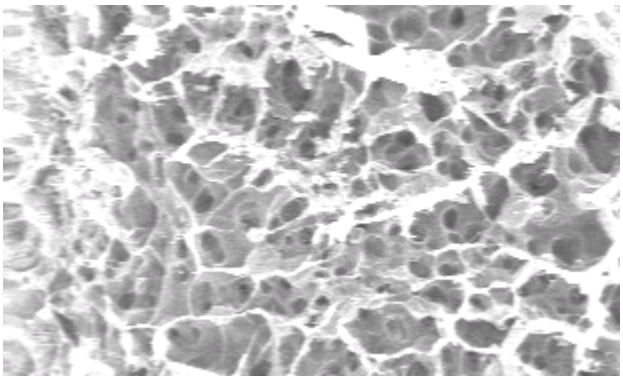
Akrilamid-alapú elválasztási töltetek

Készítette:

Rezeli Melinda

Témavezetők:

Prof. Kilár Ferenc
Prof. Stellan Hjertén



Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Kémia Doktori Iskola

2008

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés ... 3
2 Irodalmi áttekintés ... 4
2.1 Elektroforézis ... 4
2.1.1 A gél elektroforézis története ... 4
2.1.2 Az elektroforézis elméleti alapjai ... 6
2.1.3 Mintakoncentrálás – Az elektroforézis gyakorlati aspektusa ... 9
2.2 Molekuláris lenyomatkészítés – a szelektív polimerek ... 10
2.2.1 Kismolekulák felismerésére alkalmas polimerek ... 11
2.2.2 Fehérjék felismerésére alkalmas polimerek ... 12
2.3 Monolitok ... 16
2.4 Biokatalízis - Enzimreaktorok ... 20
3 Célkitűzések ... 22
4 Anyagok és módszerek ... 23
4.1 Poliakrilamid gélek elektroforézishez ... 23
4.1.1 Poliakrilamid gélek szintézise ... 23
4.1.2 Gél elektroforézis üvegcsőben ... 23
4.2 Akrilamid-alapú polimerek fehérjék szelektív felismerésére ... 24
4.2.1 Szelektív polimerek szintézise ... 24
4.2.2 Templát fehérjék eltávolítása a polimerből ... 24
4.2.3 Szelektív polimerek működésének ellenőrzése ... 25
5 Eredmények ... 28
5.1 Mintakoncentrálás protonálható csoportot tartalmazó poliakrilamid gélben ... 28
5.2 Megújítható enzimreaktor szelektív poliakrilamid gélgranulákból ... 31
5.3 Hemoglobint szelektíven felismerő/megkötő monolit oszlop ... 33
6 Eredmények megvitatása ... 36
6.1 Mintakoncentrálás protonálható csoportot tartalmazó poliakrilamid gélben ... 36
6.2 Szelektív polimerek molekuláris lenyomatkészítéssel ... 40
6.2.1 Megújítható enzimreaktor szelektív poliakrilamid gélgranulákból ... 40
6.2.2 Hemoglobint szelektíven felismerő/megkötő monolit oszlop ... 42
7 Összefoglalás ... 45
Köszönetnyilvánítás ... 47
Irodalomjegyzék ... 48

1 Bevezetés

A dolgozat alapjául szolgáló munka célja olyan akrilamid-alapú töltetek kifejlesztése volt, amelyek fehérjék analízisében használhatók. Akrilamid, illetve különböző akrilamid-származékok meghatározott körülmények között végzett polimerizációjával egyedi tulajdonságokkal rendelkező polimerek állíthatók elő. A felhasznált monomerek mennyiségének és minőségének változtatásával, különböző adalékanyagok hozzáadásával és a polimerizáció körülményeinek megváltoztatásával a keletkező polimerek fizikai és kémiai sajátságai tág határok között változtathatók. A rendelkezésre álló monomerek változatossága miatt, illetve a polimer utólagos kémiai módosításával hidrofil, hidrofób, semleges és ionos csoportokat tartalmazó polimerek egyaránt készíthetők. Ezeknek a polimereknek egy része makroszkopikusan homogén, teljesen átlátszó, mint például a poliakrilamid gélek és az akrilamid-alapú polimeroldatok. Míg a másik csoportba tartozó polimerek nem tekinthetők teljesen homogénnek, opálosak vagy teljesen átlátszatlanok, mivel kisméretű (szubmikronos) részecskékből épülnek fel. Ilyenek az akrilamid-alapú monolitok.

Munkám során több különböző, akrilamid-alapú polimert készítettem, melyeket kromatográfiás és elektroforetikus elválasztási rendszerekben teszteltem. Készítettem bázikus csoportokat tartalmazó poliakrilamid gélt, melynek segítségével híg fehérjeminták koncentrálhatók; továbbá szelektív felismerőhelyekkel rendelkező mesterséges antitesteket, homogén gél és monolit formában, molekuláris lenyomatkészítési technikával.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Elektroforézis

2.1.1 A gél elektroforézis története

Az elektroforézis a töltéssel rendelkező részecskék vándorlása az elektromos térben. A módszer alapjait Kohlrausch dolgozta ki a 19. század végén, amikor megalkotta egyenleteit az ionok elektrolitban történő vándorlásáról [Kohlrausch, 1897]. Az elektroforézis végezhető szabad oldatban vagy ülepedést gátló közegben: gélben, illetve polimeroldatban.

A modern elektroforetikus elválasztás megteremtője Tiselius volt, aki 1937-ben írta le a mozgó határfelületek módszerét (moving boundary electrophoresis) [Tiselius, 1937]. Tiselius elektroforézis készülékében (U-alakú cső) az oldott fehérjék elektroforetikus vándorlásának megfelelően különböző határfelületek alakultak ki a pufferben, amelyeket az eltérő törésmutatójuk alapján tudott detektálni. Ezzel az eljárással lehetett először fehérjék tényleges mozgékonyságát meghatározni [Longsworth, 1959].

Tiselius módszerével szemben, szabad zóna elektroforézis esetén az egyes komponensek különálló zónák formájában válnak el egymástól. Ez esetben azonban szükség van valamilyen hordozóra, ami a molekulák ülepedését hivatott megakadályozni (ld. review: [Righetti, 2005]). Ez elsőként papír volt [Klobusitzky és König, 1939]. Smithies alkalmazta először a keményítőt hordozóként [Smithies, 1955], és sikerült gélben szérum fehérjéket elválasztania jó felbontással. A keményítő azonban kis mennyiségben töltött csoportokat is tartalmazott, amelyek elektroozmózist generáltak, illetve fehérjét kötöttek meg, így a keményítő géleket hamarosan felváltották a poliakrilamid gélek. A poliakrilamid géleket több kutatócsoport egymástól függetlenül, közel azonos időben vezette be [Raymond és Veintraub, 1959; Davis és Ornstein 1959]. Ornstein írta le elsőként a nem folytonos (*discontinuous*) elektroforézis elméleti hátterét [Ornstein, 1964]. A poliakrilamid gél az elválasztás szempontjából több előnyös tulajdonsággal rendelkezik, semleges, nem hat kölcsön az elválasztandó molekulákkal (fehérjék), pórusmérete tág határok között változtatható, ezáltal növelhető az elválasztás hatékonysága, amely tovább fokozható a Margolis és Kenrick által leírt pórusméret

gradiens gélekkel [Margolis és Kenrick, 1967]. A poliakrilamid gélek szerkezetét (pórusméretét) a monomerek összkoncentrációja (T%), illetve a keresztkötő monomerekhez viszonyított aránya (C%) határozza meg [Hjertén, 1962]. A poliakrilamid mellett a szintén semleges agaróz gélek bizonyultak megfelelő elválasztási közegnek [Hjertén, 1961]. Az agaróz azonban lényegesen nagyobb pórusmérettel rendelkezik, mint a poliakrilamid gélek, ezért nincs molekulaszűrő hatása még nagyméretű fehérjék esetén sem. (A metoxilált agaróz szerkezete a poliakrilamidéhoz hasonló és szintén rendelkezik molekulaszűrő tulajdonsággal [Hjertén *et al.,* 1994].)

