-antitest reakciót. Az optimális pH 6,0–8,0 között van, a puffer nem tartalmazhat ún. kaotrop anyagokat, amelyek a fehérjék konformációváltozását segítik elő (pl. perklorát, rodanid, nitrát). Előnyös a foszfát-, kalcium-, magnéziumtartalmú közeg, kerülni kell a túl alacsony és túl magas ionerősséget.



7-5. ábra. Nefelométer felépítésének elvi vázlata

Nefelometria

Az előzőekben leírt alapelvek lényegében alkalmazhatók a nefelometriás eljárásokra is. Az alapvető különbség a két módszer között a detektálás elvében van. Itt a valóban szóródott fényt mérjük, nem a látszólagos abszorbananciát. A fényforrás a nefelométerekben általában lézer, amellyel egy kis térrészre tudjuk a fényt fókuszálni. Az immunkomplexek méretére és számára elméletileg a 0° -os (szemből való) detektálás lenne a legalkalmasabb, de a megvilágító lézer fényforrás jelét a hasznos jeltől nagyon nehéz lenne különválasztani. Ezért a legtöbb nefelométerben 90° -os detektálást végeznek (7-5. ábra).

A nefelometria a kisebb méretű immunkomplexe-ket érzékenyebben detektálja, mint a turbidimetria, és hígabb rendszerekben is használható, a mérési ciklusa rövidebb. A kinetikus detektálást alkalmazó készülékek a fényszórás folyamatos követésével érzékelik, ha az antigénkoncentráció kívül esik a linearitási tartományon, és a mintát ennek megfelelően automatikusan hígítják. A turbidimetriás és a nefelometriás módszerek érzékenysége az antigéntől függően kb. 10^{-11} mol/l koncentrációig terjed.

Immunkémiai analitikai technikák (immunoassay-k)

Ma a rutin laboratóriumi gyakorlatban a legérzékenyebb peptid-, fehérjekimutatási és mennyiségi meghatározási módszer az immunoassay (a módszerről a 6. fejezetben is olvashatnak, itt elsősorban az automatizációra fektetjük a hangsúlyt). Érzékenységét elsősorban annak köszönheti, hogy az antigén-antitest reakció detektálásához jelzett antigént vagy antitestet használ. A jelző lehet radioaktív izotóp, fluoresz-

cens vagy kemilumineszcens molekula, ill. enzim. Az egyes módszerek elnevezései is innen származnak: RIA, FIA, LIA, EIA stb. Történelmileg az első sikeres eljárás a radioimmunoassay volt, amelyet a hatvanas években fejlesztettek ki, természetesen akkor még manuális úton mértek, és 1-2 napig is eltartott az analitikai művelet. A radioaktív jelölést fokozatosan kiszorította a nem izotópos eljárások sokasága, de ma is sok biológiailag aktív vegyület van, amelyet kizárólag RIA-val tudunk meghatározni.

Az immunoassay-k csoportosítása

Logikailag kétféle csoportosítás jön szóba:

1. A reakciós közeg felépítése szerinti csoportosítás.
2. Az immunreakció típusa szerinti felosztás.

A közeg alapú csoportosításban kétféle assay lehetséges:

- Szilárd fázisú (heterogén) assay, ahol vagy az antitest, vagy az antigén valamilyen szilárd hordozóhoz van kötve, és az immunkomplexek a szilárd fázis felületén jönnek létre.
- Homogén assay, ahol az immunkomplexek oldatban maradnak, nincs szükség szilárd hordozó közegre.

A reakció elve alapján lehet:

- Telítési assay.
- Kompetitív assay (lásd később részletesen).

TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS

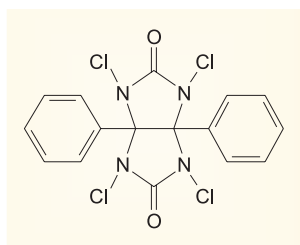
A RIA módszerek a hatvanas évektől kezdtek elterjedni, nagyon sok laboratórium maga állította elő a kívánt antitestet és az izotópjelölést is házilag végezték. A hetvenes években megindult a műszerek technikai fejlődése, az automatizáció. Kifejlesztették a 96 lyukú inkubációs lemezeket, az ehhez szükséges pipettorokat és mosógységeket, ill. a lemez mélyedéseiben lévő reakcióelegy optikai denzitását (abszorbananciáját) leolvasó fotométereket. Ezzel párhuzamosan kidolgozták az enzimjelölést glutáraldehid-kereszt-kötés alkalmazásával. Hamarosan forgalomba kerültek az első enzimjelölést alkalmazó ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) gyári tesztek, de ezeknél továbbra is több manuális lépést kellett beiktatni. Időközben a műszeres analitika teljes auto-

matizációjú, elsősorban RIA és ELISA készülékeket fejlesztett ki, ún. batch típusú analizátorokat, amelyek egyszerre egyféle analit nagyszámú mérésére voltak alkalmasak. A kilencvenes évektől kezdtek használni a monoklonális antitesteket és a nem izotópos jelölőket, ami forradalmasította az immunoassay-n alapuló módszereket. A számítógépes vezérlést alkalmazó új műszer család a számos új eljárás adaptálásával már teljes automatizációt biztosított, és ún. beteg orientált elven működött. A betegorientált készülékek egy mintából többféle meghatározást képesek elvégezni a készülékbe előzetesen bevitt kérőlista alapján. Ma már a laboratóriumok önálló számítógépes rendszerrel (LIS) vannak ellátva, amely kommunikál a kórházi számítógépes rendszerrel (HIS), és a vizsgálatkérések és az eredményközlés is on line megy végbe.

AZ IMMUNOASSAY-KBEN LEGGYAKRABBAN ALKALMAZOTT JELÖLÉSEK

Radioaktív izotópos jelölés

Ma a leggyakrabban alkalmazott jelölő a ^{125}I -izotóp. A fehérjék jodinációját korábban klóramin-T segítségével végezték, az izotópot tartalmazó Na-jodidot oxidálva, az a fehérjék tirozin aminosavába épül be. Az oxidációs folyamat során a fehérje szerkezete és biológiai funkciója károsodhat, ezért ma már kevésbé agresszív módszereket alkalmaznak. Egy korszerű, oxidációs jodinálásra alkalmas vegyület szerkezete a 7-6. ábrán látható.



7-6. ábra. Korszerű jodinációs reagens szerkezete (1,3,4,6-tetrakloro-3a,6a-difenil-glikoluril)

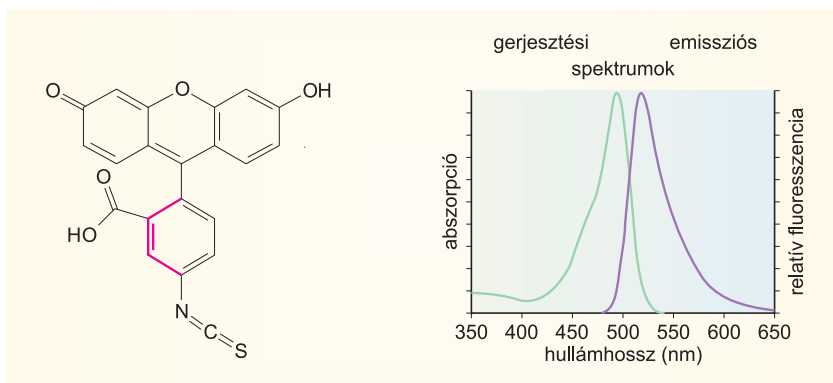
Az izotópjelölés legfőbb korlátja az aránylag rövid felezési idő, ezért a kiteket ennek megfelelően időzítenie kell felhasználni.

Fluoreszcenciás jelölés

A fluoreszcens emisszióra alkalmas vegyületek általában kettős kötéseket tartalmazó gyűrűs molekulák, de ismerünk atomi fluoreszcenciát is (lantanida elemek). Közös jellemzőjük, hogy szerkezeti sajátságuktól függő hullámhosszú fénnyel gerjesztve őket, a gerjesztett állapot energiatöbbletét foton formájában, szintén az adott struktúrára jellemző hullámhosszon bocsátják ki. A gerjesztett állapot élettartama (ún. fluoreszcens élettartam) a legtöbb vegyület esetében néhány ns, de léteznek olyan molekulák, atomok, ahol az élettartam a μs -os időskálán írható le (pl. eurórium, terbium, XL 665). Néhány széles körben elterjedt fluoreszcens jelölő tulajdonságait a továbbiakban részletezzük. Megjegyezzük, hogy a fluoreszcenciára képes molekulákat nem mindig közvetlenül kötik az antitestre vagy az antigénre, hanem az immunreakció lezajlása után injektálják a rendszerhez. Itt az immunkomplexeket enzimmel jelölik, és a fényemisszió az enzimatis aktivitás hatására jön létre.

A fluorescein izotiocianát (FITC) reaktív izotiocianátcsoporthoz tartozik, amely enyhén lúgos közegben kovalens kötésbe lép a fehérjék szabad aminosav csoportjaival (diamino-monokarbonsavak és láncvégi aminosavak). A jelölés után a feleslegben maradt szabad FITC-t a rendszerből el kell távolítani (dialízissel, kromatográfiával stb.). Az FITC előnye a jó kvantumhatásfok és az egyszerű jelölési technika, hátránya az egymáshoz közel eső gerjesztési és emissziós hullámhossz, ami a detektálást optikailag megnehezíti. A

7-7. ábra. FITC szerkezeti képlete és spektrális tulajdonságai



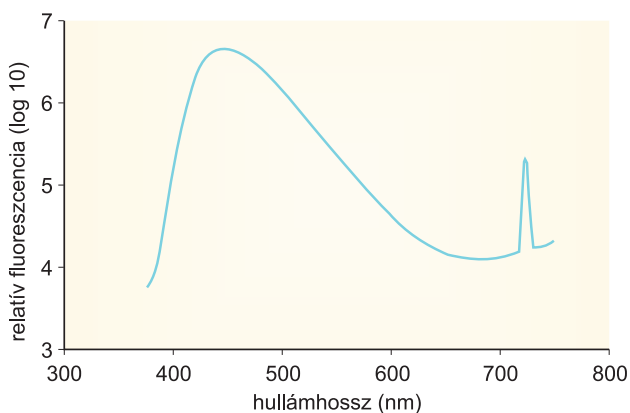
molekula szerkezete és spektrális tulajdonságai a 7-7. ábrán láthatók.

A lantanida csoport elemei, ezek közül is az *europium* szintén használatos a fehérjék (antitestek) jelölésére. Legérdekesebb sajátáguk, hogy a fluoreszcencia-élettartamuk hosszú, ezért alkalmasak ún. időfelbontású analízisre. Az europium képes a gerjesztés során nyert energiátöbbletet egy megfelelő közelségben lévő másik fluoreszkáló molekulának átadni (donor–akceptor páros), és a hasznos jel a második komponens fluoreszcenciája lesz. A jelenséget fluoreszcencia rezonancia energia transzfernek (FRET) nevezzük (a részleteket lásd később).

A fluoreszcens jelölők másik csoportja az ún. *fluorogén vegyületek*, amelyeket az előbb vázoltak szerint nem kötik antigénhez vagy antitesthez, hanem az immunreakció után injektálják az antigén-antitest komplexhez. A fluorogén vegyületek önmagukban nem mutatnak emissziót, rendszerint foszfátészter formában vannak jelen. A fényreakció indukálásához enzimjelölést (alkalikus foszfátáz) alkalmaznak, ahol az AP enzim az észterkötést hasítja, kiváltva ezzel a fluoreszcenciát. Az egyik legismertebb fluorogén molekula egy kumarinszármazék, a metil-umbelliféron-foszfát-észter. Emissziós sajátága a 7-8. ábrán látható.

Kemilumineszcenciás módszerek

A kemilumineszcencia alkalmazása a fluoreszcenciával szemben számos technikai előnyt jelent. Nincs szükség gerjesztő fényre, hiszen a gerjesztett állapot kémiai reakció vagy elektrontranszfer útján jön létre, így nem kell számolnunk a gerjesztés zavaró optikai hatásaival. További előny, hogy a lumi-



7-8. ábra. Szabad kumarinmolekula emissziós spektruma (gerjesztés: 360 nm; kvantumhatásfok: 0,73)

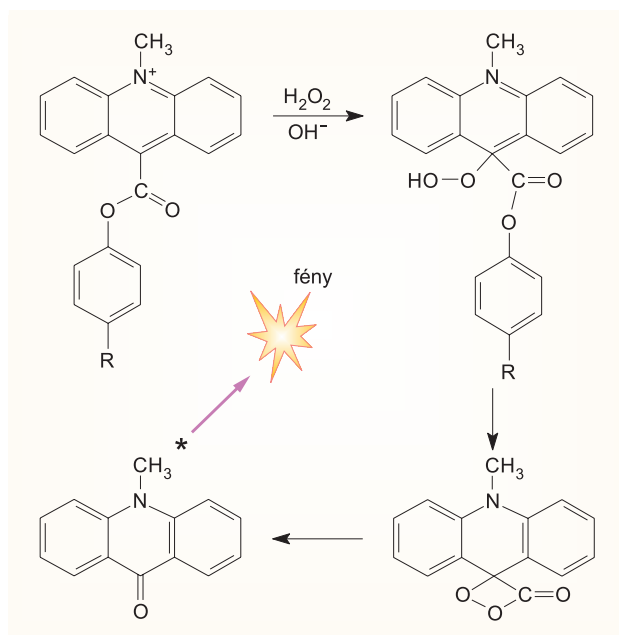
neszcenciás jel detektálásához nincs szükség optikai elemekre (monokromátor vagy fényszűrő), így a detektort (fotoelektron-sokszorozó) a mintához közel tudjuk elhelyezni, a fényvesztés minimalizálásával. A kemilumineszcenciás jelölők ugyanakkor molekuláris sajátágaik alapján időben különböző kinetikájú fényjelet produkálnak. Alapvetően háromféle jeltípussal találkozunk:

- Felvillanás (flash) jel, amely általában 1 s alatt lezajlik,
- „Derengés” jel, amely elsősorban enzimkatalizált reakció során jön létre, és akár több percig is stabil jelet produkál,
- Időben majdnem konstans fényjel, amelyre legjobb példa a szentjánosbogárból izolált, ATP-függő luciferin/luciferáz rendszer emissziója.