A poliakrilamid gél elektroforézis (PAGE) történetét tekintve jelentős esemény volt a nátrium-dodecilszulfát (SDS), mint oldódást segítő detergens bevezetése [Shapiro *et al*., 1967]. Az SDS egy anionos detergens, amely denaturálja a fehérjemolekulákat azáltal, hogy a fehérjelánc hidrofób részeihez kötődik, valamint negatív töltéssel látja el azokat. A kötődés eredményeként a különböző fehérjemolekulák fajlagos töltése közel azonos lesz, aminek következtében lehetővé válik a molekulaméret (ill. molekulatömeg) szerinti elválasztás molekulaszűrő közegben. A következő fontos lépés a 2-dimenziós gél elektroforézis megjelenése volt [O'Farrell, 1975], amely komplex fehérjeminták nagyfelbontású analízisét tette lehetővé. O'Farrell az izoelektromos fókuszálást [Svensson, 1961] az SDS–poliakrilamid gél elektroforézissel kapcsolta össze. A fókuszálást követő második lépésben a Laemmli-féle nem folytonos pufferrendszert alkalmazta [Laemmli, 1970], és a felbontás növelése érdekében exponenciális gél gradienst (9-15 vagy 10-14 T%) használt.

Manapság a poliakrilamid gél elektroforézis klasszikus formái (natív-, denaturáló-, 2D-elektroforézis) igen elterjedtek a klinikai és analitikai gyakorlatban. Ugyanakkor az időigényes, klasszikus lap-gél elektroforézis módszerek egy része megvalósítható kapillárisban is, amely igen gyors, nagy felbontású analízist tesz lehetővé és mindemellett az elválasztás automatizálhatóvá válik. Az első publikációk kapilláris gél elektroforézisről a 80-as években jelentek meg [Hjertén, 1983; Cohen *et al*., 1987]. A klasszikus poliakrilamid gélek alkalmazása kapillárisban a gélek instabilitása miatt csak részben volt sikeres. Ezért több kutatócsoport foglalkozott stabil poliakrilamid [Baba *et al.,* 1992], és más típusú keresztkötött gélek [Righetti és Gelfi, 1997] kifejlesztésével, amelyeket sikeresen alkalmaztak nukleinsavak és fehérjék elválasztásában is. A keresztkötött géleken

kívül a molekulaszűrő tulajdonságú polimeroldatok [Bode, 1976; Lux *et al.*, 1990] is megjelentek, előnyük a gélekhez képest a könnyű elkészítés és az egyszerű használat. Habár a gélek általában nagyobb felbontást biztosítanak, a molekulaszűrő polimeroldatok (ún. „sieving polimerek”) használata egyre népszerűbbé válik manapság, ez részben a chiptechnológia térhódításának köszönhető.

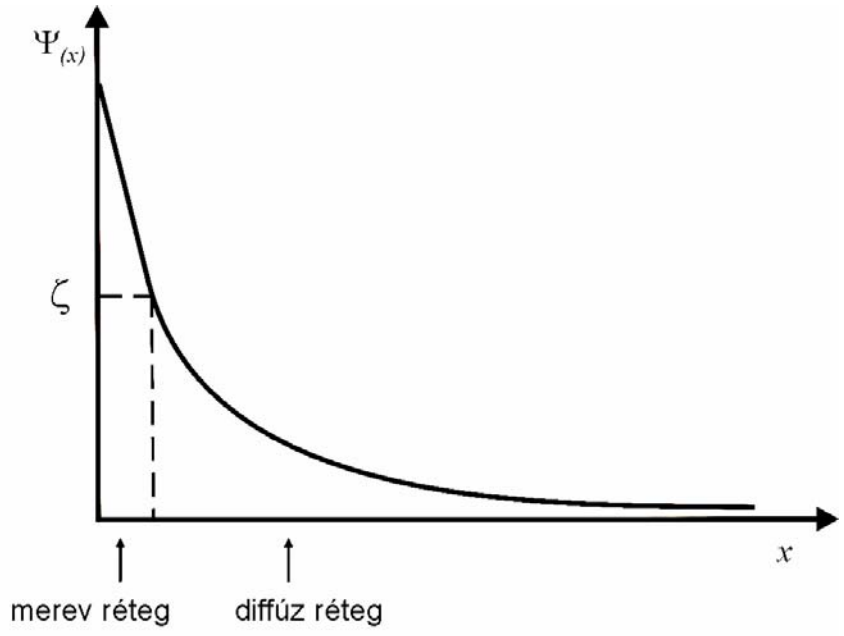
2.1.2 Az elektroforézis elméleti alapjai

Az elektroforetikus elválasztás alapja az, hogy a pufferben (háttérelektrolitban) oldott minta komponensei különböző sebességgel mozognak az alkalmazott elektromos erőtérben. Egy komponens sebessége ($v = \mu \cdot E$) egyenesen arányos az elektroforetikus mozgékonyságával (μ_{ef}) és az alkalmazott erőtérrel (E). A mozgékonyság az adott komponensre jellemző állandó, mely a következő összefüggés alapján számítható:

$$\mu_{ef} = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

, ahol z: a komponens (ion) töltésszáma, e: az elemi töltés, r: a szolvatált ion sugara, η: a puffer viszkozitása.

Az elektroozmózis töltéssel rendelkező felület mentén létrejövő folyadékáramlásként definiálható, minden olyan esetben fellép, amikor töltéssel rendelkező felülettel érintkező, ionokat tartalmazó oldatra (elektrolitoldat) egyenfeszültséget kapcsolunk. Kialakulása a töltött felület mentén létrejövő elektromos kettősrétegnek köszönhető. Az elektromos kettősréteg szerkezetét a Stern-féle modell írja le [Knox, 1994]. A kettősréteg egy negatív vagy pozitív töltésű felületi rétegből és az elektrolitoldatban a felülettel ellentétes töltésű ionok által kialakított rétegből áll. A Stern-féle modell szerint a szilárd felülethez legközelebb lévő ionok fixen (*Stern réteg (merev réteg)*), a távolabbi ionok pedig diffúzan helyezkednek el (*Gouy-Chapman réteg (diffúz réteg)*) az elektrolitoldatban. A felület és az elektrolitoldat között létrejövő elektromos potenciál ($\psi_{(x)}$) a merev rétegen belül lineárisan, a diffúz rétegben pedig exponenciálisan csökken a felülettől távolodva (1. ábra). A határfelületen mérhető potenciálérték a zéta potenciál (ζ).



1. ábra
Az elektromos potenciál változása az elektromos kettősrétegben

$\psi_{(x)}$: elektromos potenciál, x: a felülettől mérhető távolság, ζ: zéta potenciál

Párhuzamos irányú elektromos erőtér hatására a felületen felhalmozódott ionok az ellentétes töltésű elektród irányába mozognak és létrejön a teljes oldattömeg áramlása. Az így létrejövő folyadékáramot nevezzük elektroozmotikus áramlásnak, melynek mozgékonysága (μ_{eo}) a Smoluchowski egyenlettel írható le:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta}$$

, ahol ε_0: a vákuum dielektromos állandója, ε_r: a folyadék dielektromos állandója, ζ: a zéta potenciál, η: a viszkozitás.

Az elektroozmotikus áramlás profilja egyenes (dugattyúszerű), ha az elválasztási csatorna keresztmetszete nagyságrendekkel nagyobb, mint a kettősréteg vastagsága. Ellenkező esetben a kettősrétegek átlapolódhatnak, és ez az áramlási profil torzulását okozhatja.

Egy adott komponensre jellemző elektroforetikus mozgékonyság (μ_{ef}), és a puffer pH-jától és ionerősségétől függő elektroozmotikus mozgékonyság (μ_{eo}) összeadódik, ezek eredője adja meg a komponens tényleges mozgékonyságát az alkalmazott erőtérben.

Az egyes komponensek zónáinak alakját, szélességét számos tényező befolyásolja az elválasztás során. Ezen tényezők ismerete és értelmezése nagyban elősegíti a kapott eredmények kiértékelését.

A mintazóna az elektroforetikus elválasztás során különböző tényezők hatására kiszélesedik, és Gauss-görbe alakú „csúcsként" detektálható (σ = a Gauss görbe inflexiós pontjánál mérhető csúcsszélesség fele). Az egyes zónaszélesedést okozó tényezők hatása összeadódik. Az elválasztás során kialakuló csúcs teljes varianciája (σ^2_{tot}) a következő összefüggéssel adható meg:

$$\sigma^2_{tot} = \sigma^2_{inj} + \sigma^2_{diff} + \sigma^2_J + \sigma^2_{ads} + \sigma^2_{\Delta\kappa} \ldots$$

A mintazóna varianciája (σ^2_{inj}) a következőképpen adható meg:

$\sigma^2_{inj} = \frac{l^2_{inj}}{12}$, ahol l_{inj} az injektált zóna hossza. Megfelelően nagy felbontás eléréséhez szükséges, hogy a kezdőzóna keskeny legyen (1-2 %-a az elválasztási csatorna hosszának). A hosszirányú diffúzióból eredő szélesedés (σ^2_{diff}) az Einstein egyenlettel fejezhető ki ($\sigma^2_{diff}=2\cdot D\cdot t$; ahol D: a diffúziós együttható, t: a vándorlási idő). Az elektromos áram hatására hőmérsékletemelkedés következik be (Joule-hő), az elválasztási csatornában hőmérsékletgradiens alakul ki, ami szintén hozzájárul a zóna kiszélesedéséhez ($\sigma^2_J = \frac{\left(\frac{B\cdot\kappa\cdot l}{\lambda}\cdot\left(\frac{r\cdot E}{2\cdot T_0}\right)^2\right)^2}{12}$; ahol B = 2400 K, κ : a puffer elektromos vezetőképessége, l: a minta által megtett út, λ: a puffer hővezetőképessége, r: az elválasztási csatorna átmérője, E: a térerősség, T_0: a hűtés hőmérséklete) [Hjertén, 1990]. A Joule-hő képződés csökkenthető a térerősség, a csatorna átmérőjének, ill. a puffer vezetőképességének csökkentésével. A minta és az elválasztási csatorna felülete között kialakuló kölcsönhatások szintén hozzájárulnak a mintazóna kiszélesedéséhez (σ^2_{ads}), amelyek rontják az elválasztás hatékonyságát, ezért azokat minimalizálni kell. Ha a mintazóna és a puffer vezetőképessége között nagy az eltérés, akkor az egyes zónák térerősségbeli különbsége a csúcs torzulását okozza (tailing, fronting) [Hjertén *et al.,*2004].

2.1.3 Mintakoncentrálás – Az elektroforézis gyakorlati aspektusa

A mintaelőkészítésnek nagyon fontos szerepe van az elválasztástechnikában. A megfelelően megválasztott mintaelőkészítés és mintakoncentrálás jelentősen növelheti a későbbi analízis hatékonyságát. A mintaelőkészítés célja lehet az elválasztást zavaró komponensek (pl. sók) eltávolítása, a kis mennyiségben jelenlevő komponensek dúsítása, illetve keskeny mintazóna kialakítása. Történhet az elválasztási rendszertől teljesen függetlenül, azaz *off-line* módon, vagy az elválasztási rendszerhez részben, vagy teljesen integrálva, *on-*, ill. *in-line* módon. A koncentráló módszerek a felhasznált fizikai jelenség alapján csoportosíthatók.

2.1.3.1 Elektroforetikus elven alapuló mintakoncentrálás

Az elektroforetikus módszereknél a koncentrálás a minta elektroforetikus vándorlási sebességének befolyásolásával történik, amely leggyakrabban kétféle módon valósítható meg.

a „Zone sharpening” (*zóna élesítés*)

A módszert Haglund és Tiselius vezette be [Haglund és Tiselius, 1950]. Lényege, hogy a mintát higított pufferben oldják fel, így a mintazónában (a mintazóna alacsonyabb vezetőképessége miatt) nagyobb lesz az elektromos térerősség, mint az elválasztási csatornában. A gyorsan mozgó mintaionok amint elérik a futtatópuffer zónáját lelassulnak, és a határfelületen feldúsulnak, éles, koncentrált zónát kialakítva.

b Stacking (*feldúsulás*)

A módszer első alkalmazása és elnevezése Davis és Ornstein nevéhez fűződik [Davis és Ornstein, 1959]. A mintazónát két különböző pufferzóna, a mintánál nagyobb mozgékonyságú iont tartalmazó vezető elektrolit (LE: leading electrolyte) és a kisebb mozgékonyságú iont tartalmazó záró elektrolit (TE: terminating electrolyte) között helyezik el. A minta a mozgékonyság különbség miatt a két pufferzóna között fog koncentrálódni, és a különböző térerősségű zónák azonos sebességgel vándorolnak tovább. Manapság a módszer általában izotachoforézis néven ismert, gyakran alkalmazzák kapilláris elektroforetikus elválasztásoknál önállóan [Sázelova *et al.,* 2003; Bodor *et al.,* 2001], vagy elválasztást megelőzően, mintakoncentrálásra [Dankova *et al.,* 1999].

2.1.3.2 Kromatográfiás elven alapuló mintakoncentrálás

A kromatográfiás koncentrálási módszerek alapja a minta szilárd hordozón történő adszorpciója. A kromatográfiás módszerek előnye az elektroforetikus módszerekkel szemben az, hogy nemcsak a minta koncentrálására, hanem a minta tisztítására is alkalmasak. Az adszorbens lehet szilárd hordozóhoz kötve (SPE: solid-phase extraction), vagy membránra impregnálva (mPC: membrane pre-concentration).

a Kis szelektivitású módszerek

A kis szelektivitású módszerek csoportjába tartoznak az ioncserélő (anion- vagy kationcsere), és a hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiás módszerek, melyek többféle hasonló tulajdonságú komponens egyidejű koncentrálását teszik lehetővé (ld. review: [Saavedra és Barbas, 2007]).

b Nagy szelektivitású módszerek

Nagy szelektivitású koncentráló módszer a molekuláris felismerésen alapuló immuno-affinitás kromatográfia [Hennion és Pichon, 2003] és a molekuláris lenyomatkészítés technikája [Sellergren, 1994; Pichon, 2007], melyek segítségével egyes komponensek szelektíven izolálhatók, dúsíthatók.

2.2 Molekuláris lenyomatkészítés – a szelektív polimerek

Biológiai rendszerekben a molekuláris felismerés központi szerepet játszik a molekulák közötti kölcsönhatások (pl. antigén-antitest, enzim-szubsztrát) kialakulásában. A felismerő és a felismerendő (ligand) molekula megfelelő helyei komplementerek, így képesek kialakítani egymással a szükséges kötéseket, kölcsönhatásokat. A kérdésre, hogy mesterségesen előállítható-e bizonyos molekulákat specifikusan felismerő polimer, a molekuláris lenyomatkészítés (molecular imprinting) adta meg a választ. Ezzel a módszerrel olyan szintetikus kötőhelyek alakíthatók ki egy polimer mátrixban, amelyek komplementerek egy adott ligandum kötőhelyeivel és így képesek felismerni azt. Az első sikeres, „kémiai emlékezettel” rendelkező polimer szintézise Wulff és Sarhan nevéhez fűződik [Wulff és Sarhan, 1972].

A molekuláris lenyomatkészítés funkcionális, vagy semleges monomerek és keresztkötők, templát molekula jelenlétében történő polimerizációját jelenti. A templát eltávolítása után a képződött polimerben visszamaradó felismerő helyek komplementerek a templáttal. A polimer így képes az adott molekula felismerésére és megkötésére [Kempe és Mosbach 1995]. A molekuláris lenyomatkészítés technikája kisebb-nagyobb módosításokkal széleskörűen alkalmazható különböző molekulákra: például peptidekre [Rachkov és Minoura, 2000], fehérjékre [Glad *et al*., 1985, Liao *et al*., 1996c], gyógyszermolekulákra [Kempe és Mosbach, 1994], aminosav származékokra [Kempe, 1996] és cukrokra [Wulff és Haarer, 1991].