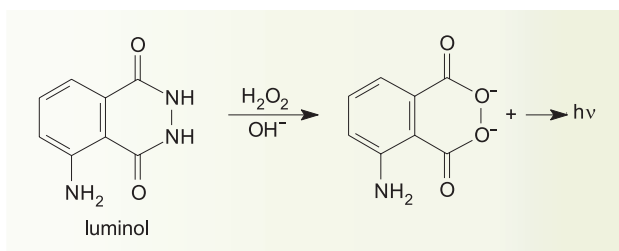
Itt is érvényes az előzőekben tárgyalt elv, hogy a jelölés lehet kovalensen kötött kemilumineszcenciára alkalmas molekula vagy a fluorogén mintára enzimjelölést alkalmazó rendszerhez injektált luminogén vegyület (pl. észterkötésben).

Felvillanás (flash) típusú jelölés

Bevált jelölők az *akridíniumészter* típusú vegyületek. Kovalensen köthetők a fehérjékhez, lúgos közegben, hidrogén-peroxid jelenlétében kb. 1 s-ig tartó fényjelet produkálnak (7-9. ábra).



7-9. ábra. Akridíniumészter jelölő fénykibocsátásának mechanizmusa



7-10. ábra. Luminol fényemissziójának mechanizmusa

A *luminol* régóta ismert molekula, lúgos közegben vagy peroxidvegyületek és peroxidáz enzim jelenlétében fényt emittál, az emisszió flash típusú (7-10. ábra).

Erősítő komponensek hatására az emissziós kinetika megváltozik, és időben hosszú ideig stabil fényjel keletkezik. Az egyik leggyakrabban alkalmazott erősítő a p-jodofenol, a jelenséget *erősített kemilumineszcenciának* nevezik (ECL). A luminol alapú jelölések-nél kiterjedten alkalmazzák az ECL módszert.

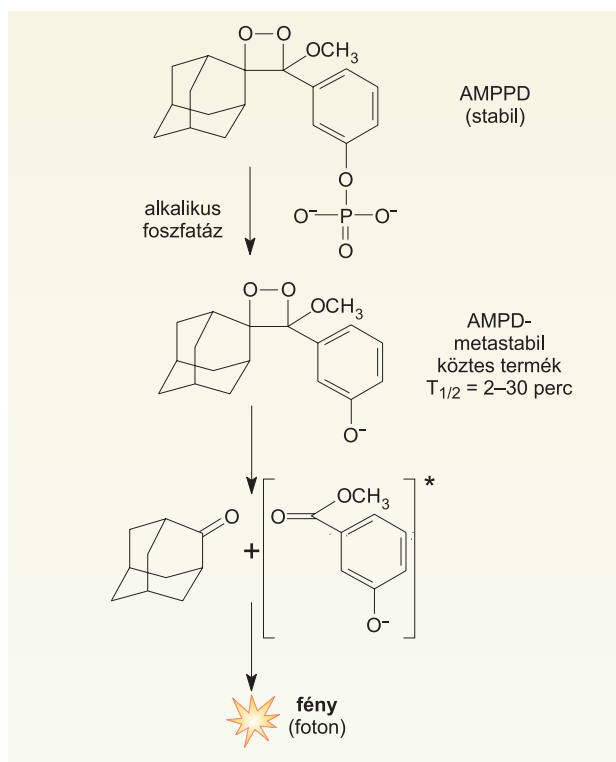
Elektrokemilumineszcenciás jelölés

Ruténiumkomplex. A trisz(2,2'-bipiridil)ruténium-(II) vegyület alkalmas fehérjék közvetlen jelölésére. A gerjesztést itt nem kémiai reakció során felszabaduló energiátöbblet idézi elő, hanem elektromos áram (elektrokemilumineszcencia). A rendszerhez szükséges egy elektrondonor és egy speciális, elektródot tartalmazó mérőcella. Az elektrondonor szerepét a tripropilamin (TPA) veszi át, amellyel a mérőcellát a benne lévő komplexekkel együtt feltöltik. Elektromos áram hatására a TPA egy elektront ad át a ruténium³⁺ komplexnek, mely redukálódik ruténium²⁺-vé, gerjesztett állapotba kerül, és egy fotont emittál (620 nm). A ruténiumkomplex az elektron leadásával regenerálódik, és újabb gerjesztési ciklusra lesz képes. A fényreakció mindaddig folytatódik, amíg az aktív TPA el nem fogy, így a fényjel felerősödik.

Derengés (glow) típusú jelölés

A dioxetán-foszfátészterek luminogén vegyületek, azaz észteráz (pl. AP) hatására kerülnek gerjesztett állapotba, vagyis enzim jelölt használó immunkomplexek detektálására alkalmas. A reakció sémáját a 7-11. ábrán láthatjuk.

A luminogén szubsztátot az immunkomplex-hez injektálva az alkalikus foszfátáz enzim hasítja a foszfátészter-kötést, amelynek eredményeképpen egy



7-11. ábra. Dioxetán-foszfátészter fényemissziójának mechanizmusa [AMPPD: 3-(2'-án-4-metoxi-4-(3''foszforiloxi)fenil-1,2-dioxetán; AMPD⁻: metastabil köztes termék, 2-30 perc élettartammal]

több perces élettidejű köztes termék képződik, amelynek a bomlása során kialakul a gerjesztett állapot és a fényemisszió. A jel mindaddig közel konstans, amíg megfelelő mennyiségű szubsztát van jelen a rendszerben. A módszer érzékenysége 10⁻¹⁵ mol vagy kevesebb AP enzim molekula (vagyis immunkomplex).

A MÉRT JEL DETEKTÁLÁSÁNAK MÓDJAI

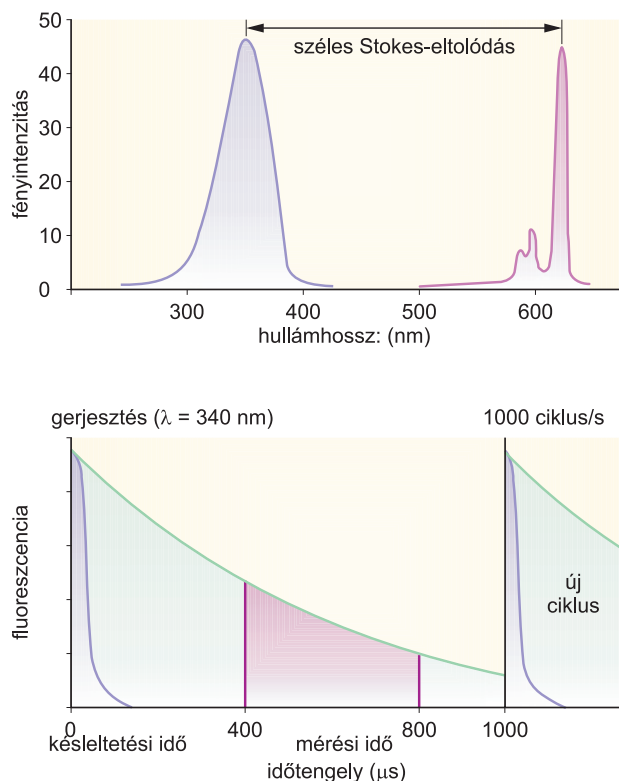
A ¹²⁵I radioaktív jelölésű módszereknél γ-számlálót alkalmaznak, a rövid felezési idejű (60 nap) izotópból magas specifikus aktivitása miatt csak igen kevés szükséges a mérésekhez, és a gyors lebomlás miatt a radioaktív hulladék kezelése viszonylag egyszerű.

A fényemisszió mérésén alapuló módszerek (mind fluoreszcenciás, mind kemilumineszcenciás) érzékenységét nagyban növeli az ún. egy foton számlálásos technika. Ennek lényege, hogy speciális (külön erre a célra gyártott) fotoelektron-sokszorozót alkalmazva a mintáról beérkező alacsony intenzitású jel fotonjai a detektort egyesével érik el. A fotoelektro-

mos hatás következtében minden egyes, a fotokatódot érő foton elektronlavinát indít el a csőben, amely az anód ellenállásán keresztül feszültséget indukál. Egy elemi jelenség a modern készülékekben 1 ns alatt lejátszódik, de tudnunk kell, hogy a létrejövő hasznos jel (feszültségtüske) szélessége is 1 ns körül mozog, melyet impulzus üzemű erősítővel alakítanak át a készülékbe épített számítógép számára kompatibilis formátumba. Az erősítő megkülönbözteti az egyetlen foton okozta és az egyszerre, egy csomagban érkező több foton keltette jelet, amelyet azután nem vesz figyelembe (diszkriminátor elv). Amennyiben a fényjel túl erős (vagyis a fotonok csomagokban vagy folytonosan érkeznek), lehetőség van egy optikailag semleges (szürke) szűrő alkalmazására, hogy a linearitás elve megmaradjon. A készülékek az időegység alatt beérkező fotonok számát mérik, pl. cps egységben (beütés/szekundum) vagy egy adott idő alatt beérkező összes foton mennyiségét (valójában integrálásként fogható fel).

Az *időfelbontású technika* szintén egy foton számláláson alapul, de ehhez a módszerhez hosszú élettidejű fluoreszcens jelölők és impulzus üzemű fénygerjesztés szükséges. Az első kereskedelmi forgalomba kerülő időfelbontású detektálást alkalmazó gyári kiszerelésű teszt európiumot használt. Az európium 340 nm-en gerjeszhető, és optikailag ettől távol eső, 620 nm-es emissziót ad, minimálisra csökkentve a gerjesztő fény detektorba szóródását. A gerjesztés 1 μ s-ig tartó fényfelvillanások sorozatából áll, két ciklus közt 1 ms intervallummal. A mintában esetleg jelen lévő nem specifikus háttér-fluoreszcencia ns-ok alatt lecseng, ugyanakkor az európium fluoreszcencia-élettartama a ms-os időskálán van. Ezért ún. *időkapuzott megfigyeléssel* a gerjesztő impulzustól számítva 400–800 μ s közötti emissziót mérik egymás után több ezer ciklusban, a jeleket akkumulálják. Ezáltal elérhető lesz, hogy a háttér-fluoreszcenciát teljesen kiküszöbölve csak a hasznos jel kerüljön feldolgozásra. A módszer sematikusán a 7-12. ábrán látható.

E módszert ötvözhetjük a *FRET elvvel* is (fluoreszcenciarezonancia-energiatranszfer) ahol az antigént megcsapdázó két antitest mindegyike más módon van jelölve, donor–akceptor párost képezve. A donor lehet a korábbi példából ismert európium, az akceptor pedig pl. egy növényi eredetű bonyolult vegyület, fantázianeve XL 665. Impulzus üzemű UV lézer



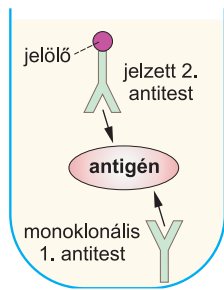
7-12. ábra. Időfelbontású fluoreszcenciadetektálás elve (európium jelölést alkalmazva)

gerjesztéssel a donor európium a kialakult immunkomplexben megfelelő közelségben lévő akceptort gerjeszti. Az akceptor jelét szintén az ismertett időkapuzott technikával mérik.

IMMUNOASSAY-K TÍPUSAI A KÖZEG KIALAKÍTÁSA SZERINT

Heterogén, szilárd fázisú assay-k

Ezeknél a módszereknél az immunreakció valamilyen szilárd hordozó felületén jön létre. Ez lehet egy kémcső fala vagy 96 lyukú lemez, mikro-, makrogyöngy, speciális töltettel rendelkező átfolyó rendszerű küvetták vagy mágnesezhető részecskék, számtalan megoldás ismert. A módszer lényege, hogy a reakcióban részt vevő egyik partnert (antigén vagy antitest) szorosan a hordozó fázishoz kötik, kovalensen vagy egyéb módon. A minta hozzáadása után a kialakult immunkomplexet el kell választani a felesleges molekuláktól, ezt mosással valósítják meg. Gyakran egy második inkubációra is szükség van, pl. jelölt második antitest hozzáadására, ekkor a detektálás előtt egy újabb mosási ciklus következik. A többlépé-



7-13. ábra. Szilárd fázisú (szendvics) immunoassay sémája, egyszerű csőben (bevont cső assay). A két antitest mindegyike monoklonális, az antigén más-más epitópjához kötődik

ses technika az ún. szekvenciális eljárás. Tehát a heterogén assay-kben szükséges a kötött és szabad fázis elkülönítése. A módszert sematikusan a 7-13. ábrán mutatjuk.

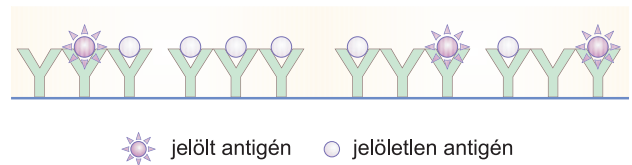
Homogén assay-k

A homogén módszereknél együtt vannak jelen a kialakult immunkomplexek és a komplexet nem képező molekulák (pl. a reagensben feleslegben lévő szabad antitestek vagy a minta egyéb fehérjemolekulái). A kötött és szabad molekulákat szeparáció/mosás nélkül, fizikai-kémiai módszerekkel különítik el egymástól. Homogén assay a fluoreszcenciapolarizáción alapuló eljárás (FPIA), ill. a FRET-technika. Részletesebben a reakciótípusok tárgyalásánál ismertetjük őket.