2.2.1 Kismolekulák felismerésére alkalmas polimerek

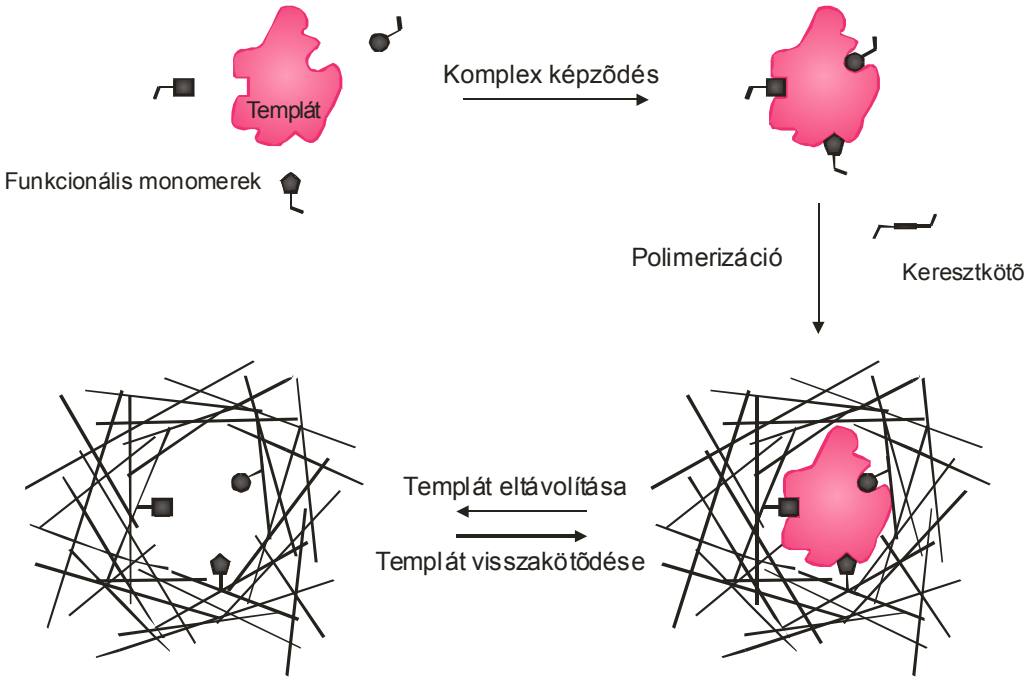
A szelektív felismeréssel rendelkező polimerek szintézisének sikere egy adott templát molekula esetén a megfelelő reagensek (funkcionális monomer, keresztkötő, iniciátor, oldószer) kiválasztásán, azok koncentrációján és a polimerizáció körülményeinek megválasztásán múlik. A monomer és a templát között létrejövő kötés lehet kovalens [Wulff, 1995; Norrlöw *et al*.,1987] vagy egyéb kötés (hidrogénkötés, elektrosztatikus kölcsönhatások) [Nicholls *et al*., 1995]. A kölcsönhatások erőssége és a funkcionális csoportok elrendeződése befolyásolja a polimer templátkötő képességét. A leggyakrabban használt monomerek közé tartoznak a metakrilsav, metakrilamid, különböző vinilpiridin származékok illetve a sztirol. Keresztkötőként általában etilénglikol-dimetakrilát, trimetilpropán-trimetakrilát vagy divinil-benzol használatos. A nem-kovalens komplex stabilitását (templát-monomer komplex) befolyásolja az oldószer. Minél apolárisabb a polimerizációhoz használt oldószer, annál hatékonyabb a lenyomatkészítés [Mosbach és Ramström, 1996]. A leggyakrabban használt oldószerek a kloroform, toluol, diklórmetán és az acetonitril.

Az egyszerű szintézisnek, a polimerek változatos összetételének és stabilitásának köszönhetően az imprinting technikával készült polimerek (MIP) mind a hagyományos folyadékkromatográfiában [Glad *et al*., 1985; Nicholls *et al*., 1995], mind az elektrokromatográfiában [Schweitz *et al*., 1998; Quaglia *et al*., 2004] széles körben elterjedtek. A legfontosabb alkalmazási területük az enantiomer elválasztás [Kempe és Mosbach, 1995; Schweitz *et al*., 1997], de egyre gyakrabban használják szilárdfázisú extrakcióhoz [Sellergren, 1994; Pichon,

2007] és szenzorok készítésére is [Kriz *et al.*, 1997] az imprinting technikával készített polimereket.

2.2.2 Fehérjék felismerésére alkalmas polimerek

A fehérjék szelektív felismerésére alkalmas polimerek szintézise jelentős előrelépést jelentett, mert ezek a klinikai diagnosztikában, proteomikában, környezeti analízisben, gyógyszerkutatásban és szenzorikai kutatásokban is alkalmazhatók (ld. review: [Bossi *et al.*, 2007]). A molekuláris lenyomatkészítés (molecular imprinting) technikájával készült polimerek (ún. mesterséges antitestek) szelektivitása elérheti a természetes antitestekét, ugyanakkor szintézisük egyszerűbb, olcsóbb, nem igényel kísérleti állatokat és sokkal stabilabbak a természetes (fehérje) antitesteknél [Hjertén *et al.*, 1997].



2. ábra
A molekuláris lenyomatkészítés sémája funkcionális monomerek használatakor

A fehérjék elleni mesterséges antitestek készítésének két irányzata van. Az egyik irányzat képviselői (**I**) funkcionális monomereket használnak a polimer szintéziséhez (2. ábra), amelyek a megfelelő térbeli elrendeződést felvéve erős kölcsönhatásokat alakítanak ki a templát molekulával (fém koordinációs, erős

elektrosztatikus kölcsönhatás), míg a másik irányvonal követői (**II**) nem használnak speciális monomereket (3. ábra), ebben az esetben a polimer és a templát között gyenge másodrendű kötések alakulnak ki és emellett nagy hangsúlyt kap az alaki megfelelés is a felismerésben.

I/a Szilán polimerek

Glad és munkatársai [Glad *et al*., 1985] transzferrint használtak templátként és boronát-szilánt funkcionális monomerként. A boronát csoport észterkötésen keresztül kapcsolódik a transzferrin cukorláncaihoz. A templát és a monomerek oldatához szilika gyöngyöket is kevertek, így a polimer a gyöngyök felületén alakult ki, amelyeket nagynyomású folyadékkromatográfiás analízisben használtak. A transzferrin jelenlétében szintetizált polimer nagyobb affinitást mutatott a transzferrinhez, mint a marha szérum albuminhoz.

A módszer biokompatibilis, mert a szilánok polimerizációja vizes oldatban megy végbe, így nincs szükség szerves oldószerre. Ugyanakkor a polimer szelektivitása nem elég nagy, más glikoproteinek is könnyen reagálhatnak a polimer funkcionális csoportjaival.

Ezt az eljárást más kutatócsoport is alkalmazta azóta fehérjékre [Venton és Gudipati, 1995], valamint a módszer egy továbbfejlesztett változatát, ahol a templát fehérjét a polimerizációt megelőzően a szilika gyöngy felületén rögzítették [Shiomi *et al*., 2005].

I/b Kelátképző csoportot tartalmazó polimerek

Templátként azok a fehérjék használhatók ennél a technikánál, amelyek rendelkeznek felületi hisztidinekkel [Kempe és Mosbach, 1995]. A funkcionális monomerként használt *N*-(4-vinil-benzil)-imino-diecetsav és a hisztidin imidazol gyűrűje réz(II) ionnal alakít ki koordinatív kötést. A polimer előkezelt felületű szilika gyöngyökön alakul ki.

A módszer hátrányai, hogy a fehérjék egy szűk csoportja használható csak templátként, illetve, hogy a funkcionális monomer kelátképző csoportja nem specifikus kölcsönhatásokat alakíthat ki más molekulákkal, ezáltal csökkentve a polimer szelektivitását.

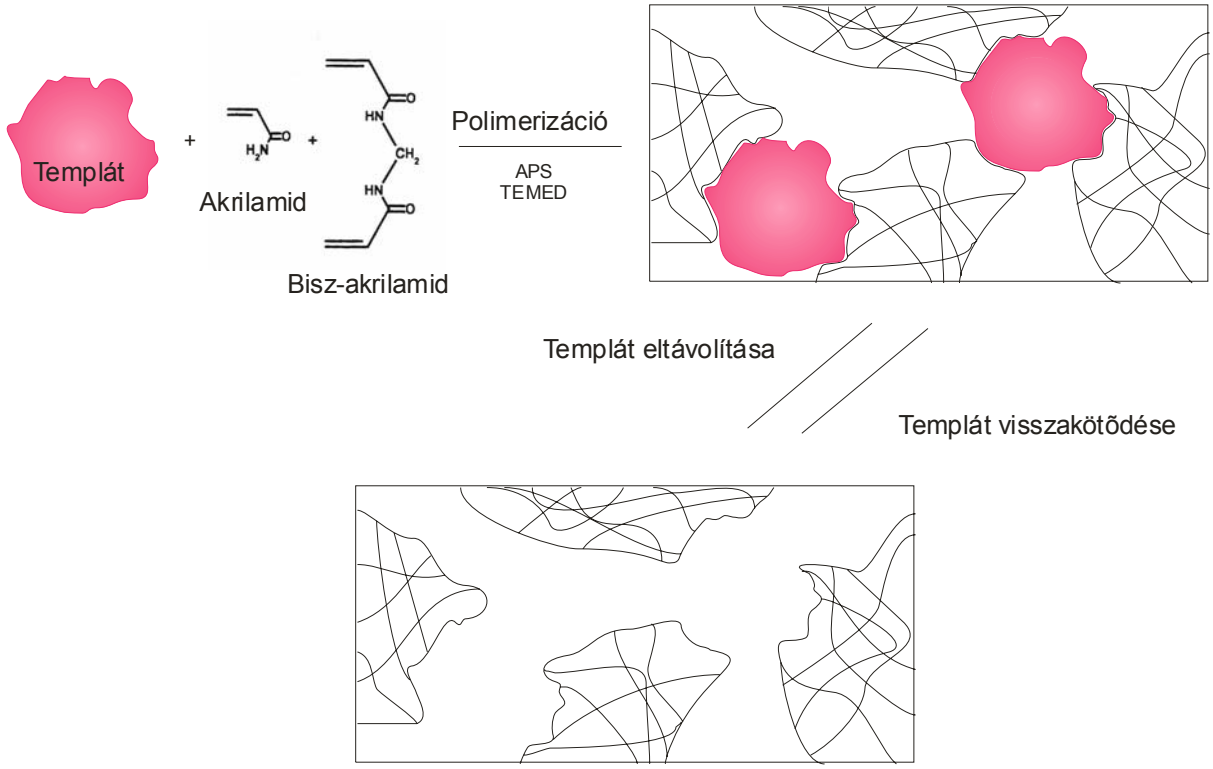
I/c Epitóp módszer

A módszer a természetes antitest-antigén kölcsönhatást vette alapul, ahol a felismerés a fehérje (antigén) megfelelő részének (epitóp) komplementaritásán

alapul. Az epitóp egy rövid aminosavszekvencia, amely komplementer az antitest kötőhelyével. Rachkov és munkatársai kísérleteikben csak egy rövid peptidszekvenciát használtak templátként az egész polipeptidlánc helyett [Rachkov és Minoura, 2001]. Az így készített polimer később nemcsak a templátként használt peptid szakasz, hanem a teljes polipeptid felismerésére is képes volt. A polimerhez metakrilsavat és keresztkötőként etilénglikol-dimetakrilátot használtak. A módszer megfelelően működött 8-10 aminosavból álló peptidek esetén (pl. oxitocin), azonban kérdéses, hogy a bonyolult harmadlagos szerkezettel rendelkező fehérjék esetén ugyanilyen hatásosan tud-e működni.

I/d Felületi polimerek

Bossi és munkatársai polisztirol mikrolemez felületén hoztak létre 3-amino-fenil-bórsav polimert különböző fehérjék (pl. laktoperoxidáz, citokróm c, hemoglobin) jelenlétében [Bossi *et al.*, 2001]. A hemoglobin jelenlétében szintetizált vékony polimer film nagyobb affinitással kötötte a templátként használt, cukorrészt nem tartalmazó hemoglobint, mint a glikozilált hemoglobint.



3. ábra
A poliakrilamid gél antitestek szintézisének sémája

II Poliakrilamid gélek, mint mesterséges antitestek

Hjertén és munkatársai módszere [Liao *et al*., 1996c; Hjertén és Liao szabadalom, 1998] alapvetően eltér az előzőekben bemutatott technikáktól (3. ábra). A szintézishez nem használnak funkcionális monomereket, mivel azok általában töltéssel rendelkeznek és ezáltal erős elektrosztatikus kölcsönhatást tudnak kialakítani különböző, nem templát molekulákkal is, így csökkentve a polimer szelektivitását [Hjertén *et al*., 1997; Tong *et al*., 2001]. A „mesterséges antitestek" anyaga az akrilamid és bisz-akrilamid polimerizációja során kialakuló semleges, nagy pórusméretű poliakrilamid. A poliakrilamid több okból is ideális mátrixnak tűnik: (a) semleges, a nem-specifikus kölcsönhatásai fehérjékkel elhanyagolhatók (ezt támasztják alá a poliakrilamid gél elektroforézis tapasztalatai is) és (b) hidrofil, tehát biokompatibilis. Nem elhanyagolható az a szempont sem, hogy igen sok laboratóriumban használják, jól ismert és könnyen elérhető.

A mesterséges poliakrilamid gél antitestek szelektivitásának alapjai:

- a közeli illeszkedés az antigén és a lenyomata közt a gélben (ami az antigén teljes felszínéről készülhet, szemben a természetes antigén-antitest kapcsolódásokkal, ahol csak az adott molekulák meghatározott részei között alakul ki kölcsönhatás (ld. epitóp módszer))
- az antigén és a polimer között kialakuló gyenge kötések nagy száma. (A templát és a polimer között nagyszámú, gyenge kölcsönhatás (hidrogénkötés, indukált dipólus, apoláros kötés) alakul ki.)

Szelektív géleket készítettek hemoglobin, citokróm *c*, transzferrin, növekedési hormon, mioglobin, ribonukleáz A és más fehérjék [Liao *et al*., 1996c; Hjertén *et al*., 1997; Tong *et al*., 2001; Takátsy *et al*., 2006a; 2007], Semliki Forest vírus [Takátsy *et al*., 2006b] és *Echerichia coli* baktérium [Bacskay *et al*., 2006] ellen is. A szintézis univerzális, hiszen az eljárás változtatás nélkül, illetve csekély módosítással használható a különböző antigének ellen. A gélek szelektivitását hasonló fehérjék, illetve vírusok, baktériumok felhasználásával, ioncserélő kromatográfiával és elektroforetikus technikával tanulmányozták. Az eredmények azt mutatják, hogy a poliakrilamid gélek segítségével minimális konformációs és kémiai eltérések is kimutathatók, például transzferrin vasmentes és vassal telített formája [Takátsy *et al*., 2006a] vagy a Semliki Forest vírus vad és mutáns típusa között [Takátsy *et al*., 2006b].

A molekuláris imprinting technikával készített mesterséges antitestekről elmondható, hogy szintézisük egyszerű, idő-, és költségkímélő, emellett olyan antigének ellen is készíthetők, amelyek ellen természetes antitest termeltetése egyáltalán nem, vagy csak nehezen oldható meg. Ezek a mesterséges polimerek fizikai, kémiai hatásokkal szemben (hőmérséklet, pH, nyomás vagy szerves oldószerek) sokkal ellenállóbbak, mint természetes társaik. Szelektív memóriájukat hosszú távon megőrzik, újra és újra felhasználhatók anélkül, hogy a szelektivitásukban számottevő romlás következne be [Takátsy *et al*., 2007]. Fehérjék szelektív felismerésére alkalmas mátrixok ezért jól használhatók a biotechnológiában, elválasztásra illetve tisztításra [Hjertén *et al*, 1997]; diagnosztikai célokra; bioszenzorok érzékelőiként [Rick és Chou, 2005] és katalitikus folyamatokban is.

2.3 Monolitok

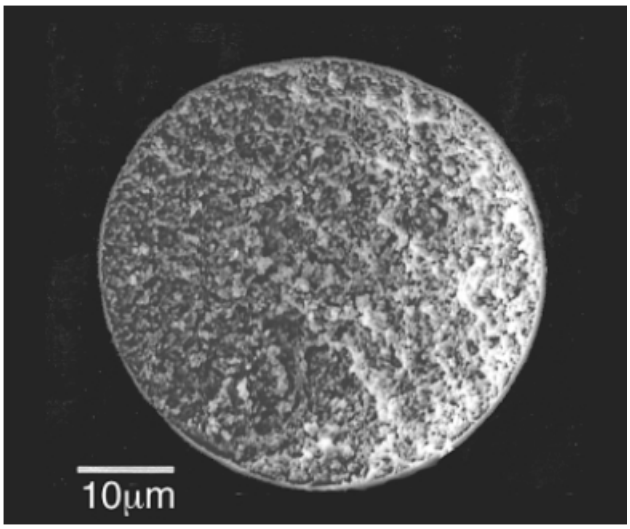
A monolitok (az angol nyelvű szakirodalom „continuous beds", „continuous polymer rods" néven is említi) kromatográfiás állófázisok, melyek *in situ* az oszlopban készíthetők el. Az első sikeres kísérlet ilyen töltet előállítására 1989-ben történt [Hjertén *et al*., 1989]. Ez az első monolit („continuous polymer bed") akrilsav és *N,N'*-metilén-bisz-akrilamid kopolimerje volt, amelyet a polimerizációt követően erősen összepréseltek. Az így kapott porózus polimer, folyadékok számára átjárható volt, és fehérjék elválasztását tette lehetővé kationcserélő mechanizmus alapján. Az azóta eltelt idő alatt változatos módszereket dolgoztak ki monolitok szintézisére, amelyek különböznek a felhasznált monomerekben, oldószerekben stb., de szerkezetük hasonló, kisméretű (szubmikronos) egymáshoz kovalensen kapcsolódó részecskékből állnak (4. ábra). Számos összefoglaló tanulmány jelent meg monolitokkal kapcsolatban, melyek különböző nézőpontok szerint dolgozzák fel a területen született új eredményeket [Legido-Quigley *et al*., 2003; Végvári és Guttman, 2006].