IMMUNOASSAY-K TÍPUSAI A REAKCIÓELV SZERINT

Telítési assay-k

Sokféle megoldás létezik, de a közös bennük, hogy akkor alkalmazzák, ha az antigén nagyméretű (pl. fehérje) és több antigéndeterminánssal rendelkezik. Mind heterogén, mind homogén rendszerben kialakítható. A 7-13. ábrán valójában egy heterogén telítési assay látható („szendvics”-eljárás). A szilárd fázist leggyakrabban monoklonális antitesttel borítják, elsődlegesen ez adja a módszer specificitását. A második, jelzett antitest lehet poliklonális, mert a szekvencialitás miatt nem vetélkedik az első kötással. Abban az esetben, ha a mérendő anyag maga is humán immunglobulin, akkor az antigént kell a szilárd fázishoz kötni, és az inkubáció során a mérni kívánt immunglobulin képez immunkomplexet a hordozó felületén. A második, jelzett antitest pedig valamilyen



7-14. ábra. Szilárd fázisú kompetitív immunoassay elve. Az ábra a végső inkubálás utáni (mérés előtti) állapotot tükrözi, A kompetitív módszernél a jel nagysága fordítottan arányos az analit koncentrációjával. Az eljárás szintén alkalmas homogén és heterogén esszék kialakítására

állatban termeltetett antihumán immunglobulin. A telítési módszereknél a jel nagysága egyenesen arányos az analit koncentrációjával, szokás az eljárást *immunometrikus assay-nek* is nevezni.

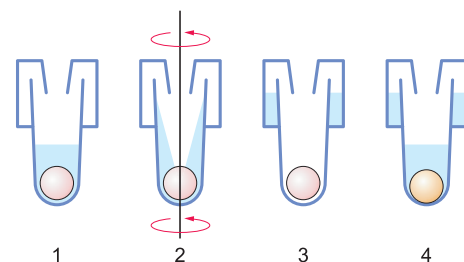
Kompetitív assay-k

Általában akkor alkalmazzák őket, amikor a kimutatni kívánt molekula tömege kicsi (pl. gyógyszerek, szteroidhormonok stb.), de autoantitesttiter-méréseknél is használatosak (pl. anti-TPO, anti-Tg). A módszer lényege, hogy a meghatározás során standard mennyiségű jelölt antigént hoznak össze a mintában lévő ismeretlen koncentrációjú antigénnel és a jelöletlen/jelölt molekulák arányától függően versengés alakul ki a specifikus antitesteken lévő kötőhelyekért. A leegyszerűsített elv a 7-14. ábrán látható.

NÉHÁNY PÉLDA A HETEROGÉN ELJÁRÁSOK TECHNIKAI MEGOLDÁSAIRA

Makrogyöngy-módszer

Az eljárás speciális tesztegységeket használ, melyekben egy néhány mm átmérőjű gyöngy található. A gyöngy felszínéhez kötik az antitestet vagy az anti-



7-15 ábra. Makrogyöngyöt alkalmazó heterogén immunoassay egyes lépései sematikusan (1: inkubáció, 2: többszöri mosás, 3: a mosófolyadék végső eltávolítása, 4: szubsztrát injektálása után létrejövő kemilumineszcenciás fényemisszió)

gént, a készülékben található a reagens, amelyben AP enzimmel jelölt antitest van. A 7-15. ábrán láthatók a meghatározás egyes lépései.

Az első lépésben a készülék a mintát és a reagenst a tesztegységbe pipettázza, majd inkubáció következik. A második lépés a többszöri mosás, az egyes ciklusok között az egység nagy sebességgel forog, a centripetális erő a folyadékfázt a felső, dupla falú részbe viszi. A kiszáritott gyöngyhez (3. lépés) egy injektor dioxetán-foszfát-észtert ad, ahol megindul az enzimkatalízis, az emittált fényjelet a 4. lépésben a fotoelektron-sokszorozó méri.

Mikrogyöngy-módszer

Nagyon sokféle megoldás létezik, itt egy paramágneses sajátságú gyöngyre és elektrokemilumineszcenciára épülő eljárást mutatunk be. A gyöngyök streptavidinnel borítottak, amihez biotinilált antitestet kötnek. A gyöngyök felszínén kialakulnak a mintában és a reagensben lévő antigénekből és antitestekből az immunkomplexek. A 2. antitest ruténium jelölőt hordoz (7-16. ábra). A felesleges molekulák kimosását a rendszerből szellemes módon, egy mágnes segítségével biztosítják, amely az inkubálócellában lévő mikrogyöngyöket immobilizálja. A fényemisszió elektromos gerjesztésre következik be, a módszert *elektrokemilumineszcenciás immunoassay-nek* (ECLIA) nevezik.

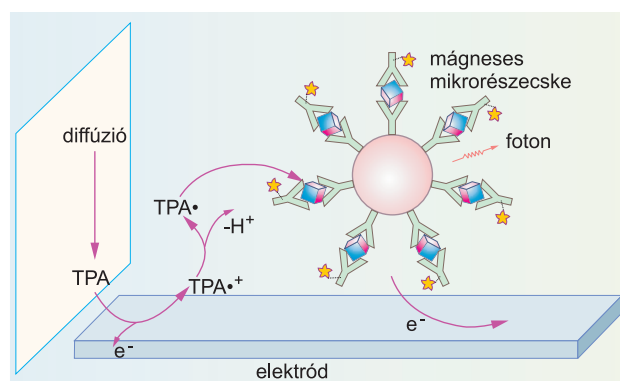
Enzimjelölés alkalmazása (ELISA, EIA)

Heterogén assay, a reakcióhoz általában 96 mélyedést tartalmazó lemezeket használnak. A mélyedésekben található a kötött reakciópartnerek egyike, a kialakuló immunkomplexek tormaperoxidáz enzim-

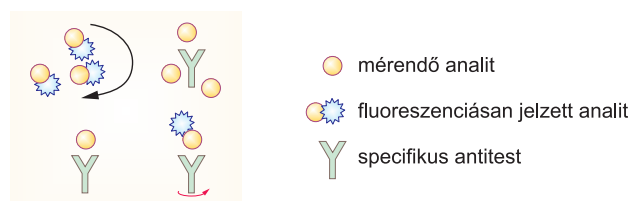
mel jelöltek. Mosás után a mélyedésekbe a peroxidáz enzim szubsztrátját pipettázza a készülék, majd egy adott inkubációs idő után erős sav hozzáadásával a színes termék képződését leállítja. Speciális ELISA-fotométerrel minden egyes lyukban lévő reakcióelegy abszorbanciája leolvasásra kerül. A hagyományos színezékképzésen kívül fluoreszcenciás vagy luminometriás módszereket is kifejlesztettek.

PÉLDA HOMOGÉN ELJÁRÁS TECHNIKAI MEGOLDÁSÁRA

A legelterjedtebb homogén assay a *fluoreszcenciapolarizáción* alapuló módszer (FPIA). Kisméretű antigének (pl. gyógyszerek) mennyiségi meghatározására alkalmas kompetitív assay. A készülék a mérés során standard mennyiségű, fluoreszcenciásan jelzett antigénhez hozzákeveri a fehérjementesített mintát és a specifikus antitestet. Az inkubáció során vetélkedés alakul ki az antitestkötésért. Nagy analitkoncentrációnál kevés jelzett molekula tud kötődni, kis értékeknél pedig sok fluoreszkáló analit kötődik az antitesthez. A fluoreszcenciapolarizáció foka a molekulák rotációs mozgási szabadságát tükrözi, ezért a szabadon maradt jelzett molekulák gyors rotációs mozgása miatt a polarizációs fok alacsony lesz. Tehát a gyors molekuláris mozgások alacsony, nullához közeli fluoreszcenciapolarizációval (p) jellemezhetők, a gátolt, lassú rotációs mozgás (pl. antitesthez kötött fluoreszcenciásan jelölt analit esetében) pedig magasabb p-értékkel. A p dimenzió nélküli szám, maximális értéke az adott fluoreszkáló molekula fizikai kémiai sajátságaitól függően megközelítheti a 0,5-ös értéket. A mérés rendkívül egyszerű: a mintát függőleges síkban polarizált gerjesztő fénnel világítjuk meg, majd az emittált fény intenzitását a gerjesztő fénnel pár-



7-16. ábra. Heterogén szilárd fázisú immunoassay (ECLIA-módszer) elve



7-17. ábra. FPIA mérés elve. A nyilak mérete a molekulák rotációs mozgási szabadságát jelképezi (a kicsi nyíl az antitest kötésben lévő komplex lassú mozgására, a nagy nyíl a szabad, jelzett analitok gyors forgó mozgására utal)

huzamos, ill. azzal 90° -os szöget bezáró polarizációs szűrőn keresztül detektáljuk. A polarizációs fok a két szűrőállásra kapott intenzitás értékekből, egyszerű képlet segítségével számítható. Az elmondottak alapján amennyiben a jelzett analit az antitesthez kötődni tud, mozgása lelassul, a polarizációs fok nő. Tehát a fluoreszcenciapolarizáció értéke fordítottan arányos a mintában lévő, mérni kívánt molekulák koncentrációjával (7-17. ábra).

A *homogén módszer előnye* az egyszerűség és a gyorsaság, mivel nincs szükség szeparációra és mosásra. Hátránya, hogy pl. az FPIA-eljárás csak kisméretű antigének mérésekor használható. A korábbiakban vázolt FRET-technika viszont már alkalmas fehérjék mennyiségi meghatározására is homogén assay-ben, pl. a prokalcitonin mérése ilyen elv alapján is lehetséges.

AZ IMMUNOASSAY-K KALIBRÁCIÓJÁNAK MÓDJAI

A mennyiségi meghatározások alapvető kérdése a megfelelő standardok alkalmazása és maga a standardizálás módja. Mivel 10^{-12} mol/l vagy annál is kisebb koncentrációk méréséről van szó, ezért nagyon fontos a megfelelő tisztaságú készítmények használata, ezt ma már sokszor rekombináns fehérjékkel, peptidokkal érik el. A legtöbb cég a diagnosztikai kiteknél megadja a standardok visszavezethetőségét is. A kalibrációra használható többpontos módszer (rendszerint 6 standard segítségével), ill. ún. mesterkalibráció. Mindkét esetben parallel méréseket kell végezni, készüléktől függően duplikátumban vagy akár négyes parallelben. Általánosan igaz, hogy kalibrációt az immunoassay-knél 2 hetente, új gyártási számú (lot-szám) reagens használatakor, ill. a minőség-ellenőrzési szabályok szerinti, recalibrációt igénylő hiba esetén kell végezni. Az automatizált technikáknál a legtöbb készülék vezérlő számítógépébe vonalkódos beolvasással be kell vinni az adott módszerre, kalibrátorra, reagens lot-számra jellemző kalibrációs görbe adatait, és a készülék összehasonlítja az aktuálisan mért jeleket a gyárilag definiált jelekkel. Szintén előre definiált adatok alapján a készülék vezérlőegysége jelzi, hogy sikeres volt-e a kalibráció, a megengedettnél nagyobb eltérés esetén sok műszer automatikusan le is tiltja a mérést. A manuálisabb technikáknál (pl. be-

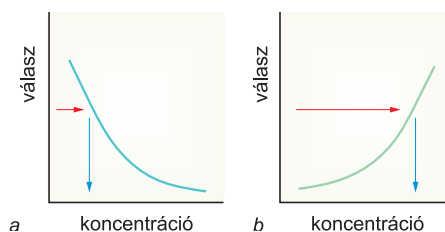
vont csöves, ELISA-módszerek) a felhasználónak kell eldöntenie, hogy a kalibráció megfelelő volt-e vagy sem. Általános szempont még, hogy a kalibrátoroknak ugyanabban a közegben (mátrix) kell lenniük, mint a mintáknak.

Hatpontos kalibráció

Parallel mérések szükségesek, a mérési pontok átlagából a készülékek megrajzolják a *kalibrációs görbét* vagy kiszámolják annak egyenletét. Kompetitív eljárásnál fordított a jel-koncentráció arányosság, telítési assay-nél egyenes (7-18. ábra).

Szokás a kalibrációs görbét a kötött/szabad antigén arányában is megadni, ekkor pl. egy kompetitív assay mérési pontjai a 7-19. ábrán látható módon néznek ki, bonyolult matematikai ún. 4 paraméteres illesztési algoritmus felhasználása után.

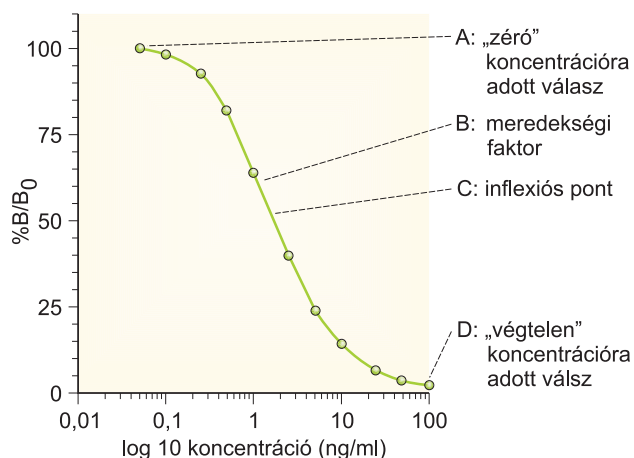
A kalibrációs görbe esetenként „kiegyenesíthető” az ábrázolásmód függvényében (pl. logit-log, log-log



7-18. ábra. Jel-koncentráció összefüggés

a) Kompetitív assay esetében

b) Telítési assay esetében



7-19. ábra. Kompetitív assay négyparaméteres illesztésű kalibrációs görbéje a kötött-szabad antigénhányad (% B/B₀) alapján. A vízszintes tengely logaritmikus skálájú.