A monolitokat két nagy csoportra oszthatjuk: (**I**) szilícium-dioxid monolitokra, amelyek az ún. szol-gél technológiával készülnek; és (**II**) szerves polimer-alapú monolitokra, ide tartoznak az akrilamid-, metakrilát- és a sztirol-alapú polimerek.

I Szilicium-dioxid monolitok

Tanaka és csoportja készítette az első, porózus, szilícium-dioxid monolitot [Minakuchi *et al*., 1996]. A prekurzorokból oldatot állítanak elő és ebből gélesedés során alakul ki a megfelelő polimerhálózat. A szilanolcsoportok polikondenzációval kapcsolódnak össze hálózatos rendszerré. A kialakuló hálózat tulajdonságait, így például a pórusméretet, befolyásolja a pH, a hőmérséklet, a reagensek koncentrációja, a reakcióidő, és a katalizátor.

Ezzel a technológiával készülő HPLC monolit oszlopok (pl.: Chromolith™) már kereskedelmi forgalomban kaphatók.



4. ábra
Monolitról készített pásztázó elektronmikroszkópos felvétel [Enlund *et al*., 2001].

II Szerves polimer-alapú monolitok

A polimerhálózat gyökös mechanizmusú láncreakció során jön létre. A monomeroldat tartalmazza a monomereket, a keresztkötőt, az iniciátort, a porogént, illetve valamilyen speciális ligandumot (a monomerek tulajdonságaitól és a töltet későbbi felhasználásától függően). A növekvő polimerláncok, a jelenlévő porogénnek köszönhetően oldhatatlanná válnak, és kicsapódnak. Az aggregátumok között kialakuló csatornák teszik lehetővé a folyadékáramlást a monoliton keresztül. A polimer pórusméretét a keresztkötő koncentrációjával és a porogén megválasztásával lehet befolyásolni.

II/a Metakrilát-alapú monolitok

Svec és Fréchet vezette be a metakrilát-alapú monolitokat [Svec és Fréchet, 1992], de azóta több más kutatócsoport is sikeresen alkalmazta őket különböző célokra [Zhang *et al*., 2000; Ping *et al*., 2003a; 2003b]. Glicidil-metakrilát, 2-(hidroxi)etil-metakrilát és más metakrilsav észter monomert és keresztkötőként etilén-dimetakrilátot (EDMA) használnak leggyakrabban, míg porogénként egy háromkomponensű rendszert, ami különböző arányban tartalmaz vizet, 1-propanolt és 1,4-butándiolt. A glicidil-metakrilát reaktív epoxi-csoportja miatt könnyen módosítható a monolit felülete, ezáltal különböző ligandumok kapcsolhatók hozzá [Zhang *et al*., 2000]. A monolit széles pH tartományban (2-12) stabil [Svec *et al*., 2000].

II/b Sztirol-alapú monolitok

Svec és Fréchet használt először sztirol-alapú monolitot [Wang *et al*., 1993] fehérjék fordított fázisú HPLC-s elválasztásához. A sztirol mellett általában divinil-benzol a keresztkötő, a porogén pedig valamilyen alkohol vagy azok keveréke (metanol, etanol, propanol, toluol). A poli(sztirol-divinil-benzol) polimer nagyon széles pH tartományban stabil (1-14), és mivel erősen hidrofób tulajdonságú, közvetlenül is használható fordított állófázisként. Felületi alkilcsoportok a polimer utólagos alkilálásával (Friedel-Crafts reakció [Gusev *et al*., 1999]) vagy alkil-sztirol monomerek használatával alakíthatók ki.

II/c Akrilamid-alapú monolitok

Hjertén módszerének lényege az akrilamid-származékok polimerizációja só jelenlétében [Liao *et al*., 1991]. A polimerizáció során a növekvő polimerláncok aggregátumokat képeznek a hidrofób kölcsönhatásnak köszönhetően, amit a jelenlévő só (ammónium-szulfát) indukál/elősegít. Az így keletkezett aggregátumok között csatornák alakulnak ki, melyek lehetővé teszik a folyadék áramlását a polimeren keresztül. Az első kísérletekben még *N,N'*-metilén-bisz-akrilamid keresztkötőt használtak, de a monolitok pH stabilitása és az áramlási tulajdonságai nem voltak megfelelőek [Hjertén *et al*., 1993], ezért a későbbiekben metakrilamidot és piperazin-diakrilamidot használtak a monolitok szintéziséhez. A megfelelő funkcionális csoportot (ligandumot) tartalmazó polimer szintézise történhet egy lépésben ha rendelkezésre áll vízoldékony funkcionális monomer [Zeng *et al*.,1996; Ericson és Hjertén, 1999; Hoegger és Freitag, 2001; Liao *et al*.,

1996a]; vagy több lépésben a polimer felületi módosításával [Liao *et al*., 1996b; Ericson *et al*., 1997].

Palm és Novotny vizes puffer és *N*-metilformamid különböző arányú keverékét használta oldószerként [Palm és Novotny, 1997]. A monolit készítéshez akrilamidot, *N,N'*-metilén-bisz-akrilamidot, akrilsavat és különböző lánchosszúságú alkil-akrilátot használtak fel, a polimerláncok aggregációjának elősegítése érdekében polietilén-glikolt adtak a monomeroldathoz.

A monolit töltetek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek:

- gyors és egyszerű polimerizáció közvetlenül a kromatográfiás oszlopban/kapillárisban (A monolit kovalensen köthető a kapilláris falához, ezzel kiküszöbölhető a gyakran problémákat okozó „fritek" használata.)
- változatos összetétel, ami a felhasználható monomerek nagy számának, és a polimerizációt követő felületi módosításoknak köszönhető
- nagy reprodukálhatóság a szintézis és felhasználás tekintetében is
- nagy mechanikai és kémiai stabilitás
- hagyományos folyadékkromatográfiában és elektrokromatográfiában egyaránt alkalmazhatók állófázisként
- könnyen alkalmazhatók miniatürizált rendszerekben is.

A monolitok leggyakoribb alkalmazási területei a folyadékkromatográfiás (HPLC, μ-HPLC) és elektrokromatográfiás (CEC) elválasztások; biomolekulák elválasztása [Svec *et al.,* 2000; Oefner és Huber, 2002; Jungbauer és Hanh, 2004], környezeti minták analízise; de monolitokat használnak szilárdfázisú extrakciókban [Sellergren, 1997; Svec, 2006] és mintakoncentráláshoz is [Sellergren, 1994; Armenta *et al.,* 2005].

2.4 Biokatalízis - Enzimreaktorok

Az enzimek specifikus, általában fehérje természetű katalizátorok, melyek komplex, kémiai folyamatok lejátszódását teszik lehetővé biológiai rendszerekben. A biológiai forrásból származó enzimek ipari (pl. élelmiszeripar, gyógyszeripar) és tudományos (pl. fehérje kémia) célú felhasználása nagy jelentőséggel bír.

Az enzimek által katalizált folyamatokat túlnyomórészt klasszikus tankreaktorokban, kontrolált hőmérsékleten hajtják végre. Ezek a bioreaktorok könnyen kezelhetők, ugyanakkor használatuk költséges, mivel a keletkezett terméket el kell választani az enzimtől és az enzim újbóli felhasználása sem lehetséges az aktivitásvesztés miatt.

Az enzimek szilárd hordozóhoz kötése, azaz a különböző immobilizációs eljárások megjelenése nagy előrelépést jelentett az enzimreaktorok fejlődésében. Az immobilizált enzimek használata, azon túl, hogy lehetővé teszi az enzimek többszöri felhasználását, kontrolálhatóbbá teszi a lejátszódó reakciót és leegyszerűsíti az egész folyamatot. Az enzim tulajdonságai (stabilitás, katalitikus aktivitás) a fixálás/rögzítés következtében megváltozhatnak, ezért kulcsfontosságú a megfelelő módszer és hordozó kiválasztása.

Az ideális hordozó stabil és inert. Mivel általában áramlásos rendszerben (oszlopos technika) használják az enzimreaktorokat, nagyon fontosak a töltet egyéb fizikai tulajdonságai is, mint az alak, szemcseméret, pórusméret, stb., mert ezek befolyásolják az oszlop kromatográfiás tulajdonságait. A hagyományos szerves- (agaróz, dextrán), és szervetlen-alapú (SiO_2) töltetek mellett, az előnyös kromatográfiás tulajdonságai miatt gyakran használják a monolitokat is enzimreaktorok alapjául [Mohammad és Hjertén, 1994; Josić és Buchacher, 2001].

A technikák, amelyek segítségével enzimek szilárd hordozóhoz köthetők, két csoportba sorolhatók. Az egyik csoportba azok a módszerek tartoznak, amelyek esetén az enzim kovalens kötésekkel kapcsolódik a szilárd hordozóhoz, a másik esetben az enzim adszorpciója gyenge kölcsönhatások révén jön létre. A gyenge kölcsönhatásokkal történő adszorpció általában kevéssé befolyásolja a fehérje (enzim) natív szerkezetét, ezáltal az aktivitását; viszont a környezet kis változása (pH, ionerősség megváltozása) is meggyengítheti a kölcsönhatást, ami az enzim deszorpcióját eredményezi. Ez teszi lehetővé ugyanakkor az enzimreaktor

regenerálását, hiszen az inaktív enzim egyszerűen eltávolítható és helyettesíthető friss, aktív enzimmel [Hjertén *et al.,*1981; Caldwell *et* al., 1975]. Kovalens kötésekkel rögzített enzimek esetén, a kötés stabilitása miatt kicsi a deszorpció valószínűsége, az így készített enzimreaktorok tehát hosszabb élettartamúak. Az erős kölcsönhatások azonban lényegesen befolyásolhatják a fehérje (enzim) natív szerkezetét (rigidebbé válik), amely pozitívan befolyásolhatja az enzim stabilitását, de együtt járhat jelentős aktivitásvesztéssel is. Az immobilizációs technikákról és az enzimreaktorok alkalmazási lehetőségeiről több összefoglaló is megjelent az utóbbi években [Girelli és Mattei, 2005; Mateo *et al.,* 2007].

Katalitikus aktivitással rendelkező polimerek, melyek enzimek aktív centrumával egyenértékű „üregeket" tartalmaznak molekuláris lenyomatkészítéssel készíthetők. Ezek a polimerek olyan kötőhelyekkel rendelkeznek, amelyek alkalmasak a szubsztrát molekula megkötésére és koenzim jelenlétében annak átalakítására, azaz enzimszerű működésre [Wulff, 1995]. Templátként az adott enzimreakció átmeneti termékével analóg molekulát használnak, amely a funkcionális monomerekkel és a keresztkötővel együtt a polimerizáció során kialakítja a megfelelő polimer szerkezetet. Ezek a mesterséges enzimek rendelkeznek mindazokkal az előnyös tulajdonságokkal, melyek a 2.2 fejezetben, az imprinting technikával készített polimerek kapcsán már olvashatók voltak, továbbá használatukkal enantioszelektiv katalízis is megvalósítható [Volkmann és Brüggemann, 2006].

Az enzimreaktorok szerepe egyaránt jelentős a bioanalitikában és az alkalmazott biotechnológiában. A területen folyamatos fejlesztés zajlik, melynek célja maximális enzimaktivitás és stabilitás elérése a lehető legalacsonyabb költségek mellett. A jövőben valószínűleg egyre nagyobb szerep jut majd a megújuló enzimreaktorok számára.

3 Célkitűzések

Munkánk során új, akrilamid-alapú polimerek kifejlesztését kívántuk elérni, melyeket elektroforetikus és kromatográfiás elválasztó rendszerekben, fehérjék analízisére használhatunk.

A következő célokat tűztük ki:

- Akrilamid-alapú homogén gél kifejlesztése (protonálható csoportot tartalmazó monomer felhasználásával), mely alkalmas híg fehérjeminták koncentrálására, ill. olyan gélrendszer készítése, amely fehérjék koncentrálására és elválasztására használható.
- Megújítható poliakrilamid enzimreaktor készítése mesterséges poliakrilamid gél antitestek felhasználásával.
- Fehérjék (hemoglobin) szelektív felismerésére és megkötésére képes, kromatográfiás monolit töltet kifejlesztése molekuláris imprinting technikával.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Poliakrilamid gélek elektroforézishez

4.1.1 Poliakrilamid gélek szintézise

Elektroforézishez használatos poliakrilamid géleket készítettünk az irodalomban korábban leírt módszer szerint. A monomereket, illetve azok koncentrációját változtattuk. A polimerizáció a következő séma alapján történt:

A monomereket (akrilamid (Bio-Rad Laboratories), vagy akrilamid és 2-morfolino-etilakrilamid (*Acrylamido buffer pK 6.2*) (Fluka)) és a keresztkötőt (*N,N'*-metilén-bisz-akrilamid (Bio-Rad Laboratories)) 0,02 M nátrium-foszfát pufferben (pH 6.8) oldottuk fel. A polimerizáció elindításához ammónium-perszulfátot (APS) és *N,N,N',N'*-tetrametil-etiléndiamint (TEMED) (Bio-Rad Laboratories) adtunk a gáztalanított oldathoz. A monomeroldatot azonnal 5 mm belső átmérőjű üvegcsőbe pipettáztuk, amelynek az alját előzőleg dialízis membránnal zártuk le. A monomeroldat tetejére izopropil alkoholt rétegeztünk, így elkerülhető volt az oxigénnel való érintkezés (amely gátolja a polimerizációt), valamint sima gélfelszínt kaptunk, ami fontos volt a jól definiálható kezdőzóna kialakításához [Rezeli *et al*., 2008].

4.1.2 Gél elektroforézis üvegcsőben

Az elektroforézist vertikális elektroforézis készülékben végeztük, amelyhez tápegységet kapcsoltunk. A komponensek vándorlása szabad szemmel követhető volt, mivel színes (fikoeritrin), ill. festett fehérjét (brómfenolkékkel festett szérumalbumin) használtunk mintaként. A koncentrálás és elválasztás lépéseit digitális fényképek segítségével dokumentáltuk.

4.2 Akrilamid-alapú polimerek fehérjék szelektív felismerésére

4.2.1 Szelektív polimerek szintézise

A szelektív polimerek szintéziséhez semleges monomereket, akrilamidot (Bio-Rad Laboratories) és metakrilamidot (Fluka); keresztkötőként pedig *N,N'*-metilén-bisz-akrilamidot és piperazin-diakrilamidot (Bio-Rad Laboratories) használtunk. A polimeroldat a templátként használt fehérjét (β-galaktozidáz, hemoglobin) is tartalmazta. A gyökös mechanizmusú polimerizációhoz katalizátorként ammónium-perszulfátot (APS), iniciátorként *N,N,N',N'*-tetrametil-etiléndiamint (TEMED) (Bio-Rad Laboratories) alkalmaztunk.

A szelektív poliakrilamid gélt 2-5 ml térfogatban, üvegcsőben készítettük. A kialakult gélt aztán különböző lyukméretű (60 és 100 lyuk/cm^2) hálókon préseltük át, így 0.1-0.3 mm átmérőjű gélgranulákat kaptunk.

A szelektív monolitot közvetlenül 6 mm belső átmérőjű kromatográfiás oszlopban (Plexiglas) polimerizáltattuk.

4.2.2 Templát fehérjék eltávolítása a polimerből

A templátként használt fehérjék eltávolítására több módszer ismeretes az irodalomban [Hjertén *et al*., 1997; Tong *et al*., 2001; Bacskay *et al*., 2006; Takátsy *et al*., 2007]. A poliakrilamid gélgranulák esetén az elektroforetikus módszer mellett döntöttünk, a monolit oszlop tisztítását nátrium-dodecilszulfát (SDS) tartalmú savas pufferrel végeztük.