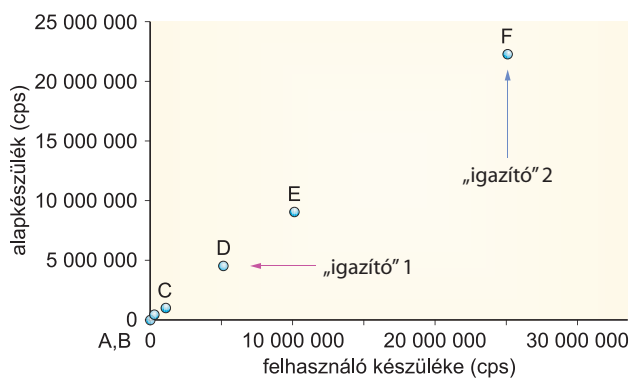
stb. átszámítás/átalakítás/transzformáció). A készülékek megadják a kalibrátorok névleges értékeit és az aktuális görbe alapján visszaszámolt koncentrációkat. A visszaszámolt értékek és a névleges értékek összehasonlításával a kalibráció elfogadhatósága megítélhető.

Mestergörbén alapuló kalibráció

Kiterjedten alkalmazott módszer, számos előnnyel rendelkezik. A módszertől, a detektálás elvétől függően rendszerint két „igazító, korrigáló” (adjustor) standard szükséges, amely lefedi a lineáris mérési tartományt (alacsony, magas adjustor). A gyártó egy adott reagens és kalibrátor lot-számra több készüléken sok párhuzamos mérést végez 6–10 kalibrátorkoncentráció felhasználásával, a kapott átlagjelek és a koncentráció képezi az adott rendszerre nézve igaz ún. *mestergörbét*. A gyártó a mestergörbére kapott jelek adatait mellékeli a reagenshez vonalkód formájában, amelyet kalibrálás előtt be kell olvasni a készülékbe. Ezután következik a saját készülék illesztése a gyári ún. alapkészülékhez. Ez valójában nem tekinthető a hagyományos értelemben vett kalibrációnak, mert azt a gyár már elvégezte. Az „igazító” kalibrátorok (2–4 parallel) mérésekor kapott jelet a készülék számítógépes algoritmus vizsgálja és összehasonlítja a mestergörbe megfelelő mérési pontjainak jelével (pl. fotonszám). Amennyiben az azonos koncentrációra kapott, gyártó által megadott és saját magunk által mért fotonszámokat megvizsgáljuk, lineáris összefüggést találunk, függetlenül a kalibráció típusától. A 2 adjustor jeléből egyenest képezve és az egyenes egyenletét összehasonlítva a gyári adatokkal, megkapjuk az aktuális „igazító” egyenes egyenletét:

$$y = a \cdot x + b$$

ahol y a gyári adat, x a saját adjustorra mért adat, a az egyenes meredekségének együtthatója, b pedig a tengelymetszet. Ideális esetben a saját egyenesünk pontosan illeszkedik a gyártó által megadott adatokra, ezért a meredekségi együttható értéke 1,0 lesz. Amennyiben a saját készülékre kapott egyenes egyenlete eltér a gyártó által megadottól, az aktuális meredekséget a rendszer a mestergörbe meredekségéhez illeszti az „ a ” együttható korrekciójával. A még elfogadható korrekciós tartomány 0,8–1,2 között változhat. Ennél nagyobb eltérés esetében durva hibával



7-20. ábra. Mesterkalibráció: a gyártó által megadott és a saját mérés alapján kapott értékek összevetése. Az alapkészülék és a saját készülék kalibrációjának egymáshoz való viszonyítása

kell számolnunk, és a hiba felderítése, kiküszöbölése után újra kell kalibrálnunk. A rendszer a tengelymetszet értékét is figyeli, ennek különösen a kompetitív assay-knél van jelentősége. Egy grafikus ábrázolású példát a mesterkalibrációra a 7-20. ábrán mutatunk.

Példa egy mesterkalibrációra: TNF- α kalibrációs egyenlete. TNF Kit Lot 153, az illesztett egyenes adatai: meredekség (a) 1,068, tengelymetszet (b) 3226 cps. A kalibráció megfelel az elfogadhatósági kritériumoknak.

A mesterkalibráció előnye, hogy a mestergörbe minden egyes pontja (szemben a felhasználó által mindig aktuálisan végzett 6 pontos kalibrációval) a gyártó által sok-sok parallel mérés alapján nagy pontossággal jellemzi az adott adjustorra elvárható jel nagyságát. További előny a reagensmegtakarítás, a 12 mérési pont helyett rendszerint csak 4 mérést kell végeznünk. Természetesen mindegyik típusú kalibráció után kétszintű, független kontrollméréssel ellenőrizzük a módszert.

Analitikai interferenciák

Az interferenciák egy része a betegek mintáinak saját-ságaiból is származhat. Itt azokra a zavaró tényezőkre térünk ki, amelyek in vitro képesek a valóságtól eltérő eredményeket produkálni.

Hemolízis, lipaemia, sárgaság

Az immunkémiai módszerek a hagyományos fotometriánál kevésbé érzékenyek ezekre a tényezőkre.

Minden teszt leírásában megtalálhatók azok a kritikus határértékek, amelyek felett a vizsgálatot elvégezni nem szabad.

Heterofil antitestek jelenléte a mintában

Az átlagpopulációban is előfordul, hogy a betegek vérszéruma ismeretlen okok miatt heterofil antitesteket tartalmaz különböző állati immunglobulinok ellen. Ez különösen állatgondozók vagy háziállatot tartók vizsgálatakor lehet probléma. Mivel a tesztek állati antitesteket tartalmaznak, ezért a beteg állati immunglobulin-ellenes ellenanyagai interferálhatnak a kitben található antitestekkel, hamisan magas vagy alacsony eredményt adva (a teszt típusától függően). Külön ki kell térnünk az antiegér-immunglobulin kérdésére.

HAMA (heterofil antiegér antitest). A monoklonális immunglobulinok jó része egér eredetű, ezért az egér-immunglobulin-ellenes antitestek különösen nagy problémát okozhatnak az immunkémiai módszereknél (pl. tumormarkermérések). A jelenség gyakorisága nő, sok beteg kap egér-immunglobulin-készítményt diagnosztikai vagy terápiás céllal (pl. az ún. célzott immunterápia alkalmával). A telítési immunoassay-kben okoz problémát, szintén hamisan magas vagy alacsony eredményeket előidézve.

Analitellenes autoantitestek

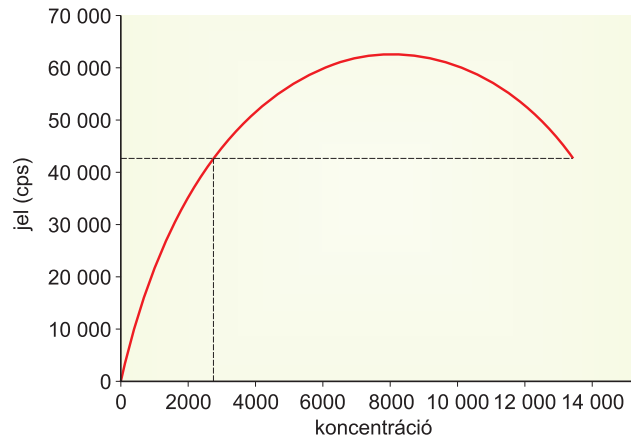
Lehetnek a mintában a mérni kívánt analit elleni immunglobulinok is, erre jó példa az anti-Tg autoantitest. Ezért Tg-vizsgálat kérésakor érdemes az anti-Tg-titert is ellenőrizni, mert magas érték esetén a Tg-meghatározás eredménye fenntartással kezelendő. Más, saját fehérje elleni autoantitestek is előfordulhatnak, pl. CK, fehérjehormonok, troponin stb.

A reumatoid faktor (RF) szerepe

Titere az életkorral nő, időseknél akár 80%-os is lehet a magas RF incidenciája. Az RF sajátja, hogy hasonlóan a heterofil antitestekhez, bármilyen állati immunglobulinhoz képes hozzákötődni, meghamisítva a mérési eredményt.

„High dose hook” effektus

Valójában a mérni kívánt antigén extrém mennyisége idézi elő a jelenséget telítési assay-kben. A laboratóriumi szakember számára észrevehetetlen hiba, a kapott hamis eredmény gyakran a referenciatar-



7-21. ábra. „High dose hook” effektus jelenség. Extrém nagy analitkoncentrációnál gátolt a jelölt immunkomplexek kialakulása, a mért jel a valóságos koncentrációhoz tartozónál kisebb (lehet akár a referenciatartományon belül is)

ományba esik. A jelenség in vitro jön létre a mérőrendszerben, mert az antigén extrém nagy mennyisége gátolja a szekunder jelzett antitesttel kialakítandó szendvics létrejöttét, és a mosási fázis után tévesen alacsony jelet kapunk (7-21. ábra).

A jelenséget csak a beteg kezelőorvosa veszi észre, amennyiben az alacsony érték nem illik a klinikai képhez. Konzultáció után a hiba kiküszöbölhető a minta hígításával és újramérésével. Mindaddig hígítani kell a mintát, amíg az eredmény már nem mutat további koncentrációnövekedést.

INTERFERENCIÁK KIKÜSZÖBÖLÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI

Elsősorban a beteg szérumában jelen lévő antitest-interferencia csökkentésére törekszenek. Az egyik lehetséges módszer pl. az analit szempontjából semleges állati (egér) immunglobulin hozzáadása a reagensekhez (blokkolás). Csökkenthetjük az RF zavaró hatását immunglobulin-fragmentek (FAb2') alkalmazásával is. Az ún. visszanyerési (recovery) módszerek is használhatók pl. a Tg esetén, de valójában nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket.

Talán az egyik legegyszerűbbnek látszó eljárás az, ha interferencia gyanújakor a mintát egy másik módszerrel, másik antitesttel dolgozó laboratóriumba is elküldjük és összehasonlítjuk az eredményeket.

Különböző immunkémiai módszerek érzékenységének összehasonlítása

A 7-1. táblázatban feltüntettük a klasszikus (jelölt nem tartalmazó) és a modern immunanalitikai módszerek becsült kimutathatósági határértékeit. Az adatok csak tájékoztató jellegűek, mert fehérjék esetében sokszor nem tudjuk moláris koncentrációban megadni az analit mennyiségét, ill. a jelölt nem alkalmazó módszereknél ma már (a korábban is leírt) sokféle érzékenységnövelő eljárást alkalmaznak a különböző gyártók.

IRODALOM

BANGS, L. B.: New developments in particle-based immunoassays: introduction. Pure & Appl. Chem. 68(10): 1873–1879, 1996.

FORKMAN, J.: Optimal Calibration in Immunoassay and Inference on the Coefficient of Variation. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008.

TATE, J., WARD, G.: Interferences in Immunoassay. Clin. Biochem. Rev. 25(2):105–120, 2004.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904417/>)

<http://www.bangslabs.com/files/bangs/docs/pdf/304.pdf>

<http://www.slideshare.net/many87/immunological-methods-of-analysis-1>

<http://www.cwc.nic.in/main/HP/download/35%20Emission%20Spectroscopy%20and%20Nephelometry.pdf>

<http://www.rcpa.tv/parts/educational/immunology/RCPA3.pdf>

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652000000300008

<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=1CC1AF24-9D9B-4D21-B850-688931CF7E3B>

http://books.google.hu/books?id=_9kEeTjyJdMC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false

7-1. táblázat. Immunkémiai módszerek becsült (analitikai) kimutathatósági határértékei

<i>Jelölt nem alkalmazó módszer</i>	<i>Kimutathatósági határ (tömeg/térfogat koncentráció)</i>
immunprecipitáció	> 0,1 g/l
immunturbidimetria	> 0,05–5 mg/l
immunnefelometria	> 0,01 mg/l

<i>Jelölt tartalmazó módszer</i>	<i>Kimutathatósági határ (moláris koncentráció; mol/l)</i>	<i>Alkalmazott assay típusa</i>
RIA	10^{-12} – 10^{-13}	heterogén
FIA	10^{-11}	heterogén
FPIA, FRET	10^{-9}	homogén
LIA, ECLIA	10^{-12}	heterogén
EIA	10^{-12}	heterogén

Műszeres analitikai lehetőségek – Tömegspektrometria

MÁRK LÁSZLÓ

A tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) napjaink legáltalánosabban alkalmazott analitikai eljárása, amely alkalmas szerves és szervetlen komponensekből képződött ionok tömeg/töltés (m/z) arányának nagyhatékonyságú meghatározására. Kezdetben az eljárást tömegspektroszkópiának nevezték, hiszen az ionok egy fluoreszkáló ernyőn detektáltak, azonban ez az elnevezés napjainkban nem használatos. *A tömegspektrometria lényege, hogy a vizsgálandó vegyületek gáz halmazállapotú részecskéiből ionokat állít elő, majd ezeket a relatív tömegük és töltésük hányadosa szerint szétválasztja és detektálja.*

A tömegspektrometriás eljárások közel 100 éve járulnak hozzá a fizikai, kémiai, biológiai és orvosi kutatások rohamos fejlődéséhez. Napjainkban a tömegspektrométerek méretének és árának jelentős csökkenése nagyban elősegíti a módszerek elterjedését, így jelenleg ez az egyik legdinamikusabban fejlődő és legtöbbet alkalmazott analitikai eljárás. Rutinszerűen alkalmazható széles tömeg- és polaritástartományban különféle vegyületek tömegének és szerkezetének vizsgálatára. Intenzív a fejlesztés a különböző ionforrások területén is, amelynek eredményeként jött létre a két leggyakrabban alkalmazott technika:

- Mátrixsegített lézereszorpció (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).
- Elektrosprayionizációs (ESI, ElectroSpray Ionization) technika.

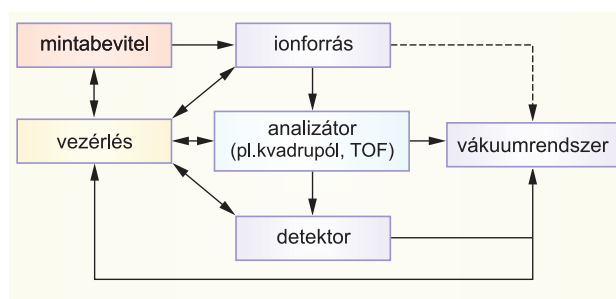
Ezek kifejlesztése alapvető fontosságú volt a modern tömegspektrometria fejlődésében, hiszen segítségükkel lehetőség nyílt nagy molekulatömegű, nem illékony biopolimerek, peptidek, fehérjék, valamint szintetikus rendszerek szerkezetének komplex tanulmányozására. Általánosan kijelenthetjük, hogy tömegspektrométerek rendkívül kis anyagmennyiségű minták (subfemtomol) gyors, pontos, megbízható analizisére alkalmasak, és az elválasztástechnikában használatos módszerekkel (HPLC, UPLC, nanoLC, nanoUPLC, gélelektroforézis) jól kombinálható készülékek.

A tömegspektrométer elvi felépítése

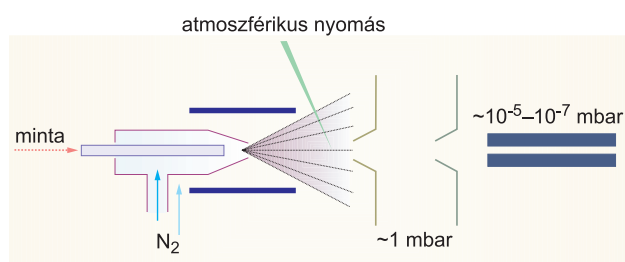
A tömegspektrométer-készüléknek rendelkeznie kell mintabevivő rendszerrel, ionforrással, analizátorral és detektorral, valamint az ezekhez kapcsolódó számítógépes adatfeldolgozó és irányító rendszerrel (7-22. ábra). Az analizátor, a detektor és a nem légköri nyomáson működő ún. vákuumionforrások (pl. vákuum-MALDI) viszonylag jelentős vákuum (10^{-4} – 10^{-7} mbar) mellett üzemeltethetők. A nagyvákuum az ion-molekula ütközések minimalizálását szolgálja, de hozzájárul az ionizáció és a fragmentáció hatékonyságához is. A nem kívánt kinetikai kölcsönhatások módosíthatják az ionok repülési pályáit, részben vagy teljesen kiolthatják töltésüket, és így reprodukálhatatlanná tehetik a tömegspektrumot, valamint csökken a műszer érzékenységét és felbontását.

A VÁKUUMRENDSZER

Az ionforrást elhagyó töltéssel rendelkező részecskék m/z értékének pontos meghatározása csak akkor lehetséges, ha az analizátorban és a detektorban az ionok energiája – a nem kívánt ütközések miatt – nem változik meg. Ennek érdekében a tömegspektrométer e részeiből el kell távolítani a gázmolekulákat. A mo-



7-22. ábra. A tömegspektrométer elvi felépítése



7-23. ábra. A tömegspektrométerben uralkodó nyomásvizonyok

dern tömegspektrométerekben a nagyvákuumot két lépésben állítják elő. Elsőként egy elővákuum-szivattyú 10^{-2} – 10^{-3} mbar vákuumot hoz létre, erre a célra általában rotációs szivattyút alkalmaznak, de használható olajmentes csavarszivattyú is. A 10^{-5} – 10^{-7} mbar nagyvákuumot egy vagy több turbómolekuláris szivattyú biztosítja. A tömegspektrométerben kialakuló tipikus nyomásértékeket a 7-23. ábra szemlélteti. A vákuumrendszer stabilitása és megbízható működése elengedhetetlen a tömegspektrométer megfelelő üzemeléséhez, meghibásodásuk a tömegspektrométer számára végzetes lehet, mivel a nagyvákuumba hirtelen beáramló anyagok (olajgőz, vízpára) súlyosan károsítják a műszert és tartozékait. Ennek elkerülése érdekében a vákuumrendszer gondos karbantartást és folyamatos áramellátást igényel.

MINTABEVITEL

Tömegspektrometriával elméletileg bármilyen halmozállapotú sokkomponensű rendszer vizsgálható, azonban ezt nagyban befolyásolja az alkalmazott mintabeviteli és ionizációs technika. Illékony vegyületeket (pl. gázok, könnyen párologó anyagok) közvetlenül be lehet vezetni a forrásba, ahol az ionizáció megtörténik. Ha a vegyület nem illékony, akkor először fel kell oldani, majd valamilyen alkalmas megoldással gázfázisba kell juttatni, amely előidézhető pl. elektromos erőtér vagy porlasztás és szárítógáz segítségével. Az oldószer helyes megválasztása alapvetően befolyásolja a tömegspektrum minőségét. Általánosságban kerülendő a pufferek és a nem illékony sók alkalmazása.

Egyszerű, néhány komponensű minták, ill. kalibrációs standardok esetében alkalmazhatunk közvetlen adagolást, amelynek során egy automata infúziós pumpa és egy fecskendő segítségével juttatjuk a mintát tartalmazó oldatot az ionforrásba. Komplex biológiai mintáknál szinte minden esetben szükség van a komponensek előzetes elválasztására is, erre alkalmazhatunk többek között gázkromatográfot vagy HPLC-készüléket. A fejlesztések folyamán a folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria összekapcsolása során legnagyobb megoldandó probléma a vákuum stabilitásának megőrzése volt, hiszen az ionforrásba bekerülő mintamolekulák és oldószergőzők rontják a vákuumot. Napjainkban azonban a nagy



7-24. ábra. A MALDI TOF tömegspektrometriánál használatos, a minta töményítésére is alkalmas rozsdamentes acél mintatartó tálca

hatékonyságú vákuum- és zsiliprendszerek használatával, ill. a mikro és a nano áramlási sebességek alkalmazásával ez a probléma kiküszöbölhető.

A lézerdeszorpcióra épülő ionizációs eljárások során a mintát szilárd állapotban viszik be, ennek során a vizsgálandó mintát általában mátrix jelenlétében egy mintatartó tálcára kristályosítják. A mintatartók mérete és kialakítása igen változatos lehet, azonban a legelterjedtebb a 384 férőhelyes well-plate méretű formátum, amely könnyűvé teszi a módszerek automatizálását. A mintatartók anyaga is eltérhet, általában valamilyen kémiai szempontból ellenálló fémből készülnek, így igen elterjedtek a rozsdamentes acél, alumínium- és aranybevonattal ellátott tálcák, de léteznek egyszer használatos műanyag változatok is (7-24. ábra). Néhány klinikai (pl. lézersebészet) és gyógyszergyári alkalmazásnál elterjedőben van a közvetlen deszorpción alapuló ionizáció is, amelynek során a minta, pl. gyógyszer-tabletta, szövetminta közvetlenül érintkezik az ionizációt kiváltó lézerrel.

IONFORRÁSOK

A tömegspektrometriában szükség van a vizsgált részecskék hatékony ionizálására, mivel a részecskék készülékben való mozgatása és szétválasztása az elektromos töltésükre gyakorolt hatáson alapul. A megfelelő érzékenység eléréséhez elengedhetetlen az ionizációs paraméterek optimalizálása. Az ionizációs technika megválasztását főként a vizsgálandó molekula és az azt körülvevő mátrix határozza meg. Mivel univerzálisan alkalmazható ionizációs technika nincs, így a készülékek fejlődésében meghatározó szerepű a különböző ionforrások cseréjének gyorsasága és egyszerűsége. Ennek következtében főként az

atmoszferikus nyomású ionforrások terjedtek el, hiszen azok függetlenek a készülék vákuumrendszerétől, így cseréljük, tisztításuk, karbantartásuk gyorsan és könnyen elvégezhető. A *vákuumionforrások* közül a legjelentősebb a MALDI, ennek karbantartási igénye jóval kisebb a folyadékkromatográfiával kapcsolt változatokénál.

A legrégebbi és igen gyakran alkalmazott eljárás az *elektronionizáció* (EI). Ebben az esetben a minta egy fűtött katódból kilépő elektronnyalábbal találkozik, és az ütközések révén elektronok lépnek ki, így pozitív ionok jönnek létre. Az elektronok ideális gyorsító feszültsége jellemzően 70 volt. A módszer jól alkalmazható a könnyen gázfázisba vihető szerves vegyületek széles körének vizsgálatára kb. 1000 Da molekulatömegig. Előnye, hogy intenzív, stabil, könnyen reprodukálható ionáramot biztosít, és kompatibilis a legtöbb tömeganalizátorral. Hátránya azonban, hogy megfelelő eredményességgel csak a viszonylag illékony, kis molekulatömegű, stabil vegyületek vizsgálatára alkalmazható, a jelentős fragmentáció miatt a tömegspektrum bonyolult, gyakran a molekulaion nem jelentkezik. Az elektronionizáció során alkalmazott magasabb hőmérsékleten egyes anyagok bomlást szenvedhetnek az alkalmazott ionizáló energiától függő mértékben. Ez a jelenség, a forrásban történő bomlás (in source decay, ISD), megfelelően alkalmazva hasznos lehet szerkezetvizsgálatokhoz, mivel további elemzésre felhasználható, anyagi minőségre jellemző töredékionok (fragmensek) képződnek.

Ennek elkerülésére alakultak ki a kéméletes (soft) ionizációs technikák, amelyek kevesebb fragmentumot hoznak létre, így a spektrum egyszerűbb, könnyebben értelmezhető. A lágy ionizációs módszereket három csoportba soroljuk: részecske-ütközeses technikák, párolgáson-porlasztáson alapuló módszerek és lézerdeszorpciós módszerek.

- Részecske ütközésen alapuló technikák:
 - kémiai ionizáció (CI);
 - szekunder ion tömegspektrometria (SIMS);
 - gyors atom- és ionütköztetés (FAB, FIB);
 - plazmadeszorpció (PD).
- Párolgáson-porlasztáson alapuló eljárások:
 - térdeszorpció (FD);
 - térionizáció (FI),
 - termikus porlasztásos (TS) atmoszferikus nyomáson lejátszódó kémiai ionizáció;
 - fotoionizáció (APCI, APPI);

– elektroporlasztásos (ESI, nanoESI, DESI) ionizáció.

- Lézerdeszorpciós (LDI) technikák közül a jelentősebbek:
 - mátrixsegített lézerdeszorpció (MALDI);
 - felületsegített lézerdeszorpciós ionizáció (SELDI).

Kíméletes eljárást jelent a *kémiai ionizáció* (chemical ionization, CI), amelynek lényege, hogy először egy nagy fölöslegben jelen lévő reagens gázt ionizálunk, és az így képződött ionok a minta molekuláival reagálva azokat ionizálják. Ezt a jelenséget, amikor az ionizáció ion–molekula kölcsönhatás eredményeként jön létre, 1913-ban J. J. THOMSON figyelte meg hidrogéngázban. A leggyakoribb reagensgázok: metán, izobután, ammónia, klór, dinitrogén-oxid. Minthogy a kölcsönhatások valószínűsége arányos a nyomással, ezeket az ionforrásokat általában légköri nyomáson működtetik. Ennek a módszernek az előnye a kéméletes ionizáció, így kevesebb fragmens ion képződik, valamint általában megjelenik a spektrumban a pozitív vagy negatív molekulaion. Pozitív ionizáció esetén gyakori a $[M+H]^+$ protonált kvázi-molekulaion megjelenése is.

A *szekunder ion tömegspektrometria* (SIMS) esetében a sík – általában fém – felületen elhelyezett mintát részecske- vagy ionnyalábbal bombázzuk, és a mintából kibocsátott szekunder ionokat analizáljuk. Ide tartozik a plazmadeszorpció és a folyadék szekunder ion tömegspektrometria (LSIMS).

A *plazmadeszorpció* (PD) elve, hogy a vizsgálandó mintát vékony filmrétegre viszik fel, és e mögé, a mintával ellentétes oldalra, helyezik el az erősen α -sugárzó ^{252}Cf radioaktív izotópot. Az izotópból kilépő nagy energiájú hasadási termékek a mintán való áthaladásakor helyi felmelegedést okoznak és mikroplazmát hoznak létre; így energiát adnak át a minta molekuláinak, amelyek ionizálódnak és deszorbeálódnak. A PDMS volt az első módszer, amelynek segítségével nagy molekulatömegű fehérjék, ill. összetett antibiotikumok vizsgálhatók voltak.

A *folyadék szekunderion tömegspektrometria* (LSIMS) technika napjainkban is használatos elsősorban a hőre érzékeny vagy nem illékony kis és közepes molekulatömeggel rendelkező anyagok esetében.

Két alapvető módszert különíthetünk el:

- A *gyors atombombázás* (fast atom bombardment, FAB) során egy atomágyúból gyors

argon- vagy xenonnalábot bocsátanak a mintára, amely viszkózus, kevésbé illékony folyadékokban, többnyire glicerinben van oldva.

- A gyors ionbombázás (fast ion bombardment, FIB) esetében céziumionokat (Cs^+) alkalmaznak. A részecskék a folyadékfelszínbe ütközve energiát adnak át a felszínnek, amely eloszlik a felületi réteg mintamátrix molekulái között, azok ionizációját eredményezve. A képződő minta- és mátrixionok kiszakadnak a felszínről, és az így létrejött szekunder ionokat analizáljuk. A folyadékfilm felületi rétege diffúziós folyamatok révén állandóan pótlódik, frissül, ennek köszönhetően az analizált felület folyamatosan regenerálódik.

A FAB hőérzékeny, poláros, 300–6000 Da tömegű molekulák vizsgálatára alkalmas, a FIB pedig elsősorban nagyobb részecsketömegek esetén (akár 30 000 Da). A módszer szerkezeti információkat is nyújt, mivel jellegzetes fragmensionok is képződnek. Napjainkban is folyamatos a módszer fejlesztése, többek között nagyon ígéretes eredményeket értek el fullerénionok (C_{60}^+) ionizáló részecskéként való alkalmazásával.

A térdeszorpció és a térionizáció a deszorpciós módszerek közé tartozó rokon ionizációs technikák, amelyeknek főként történelmi jelentősége van. Mindkét esetben a minta ionizációját erős elektromos tér váltja ki, a módszerek tulajdonképpen csak a mintabeviteli módban különböznek egymástól. A vizsgált részecskék szerkezetéről ugyan kevés információt szolgáltatnak, azonban tömegpontosságuk jó.

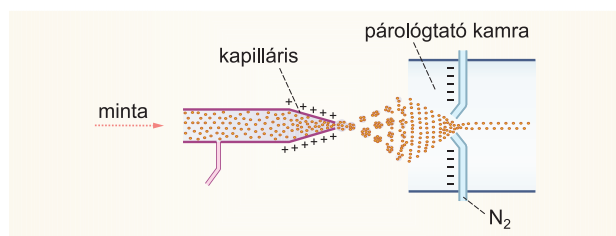
A porlasztáson alapuló ionizációs eljárások különösképpen a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrométerek esetében számítnak nélkülözhetetlen megoldásnak. A módszer elvét már a hatvanas években kidolgozták, de a megvalósítás a nyolcvanas évekig váratott magára. A termikus porlasztás jelentette az első igazi előrelépést a hőre érzékeny, nem illékony anyagok MS-, ill. LC-MS-vizsgálatának területén. Elve, hogy a folyadékkromatográfiás oszlopon szétválasztott komponenseket és a mozgófázist nagy nyomással egy elektromosan melegített (100–200 °C) fémkapillárisba juttatják, amelynek vége a tömegspektrométer ionforrásában van, így a minta és az oldószergőzők nagy sebességű ionizált spray formájában kerülnek be a tömegspektrométerbe. Ebben az

esetben az ionizációt az oldószer (mozgófázis) illékony elektrolitjai valósítják meg.

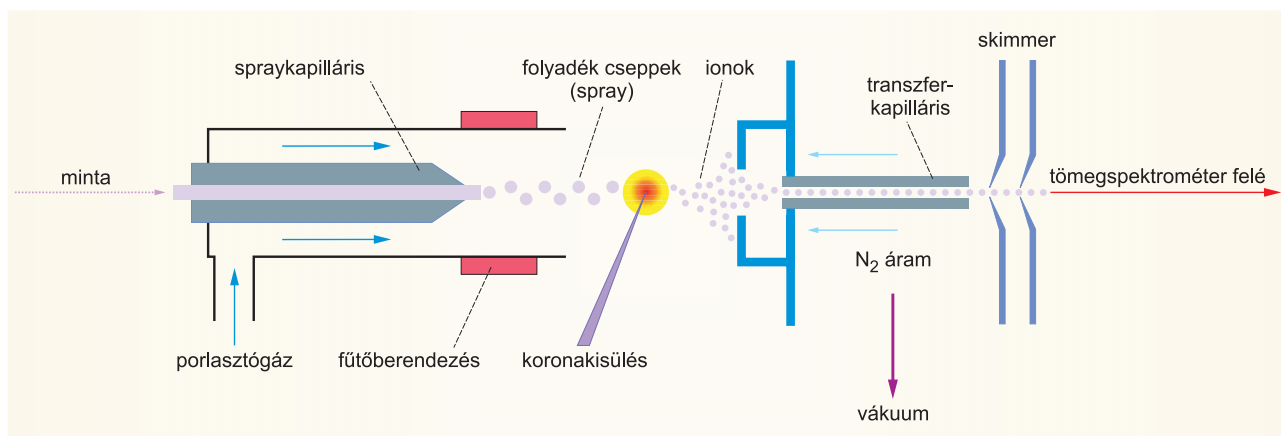
A leggyakrabban alkalmazott porlasztásos ionizációs forma az elektropray (ESI, *nanoESI*), amelynek során a kromatográfról lejövő minta egy fém vagy fémbefonatú szilika kapillárison halad keresztül, amelyre 2–5 kV feszültséget kapcsolnak. A kapilláristól és a tőle 1–2 cm-re, nanoESI esetén néhány mm-re elhelyezett, ellentétes töltésű elektród között erős elektrosztatikus tér képződik, ennek hatására a kapillárisból kilépő folyadék kúpszerűen kicsúcsosodik (Taylor-kúp), és róla töltéssel rendelkező folyadék-cseppek szakadnak le.

A technika továbbfejlesztése nagyobb áramlási sebességek (100–300 $\mu\text{L}/\text{perc}$) mellett is jól alkalmazható. Itt a kapilláris körül elhelyezkedő külső csőben vezetett inert porlasztógázzal (többnyire nitrogénnel) pneumatikusan hozzuk létre a töltött aeroszolt a folyadékmintából. A folyadék-cseppekből az oldószer párolgását további nagy mennyiségű, fűtött (200–300 °C) nitrogénárammal segítjük elő. A párolgás során a cseppecskék térfogata csökken, így a felületi töltéssűrűség egyre nagyobb lesz, ami végül a cseppek felbomlását (Coulomb-robbanás) okozza. A folyamat végén a mintából származó kompakt, többszörösen töltött ionokat kapunk (7-25. ábra). Az ESI elsősorban a nem illékony, poláros, bázikus csoportot hordozó molekulák vizsgálatához ideális.

A porlasztásos és a kémiai ionizációs eljárások kombinációja a légköri nyomású kémiai ionizáció (atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Az aeroszol képződését és elpárologtatását az ESI-nél ismertetett módon idézik elő, de itt nem a kapilláris, hanem a mintaárammal szemben elhelyezkedő elektród áll nagyfeszültség alatt (koronafeszültség). E körül a koronakisülések hatására az elpárologtató víz- és egyéb oldószer-molekulák ionizálódnak, és protonálják az itt áthaladó mintát is (7-26. ábra). A módszer



7-25. ábra. Az elektropray-ionforrás (ESI) vázlatos működési elve



7-26. ábra. Atmoszférikus nyomású kémiai ionforrás (APCI) vázlatos felépítése

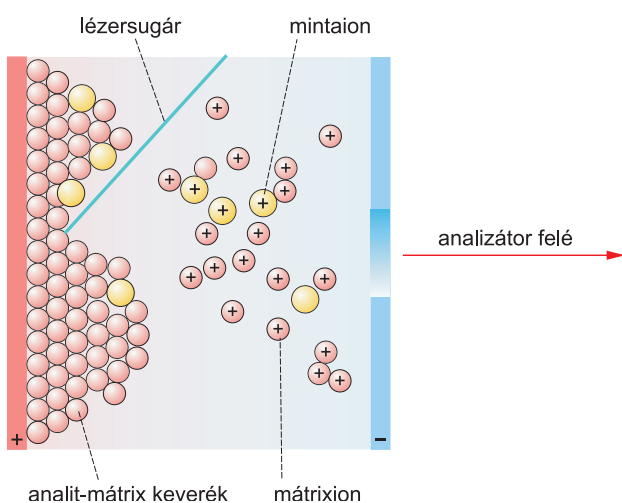
nagy előnye, hogy lényegében bármilyen oldószer és puffér mellett használható.

A lézerdeszorpciós ionizáció (LDI) lényege a mintamolekulák lézersugárral való elpárologtatása és ionizációja, azonban ilyenkor gyakran keletkeznek rövid élettartalmú fragmentumok. E problémák megoldását a nyolcvanas évek végén kifejlesztett *mátrix-szolgáltató lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI)* jelentette. Ilyenkor a mintamolekulákhoz kis molekulatömegű, szerves ún. mátrixanyagot keverünk, amely elnyeli és közvetíti a lézer energiáját a vizsgálandó anyagnak, ill. ionizálja azt, miközben meggátolja a keletkezett ionok fragmentációját. A módszer egyik legkényesebb pontja az adott vizsgálatához optimális mátrix kiválasztása, általában mustársavat (SA), α -ciano-4-hidroxifahéjsavat (HCCA, CHCA), 2,5-dihidroxiben-

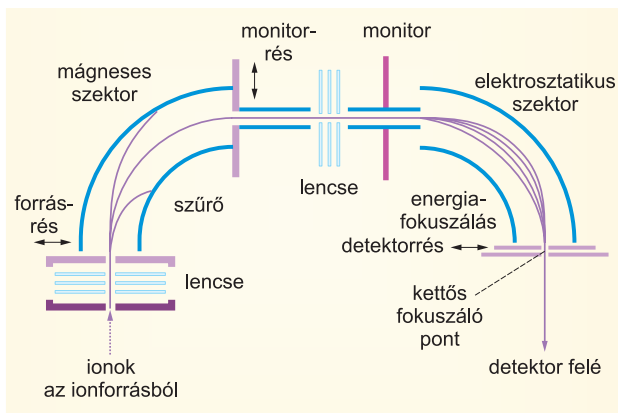
zoesavat (DHB) alkalmazunk. A minta-előkészítés során a mátrix és a mintaoldat keverékét (0,2–2 μ l) a mintatartóra szárítjuk úgy, hogy lehetőleg homogén mikrokristályos szilárd elegyet kapjunk. A gyors lézerimpulzusok (50–100 Hz) ebből a szilárd felületből párologtatnak el anyagot, és ez az ionizált részecskefelhő kerül az analizátorba (7-27. ábra). A MALDI segítségével igen kíméletesen, de hatékonyan ionizálhatóak még nagy tömegű, bomlékony molekulák is (fehérjék, szénhidrátok, oligonukleotidok, polimerek), így igen elterjedt módszer a biológiai, orvosbiológiai kutatásokban. További előnye az óriási mintaáteresztő képessége, amely napi több ezer minta automatizált vizsgálatát is jelentheti.

ANALIZÁTOR

Az analizátorban zajlik a képződött ionok szétválasztása a tömegük és a töltésük hányadosa (m/z) szerint. Minél kisebb az ion tömege, ill. minél nagyobb a töltése, annál nagyobb sebességre képes szert tenni egy adott elektromágneses erőter hatására. Lényegében ezt használják ki az ionok transzportján alapuló módszerek. Az újabb, modernebb készülékek inkább az ionok szelektív tárolása révén választják szét a részecskéket. Az analizátor jellemző paraméterei a maximális vizsgálható m/z érték, az áteresztőképesség (a detektált és a képződött ionok számának hányadosa), ill. egy adott tömegre jellemző maximális felbontóképesség (molekulatömeg/cúscsszélesség). A Fourier-transzformációs tömegspektrométerek esetében az utóbbi érték elérheti akár az egymilliót is.



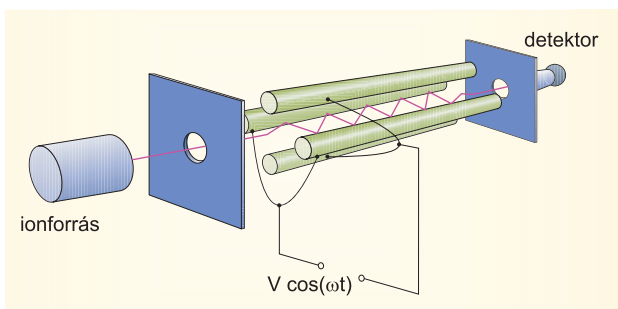
7-27. ábra. A mátrix segítette lézerdeszorpciós ionizáció elve



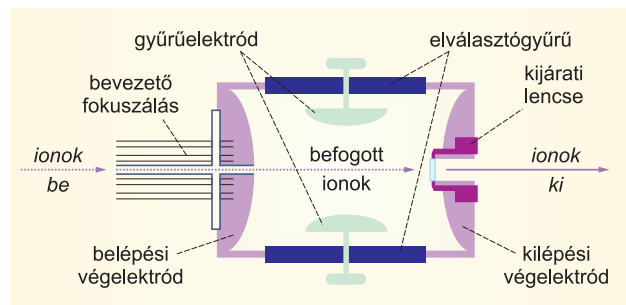
7-28. ábra. Kettős fókuszálású szektoros analizátor elvi felépítése

A legrégebbi típusok a *szektoros analizátorok*, ahol az ionok a haladásukra merőleges mágneses térbe jutnak. Itt az elektromágneses impulzusuk és a töltésük szerint különböző sugarú körpályákra térülnek. A mágneses térerősség értékét változtatva más és más ionok juttathatók a detektorra. Az ionnyalábot ezt követően egy elektrosztatikus analizátorban sebesség szerint fókuszálják, ahol az ionok a haladásukra merőleges elektromos térerősség mellett a kinetikus energiájuknak megfelelő körpályát követnek (7-28. ábra). A szektoros készülékeket nagy felbontás, nagy érzékenység és széles mérési tartomány jellemzi. Hátrányuk, hogy drágák, lassúak, nagy a technikai háttérigényük, napjainkban az izotóparány-méréseknél van gyakorlati jelentőségük.

Az egyik legelterjedtebb analizátortípus az ún. *kvadrupól* (quadrupol, Q). Itt az ionok négy párhuzamos hengeres rúd között haladnak, amelyekre egyenáramot és nagyfrekvenciás váltóáramot kapcsolnak. A szemben lévő rudak azonos, a szomszédosak ellentétes polaritásúak, így közöttük oszcilláló



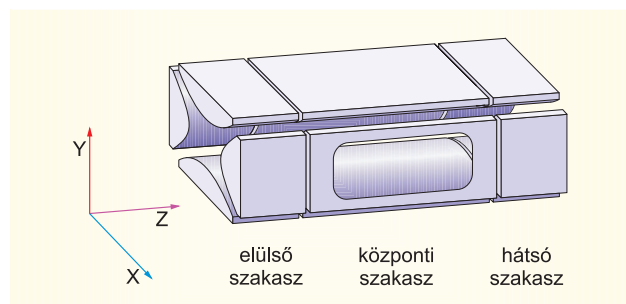
7-29. ábra. A kvadrupól-analizátor felépítése és működési elve



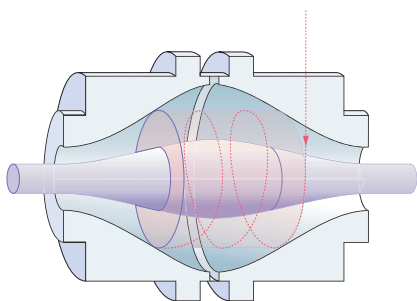
7-30. ábra. A 3D ioncsapda analizátor felépítése

elektromágneses tér alakul ki. A kvadrupólba bejutó különböző m/z értékkel rendelkező ionok különböző amplitúdójú kitéréseket végezve haladnak, azonban a rudak közti ideális pályát csak meghatározott m/z értékű ionok képesek tartani, a többi ion vagy elveszti a kinetikus energiáját, vagy a rudakba csapódik (7-29. ábra). A rudakra kapcsolt váltóáram frekvenciáját változtatva a kvadrupól mindig más-más m/z értékkel rendelkező ionokat enged a detektorba, így a teljes tömegtartomány végigpásztázható. A kvadrupól készülékek viszonylag egyszerűbben működtethetők, gyorsak, mennyiségi vizsgálatokra kiválóan használhatók, mivel lineáris tartományuk 5-6 nagyságrend, valamint jól kombinálhatók különféle ionforrásokkal és analizátorokkal. Hátrányuk, hogy tömegpontosságuk és felbontóképességük viszonylag alacsony.

Hasonló elven működik az *ioncsapda* (iontrap, IT), amelynél egy gyűrű alakú és két másik elektród között jön létre az oszcilláló háromdimenziós elektromágneses tér. A bejutott ionok ebben az erőterben haladnak egy körpályára kényszerítve, miközben a körre merőleges irányban rezgéseket végeznek (7-30. ábra). Lényeges újítás, hogy itt az ionok szétválasztására nem térben, hanem időben kerül sor; ha nö-



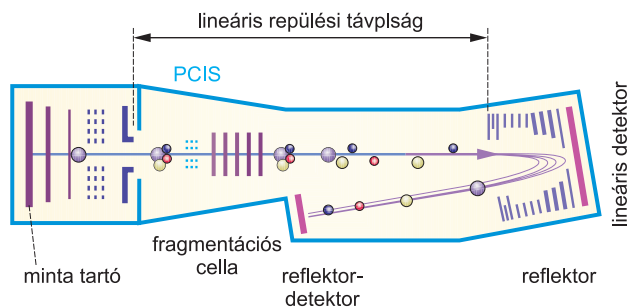
7-31. ábra. A lineáris (2D) ioncsapda analizátor felépítése



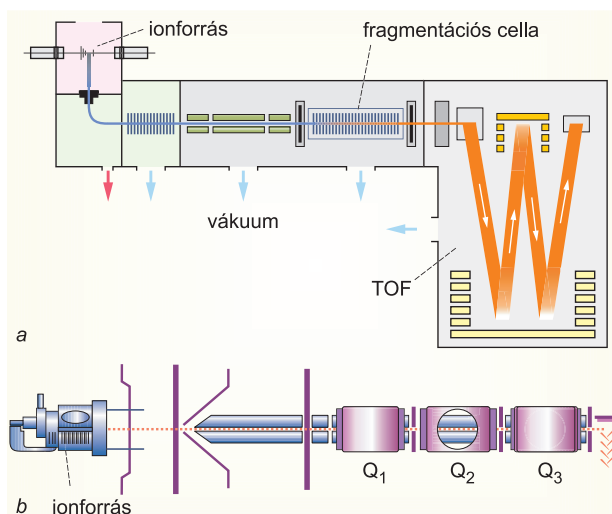
7-32. ábra. Az orbitrap analízátor vázlatos felépítése

veljük a váltóáram amplitúdóját, akkor az ionok rezgőmozgása egyre fokozottabb lesz, és növekvő m/z sorrendben távoznak a kilépési elektród nyílásán a detektor felé (ún. tömegszelektív instabilitási üzemmód). Az ioncsapda előnye a nagyobb érzékenység és felbontóképesség, a gyorsabb működés, a szélesebb mérési tömegtartomány és a többszörös fragmentáció (MS^n) lehetősége. Hátránya a mennyiségi mérések korlátozott lehetősége (lineáris tartomány kb. 4 nagyságrend). Az ioncsapdás készülékek sikerét reprezentálja, hogy számos típusuk érhető el, így vannak lineáris (2D, LTQ) és 3D ioncsapdák, ill. (7-31. ábra) ún. orbitrap analízátoros (7-32. ábra) készülékek. Ez utóbbiakra jellemző a rendkívüli tömegpontosság és felbontóképesség.

Az elektrotechnika fejlődésével lehetővé vált igen kicsiny időkülönbségek pontos észlelése, ami a repülési időn (time-of-flight, TOF) alapuló elválasztás alapját képezi. A megoldás lényege, hogy az elektromosan térmentes repülési csőbe azonos időpillanatban, azonos kinetikai energiával rendelkező ionok kis csomagjai érkeznek, és a detektort az m/z arányos repülési idő után érik el (7-33. ábra). Különböző kiegészítő korrekciós eszközök (pl. reflektoron, iontükör) révén a



7-33. ábra. A repülési idő analízátor felépítése és működési elve



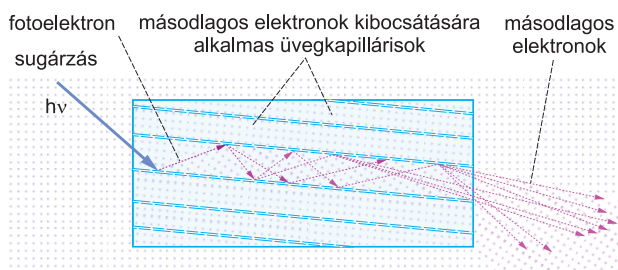
7-34. ábra. Példák hibrid felépítésű tömegspektrométerekre
a) Q-TOF analízátoros készülék, B)
b) Q-Trap analízátorral ellátott MS

TOF készülékekkel ma már igen jó felbontóképesség, széles mérési tartomány érhető el, ill. alkalmazásukkal megvalósítható többféle fragmentációs lehetőség is. Megfelelő ionforrással (MALDI) kombinálva a nagyobb biomolekulák vizsgálatában nélkülözhetetlenek. A MALDI-hoz ideális a repülési idő analízátor, mivel általa kihasználható a több száz daltonos felső tömeghatár, valamint nagy felbontás és érzékenység érhető el.

A felsorolt analízátortípusok bármilyen kombinációja is elképzelhető az ún. hibrid készülékekben, amelyek két vagy több analízátor összekapcsolásából jönnek létre. Leggyakrabban ezeket a hibrid készülékeket alkalmazzák a rutin vizsgálatok során, amelyek közül a legelterjedtebb kombináció a Q-TOF, a hármas kvadrupól (QqQ), az LTQ-orbitrap, a Q-IT, az IT-TOF megoldás (7-34. ábra).

DETEKTOR

A tömegspektrométerben haladó ionok csoportja lényegében a forrástól a detektorig tartó elektromos áramot jelent. A készülékek detektorai a hozzájuk érkező rendkívül kis ionáramot (10^{-10} – 10^{-15} A) érzékelik, és értékével arányos analóg elektromos jelet képeznek. A pontdetektorok az időben szétválasztott, a sordetektorok pedig a térben elkülönített ionok érzékeléséhez használatosak. Alapvető követelmény, hogy



7-35. ábra. Mikrocsatornás detektor vázlatos működési elve

a detektorok képesek legyenek követni az ionáramok igen gyors változásait, tehát „memóriaeffektusuk” kicsi legyen. A legerterjedtebben alkalmazott típus a *mikrocsatornás detektor* (7-35. ábra). A kapott kis jeleket többnyire elektron- vagy ftonsokszorozókkal felerősítik, majd számítógépes feldolgozás céljára digitalizálják.

Fragmentálás és tandem tömegspektrometria

Ha viszonylag kis energiával ionizáljuk a vizsgálandó anyagunkat, akkor a molekulák egészben maradnak, és a tömegükre és töltésükre jellemző ún. molekula-csúcsot $[M^+, M^-]$ kapunk. Többnyire azonban jóval nagyobb mennyiségű információ nyerhető, ill. speciális problémákra (pl. több anyag elkülönítése, szekvenálás) jobb megoldást jelent, ha a részecskéket kinetikus energia hozzáadásával pontosan szabályzott módon szétördeljük, fragmentáljuk. Ez a folyamat végbemehet az ionizációs folyamat során, ill. röviddel utána (in source és post source decay, ISD, PSD), vagy az analizátorban egy inert gázzal való ütközés révén (collision induced dissociation, CID; és electron transfer dissociation, ETD). A keletkező fragmentumok kémiai felépítése és aránya az anyaion anyagi minőségétől és az alkalmazott energiától függ, és így további tömegspektrometriás vizsgálatra felhasználhatók. Természetesen ilyenkor csak azok a fragmentumok, más szóval leányionok jönnek szóba, amelyek az eredeti töltést tovább hordozzák.

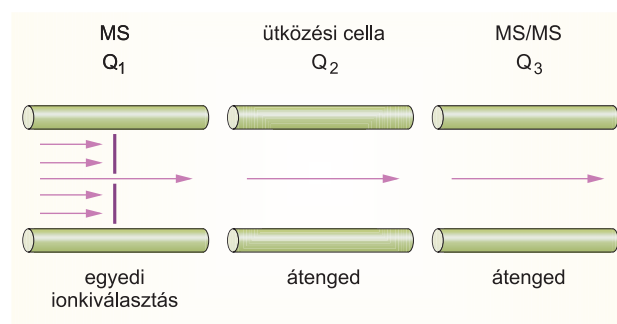
Ezt a jelenséget használják ki a tandem tömegspektrometria – jelölése: MS/MS vagy MS^n – esetében, amikor két egymás után kapcsolt analizátor közé egy jellemzően argon, hélium vagy nitrogén gázzal

működtetett ütközési cellát (collision cell) iktatnak. Itt lehetőség van az első analizátorban szétválasztott ionok egyenkénti fragmentálására, és a leányionok szelektív vizsgálatára. Tipikus megoldás a QQQ elrendezés, ahol két kvadrupól analizátor közé kerül a cella. Az ioncsapda esetén kissé más a helyzet: itt a fragmentációt megelőző és követő folyamatok nem térben, hanem időben válnak szét egymástól egyetlen analizátorban. Fontos tudni, hogy a rutinszerűen használt készüléktípusokban a fragmentáció az ionintenzitás 1-2 nagyságrenddel való csökkenését okozza, így tényleges gyakorlati haszna az MS/MS és MS^3 méréseknek van.

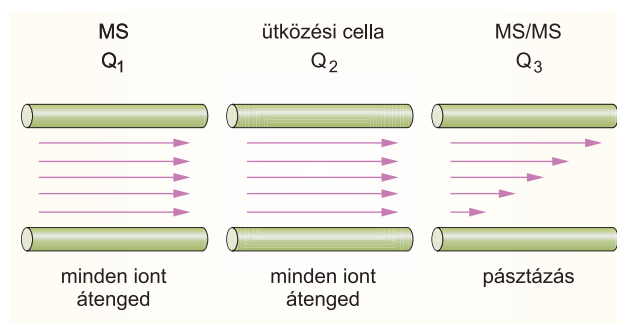
Mérési üzemmódok tandem tömegspektrométerrel:

Egyedi ion vizsgálat (single ion recording). Az egyik analizátor egy bizonyos m/z értéknél enged át, a másik nem aktív (7-36. ábra).

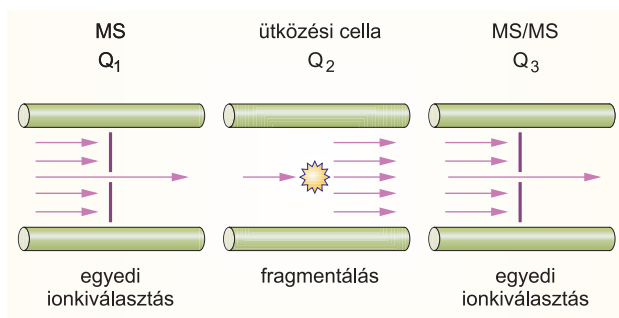
Pásztázás (scan). Az egyik analizátor egy bizonyos m/z tartományt pásztáz, a másik nem aktív (7-37. ábra).



7-36. ábra. Az egyedi ionkiválasztás sematikus működése



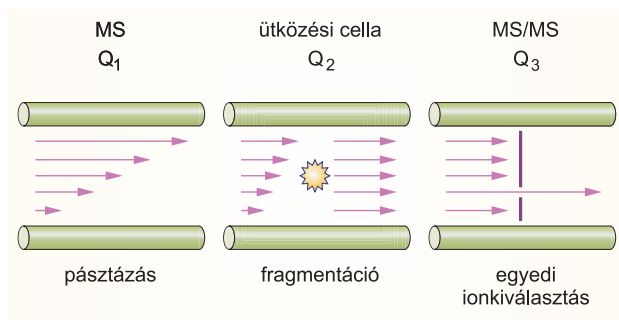
7-37. ábra. A teljes pásztázás elvi működése



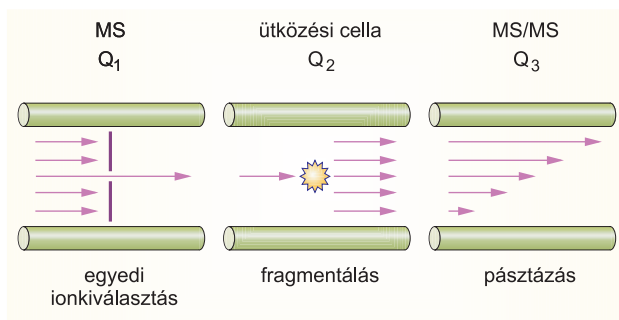
7-38. ábra. A többszörös reakció megfigyelés elve

Többszörös reakció megfigyelés (multiple reaction monitoring). Mindkét analizátor egy-egy bizonyos m/z értéknél enged át; általában egy iont és valamely fragmentumát. Több, független fragmentációs átmenet vizsgálható így (7-38. ábra).

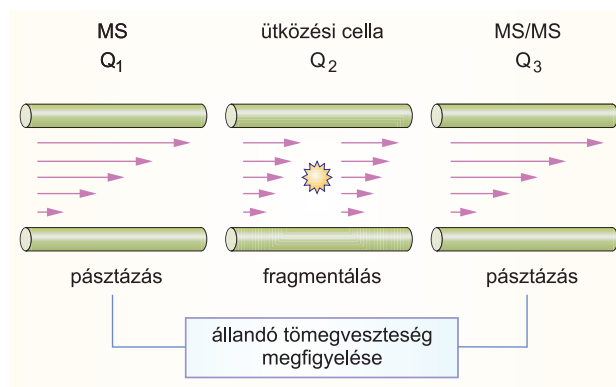
Anyaiion-pásztázás (parent ion scan). Az első analizátor egy tartományt pásztáz, a második pedig egy bizonyos m/z értéknél enged át. Azokat az ionokat vizsgálhatjuk, amelyek egy bizonyos méretű töltött fragmentumot adnak (7-39. ábra).



7-39. ábra. Prekurzor ion pásztázás



7-40. ábra. A fragmens ion pásztázás elvi működése



7-41. ábra. A semleges veszteses pásztázás elve

Leányion-pásztázás (daughter ion scan). Az első analizátor egy bizonyos m/z értéknél enged át, a második pedig egy tartományt pásztáz. Megvizsgálhatjuk, hogy egy bizonyos méretű ion milyen fragmentumokra esik szét (7-40. ábra).

Állandó semleges vesztes (constant neutral loss). Mindkét analizátor pásztázó módban működik, de a második egy állandó m/z értékkel lejjebb. Azok az ionok vizsgálhatók, amelyek egy bizonyos méretű semleges fragmentumot képeznek (7-41. ábra).

A tömegspektrum

A tömegspektrum a tömeg/töltés (m/z) arány és az ionintenzitás függvényeszerű ábrázolása. A legmagasabb csúcs a báziscsúcs, ehhez viszonyítjuk az összes többi komponens. Az abszolút ionmennyiség arányos a mintában jelen lévő anyagmennyiséggel, a fragmentumok relatív ionintenzitásai pedig a molekulatípusra és az alkalmazott mérési eljárásra jellemzőek.

A készülékre, így a kapott tömegspektrumra is jellemző a felbontóképesség, amely azt a $R = m/\Delta m$ értéket jelenti, ahol m a tömegszám, melytől egy szomszédos csúcsot még éppen el tudunk különíteni. Ehhez meg kell adni, hogy a két csúcs közös átfedő szakasza legfeljebb milyen relatív magasságú lehet, Δm a két csúcs tömegének különbsége (ill. helyesebb m/z és $\Delta[m/z]$ értékekről beszélni). A felbontóképesség a nagyobb tömegek felé haladva általában csökken, tipikusan 15 000–100 000 értékű.

A tömegspektrometria főbb alkalmazási területei

Minél többet tudunk a gének szerepéről, annál világosabbá válik a fehérjék és azok módosításainak szerepe a patológiás folyamatokban. A proteomika összetett fehérjekeverékek, valamint azok enzimátikus emésztményeinek egyidejű vizsgálatát jelenti. A *proteomkutatás* módszertana egyszerű: az egészséges és a beteg rendszer fehérjekészletét összehasonlítva olyan markereket fedezhetünk fel, amelyek egyértelmű diagnózis felállítását teszik lehetővé. Tehát az adott pillanatban minőségi és lehetőleg mennyiségi vizsgálatot kell végezni az adott fiziológias állapotú sejt teljes fehérjeállományáról, és azt össze kell vetni a kísérletesen manipulált vagy beteg sejt proteomjával. A különbséget okozó fehérjék vagy fehérjetörödékek mennyiségi és minőségi analízise, pontos szekvenciájának és kovalens módosításainak meghatározása diagnosztikai célokat szolgálhat. A MALDI TOF tömegspektrometria által biztosított széles tömegtartomány miatt célszerűen két detektort alkalmazunk. A kis tömegű ionokat a nagyobb úthosszat biztosító reflektoron detektorban, míg a nagyobb tömegűeket lineáris módban mérjük. A kimutatási határ rutinszerűen femtomol nagyságrendű. A készülékkel megvalósítható tandem tömegspektrometria (TOF/TOF) is, amelynek során az ionforrásból kilépő részecskéket két módon fragmentálhatjuk: közvetlenül az ionforrás után (PSD) vagy argongáz segítségével egy erre a célra kialakított ütközési cellában (CID, ETD).

A valóságban a megoldás azért bonyolult, mert több tízezer fehérje vagy peptid egyszerre végzendő analíziséről van szó. Ma a legelterjedtebb módszer az, hogy valamilyen elválasztástechnikai módszerrel a több tízezer fehérje, peptid közül kiválasztják azt a nagyobb csoportot (*szubproteomot*), amelyben az összehasonlítani kívánt peptidok, fehérjék megtalálhatók. Erre a célra a gélelektroforézis vagy a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia a legalkalmasabb, ezt követően a frakciókat tisztítjuk és enzimátikusan emésztjük. Az így kapott peptidkeverékhez meghatározott arányban mátrixoldatot keverünk és az elegyet mintatartó tálcára szárítjuk. A mátrix kiválasztásánál a molekula típusát, polaritását, valamint molekulatömegét is figyelembe kell venni. Ennek megfelelően a fehérjemésztmények (molekulatömeg < 5 kDa) elemzéséhez ideális mátrix az α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (HCCA,

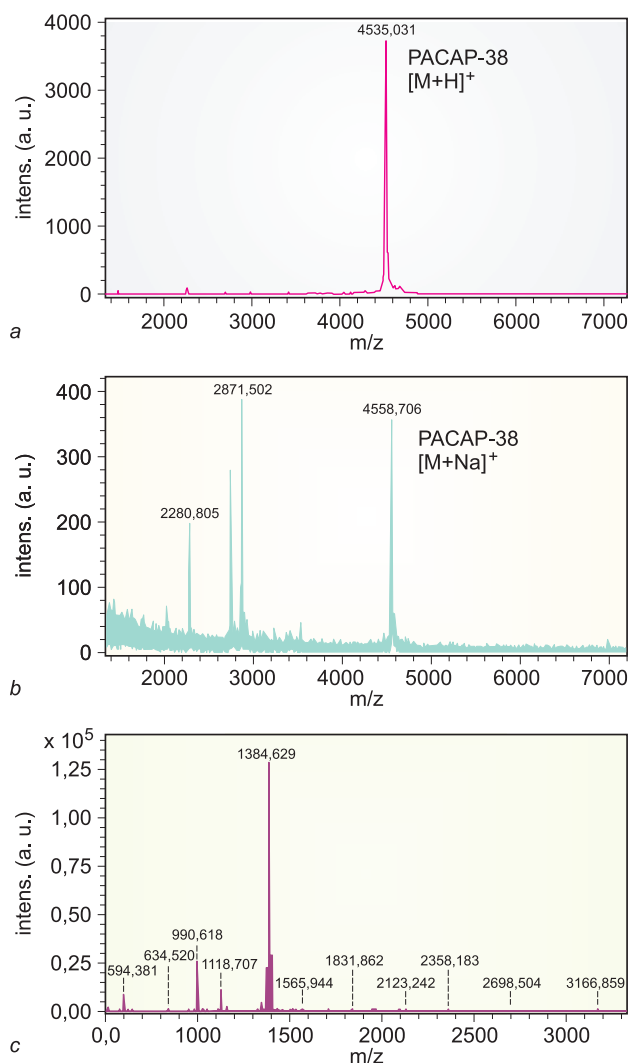
CHCA). A vizsgálat során rögzítjük a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumot, majd az értékelés során megfelelő matematikai átalakítások után az eredményeket elküldjük egy fehérjeszekvenciákat tartalmazó adatbázisba (Mascot, SwissProt, NCBIInr). A keresés eredményeként megkaphatjuk az adott tömegspektrum által meghatározott fehérjét vagy fehérjéket. Ezt a meghatározási módszert *Peptide Mass Fingerprinting-nek* (PMF) nevezzük. A gyulladásos betegségek laboratóriumi diagnosztikájában alapvető jelentősége van a sejtben belüli jelátviteli utak monitorozásának. A patológiás folyamatok detektálásának leggyorsabb módja a jelátviteli utak fontosabb enzimeji, fehérjei kovalens módosításának meghatározása, amely többek között jelenthet foszforilációt, farnezilációt, lizin oldalláncok acetilezését és fehérjék ADP-riboszilezését is. A MALDI TOF tömegspektrometria felhasználásával azonosítjuk a különböző fehérjemódosításokat, valamint azokat a fehérjéket, amelyek szerepe jelentős a folyamatok patomechanizmusában, ill., amelyek diagnosztikai értékűek lehetnek. A meghatározás során a PMF-hez hasonlóan rögzítjük az elsődleges tömegspektrumot, majd ezt követően a nagyobb intenzitású vagy diagnosztikailag jelentős peptidokat PSD vagy CID fragmentációval tovább bontjuk. Így meghatározható a peptidok pontos elsődleges szerkezete és annak módosulása, valamint megismerhetővé válik eddig még nem ismert peptidok és proteinek felépítése (*De Novo Sequencing*).

Napjaink egyik legizgalmasabb fejlesztése a MALDI TOF tömegspektrometria *képalkotó módszerként* való alkalmazása (MALDI Imaging) (7-42. ábra). Ennek során egy speciális mintatartóra 10–20 μm -es szövettani metszetet és mátrixot szárítunk. Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több ezer tömegspektrumot veszünk fel, amelyeket a megfelelő szoftverfeldolgozó: az egyes m/z értékekhez tartozó intenzitások eloszlását képként jeleníti meg. A mycobacteriumok sejtmembránjában nagy mennyiségben jelen lévő mikolsavak jelenléte igen jól vizsgálható MALDI TOF tömegspektrometriával. A módszer érzékenységét jellemzi, hogy még több száz éves *Mycobacterium tuberculosis*-sal fertőzött csontminták esetében is eredményesen alkalmazható.

A gyógyszergyárak számára rendkívüli jelentőségű a felhasznált vegyületek lehetséges bomlástermékeinek ismerete. A MALDI TOF tömegspektrometria segítségével a *gyógyszerhatóanyagok stabilitásvizsgá-*

lata is elvégezhető. Ilyenkor a minták azonos mennyiségeit speciálisan előkészített mintatartó tálcára cseppentjük, majd analizáljuk. A vizsgálatok után a hatóanyagokat tartalmazó tálcákat akár $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolhatjuk, és a későbbiek folyamán mérhetjük a molekulák szerkezetében bekövetkező változásokat.

A tömegspektrometria alkalmazása az orvosi laboratóriumi diagnosztikában már eddig is számos, a medicina számára nagy fontosságú anyag vizsgálatát tette lehetővé vagy éppen egyszerűbbé, pontosabbá.



7-42. ábra. A hypophysis adenilát-cikláz-aktiváló polipeptidjének (PACAP-38) MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálata

- A PACAP-38 protonált kvázimolekula ionja lineáris detektálási módban
- A PACAP-38 nátriummal képzett kvázimolekula ionja lineáris detektálási módban
- A PACAP-38 triptikus peptidjeinek azonosítása reflektoron módban

Az elemzés alá vont molekulák köre folyamatosan bővül, gyakran egész betegcsoportokat lefedő tematikus panelekbe rendeződik. Nem elhanyagolható körülmény, hogy a tömegspektrometriás eljárások sok esetben gazdaságilag is a legkedvezőbb megoldást kínálják más, hagyományosabb technikákkal összehasonlítva. Természetesen arról sem szabad megfeledkezni, hogy az alapberuházás és a szervizelés költségei igen nagyok. Az MS, különösképpen megfelelő kromatográfiás elválasztással és tandem mérési módozattal kombinálva jelenleg az egyik leghatékonyabb technológia a szerves molekulák vizsgálata terén. Óriási előnye, hogy egyetlen rövid méréssel, amelyet gyakran csak egyszerű minta-előkészítés előz meg, nagyszámú vegyület elemzésére van lehetőség, továbbá ez a repertoár viszonylag könnyen és olcsón bővíthető. A jövőben várhatóan egyre több módszer fog átvándorolni az MS alkalmazások területére.

A tömegspektrometria tudománya folyamatosan és nagy ütemben fejlődik. A tandem triple quadrupol készülékeknél egy-egy újabb generáció mindig jó egy nagyságrenddel nagyobb érzékenységgel az előzőnél. A korábban költségesnek számító típusok, mint pl. a TOF-készülékek, egyre inkább elérhetők lesznek a klinikai laboratóriumok számára. Az állandó technikai újítások egyre bővítik az analitikai lehetőségek körét, fokozva az alkalmazások és az új igények gyarapodását. A MALDI és a SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) TOF módszerek napjainkban bekövetkező intenzív fejlődését óriási mintafeldolgozó képességüknek, valamint egyszerű kezelhetőségüknek köszönhetjük. Ennek megfelelően az elkövetkező néhány évben globálisan is a nagy áteresztőképességű analitika nélkülözhetetlen eszközeivé válnak.

IRODALOM

- GROSS, J.: Mass Spectrometry: A Textbook. Springer, Heidelberg, 2004.
- LIPTON, M. S., PASA-TOLIC, L.: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. Humana Press, New York, 2009.
- TALIÁN Cs. G., MÁRK L., MELEGH B.: Tömegspektrometria. In: Debreczeni L., Kovács L.G. (szerk.): Gyakorlati Laboratóriumi Medicina. 477–492. old. Literatura Medicina Kiadó, Budapest, 2008.
- VÉKEY, K., TELEKES, A., VÉRTES, A. (eds): Medical Applications of Mass Spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2008.