<u>SDS elektroforézis</u>

A gélgranulákat az alján dialízismembránnal lezárt üvegcsövekbe (6 mm átmérő) töltöttük. A membránt kis lyukakkal láttuk el, hogy a fehérje-SDS micellák számára átjárható legyen. A csöveket vertikális elektroforézis készülékbe helyeztük. Az elektroforézist 0.05 M SDS-t tartalmazó 0.05 M Tris-HCl pufferben (pH 8.5) végeztük (70-200 V, 12-20 mA) ~16 órán át. (Az elektródreakciók miatt változhat a pufferek pH-ja a elektrolittartályokban, ezért a puffert időnként frissítettük, ha a pH érték egy egységnél jobban eltolódott.) Az SDS eltávolítása érdekében a puffert 0.05 M Tris-HCl pufferre (pH 8.5) cseréltük ki, és az előbbiekkel azonos körülmények között folytattuk az elektroforézist addig, míg az SDS teljes mennyiségét el nem távolítottuk. (KCl hozzáadásával ellenőriztük az

SDS jelenlétét. A kálium-dodecilszulfát vízben rosszul oldódó fehér csapadék.) Az enzim eltávolításának hatékonyságát Coommassie-kék festéssel ellenőriztük. [Hjertén *et al.,* 2008]

Mosás SDS tartalmú pufferrel

A monolit oszlopot (6 mm átmérőjű, 9 cm hosszú) pumpa (Consta Metric 3200 P/F solvent delivery system) segítségével mostuk az alábbiak szerint:

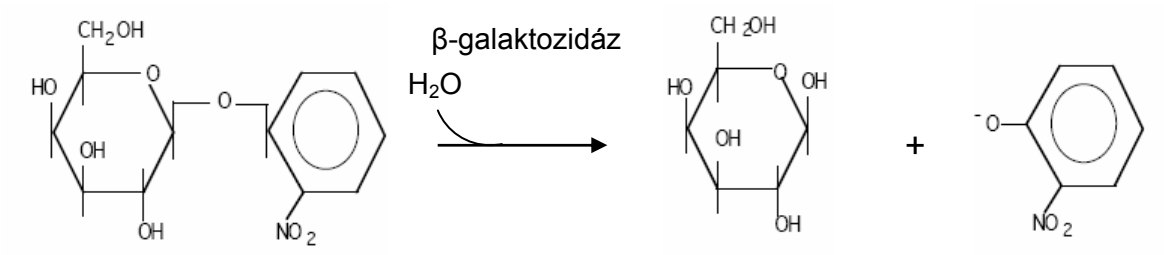
1. 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 6.8), (2 oszlop térfogat) - nem szelektíven kötött hemoglobin eltávolítása
2. 5 % (w/v) nátrium-dodecilszulfátot tartalmazó 10 %-os (v/v) ecetsav oldattal, (3 oszlop térfogat) – szelektíven kötött hemoglobin eltávolítása
3. 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 6.8), - SDS teljes mennyiségének eltávolítása. [Rezeli *et al.,* 2006]

4.2.3 Szelektív polimerek működésének ellenőrzése

A polimerek működésének, szelektivitásának ellenőrzését közvetett módszerekkel végeztük el.

Enzimaktivitás ellenőrzése

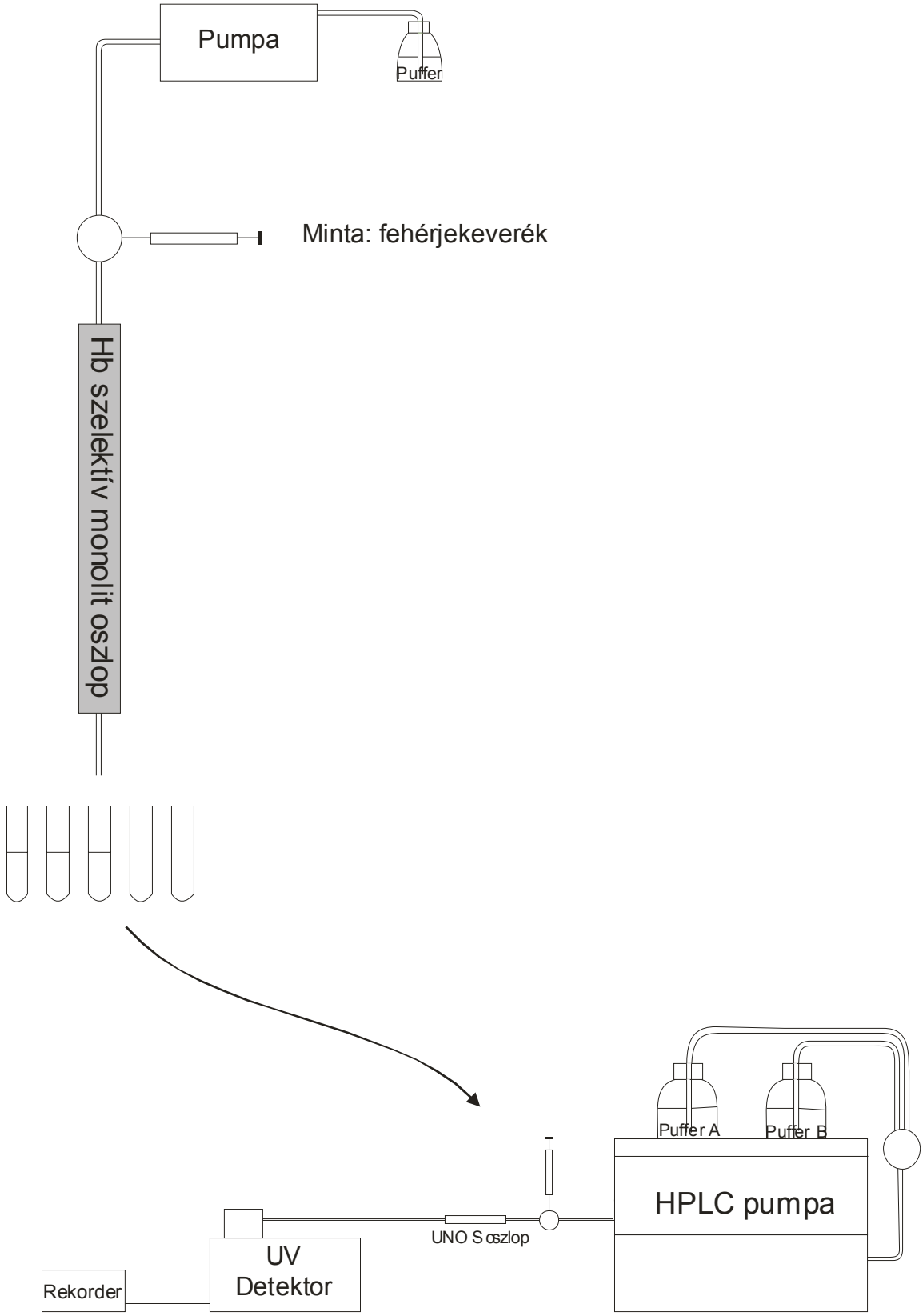
A β-galaktozidáz enzim működésének ellenőrzéséhez *o*-nitrofenil-β-D galaktopiranozid szubsztátot (Sigma) használtunk. Az enzim a következő reakciót katalizálja:



o-nitrofenil-β-D galaktopiranozid D-galaktóz *o*-nitrofenol

színtelen *sárga*

A sárga szín (*o*-nitrofenol) megjelenése jelzi az aktív enzim jelenlétét.



5. ábra
Monolit oszlop szelektivitásának ellenőrzéséhez használt kísérleti berendezés vázlata

Ioncserélő kromatográfia

A monolit oszlopra fehérjekeveréket injektáltunk, majd frakciókat gyűjtve eluáltuk. A szelektív monolit oszlopról eluált frakciók fehérje-összetételét kationcserélő kromatográfiával határoztuk meg. (A *kísérleti berendezés vázlata az 5. ábrán látható.*) 50 µL-nyi mennyiséget injektáltunk az egyes frakciókból UNO S (Bio-Rad Laboratories) kationcserélő oszlopra. Grádienselúciót végeztünk Pharmacia LKB Model 2248 pumpa, 2152 kontroller és mixer segítségével, a detektálás 220 nm-en történt (SPECTRA 100 variable wavelength detector) és az adatokat LKB Model 2210 rekorderrel rögzítettük. [Rezeli *et al.,* 2006]

A szelektív polimerek szintézisével párhuzamosan, azokkal azonos összetételű, templát fehérjét nem tartalmazó kontrol polimereket is készítettünk. A kontrol polimereket a szelektív polimerekkel megegyező módon kezeltük minden esetben.

5 Eredmények

5.1 Mintakoncentrálás protonálható csoportot tartalmazó poliakrilamid gélben

A savas karakterű fehérjék koncentrálására és elválasztására alkalmas poliakrilamid gélt készítettünk protonálható csoportot tartalmazó monomer (2-morfolino-etilakrilamid) felhasználásával. A koncentráláshoz és az elektroforetikus elválasztáshoz komplex gélrendszert használtunk.

A gélrendszer a következő rétegekből épült fel (6. ábra):

- Szeparáló gél (I jelű gél)

  T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél.

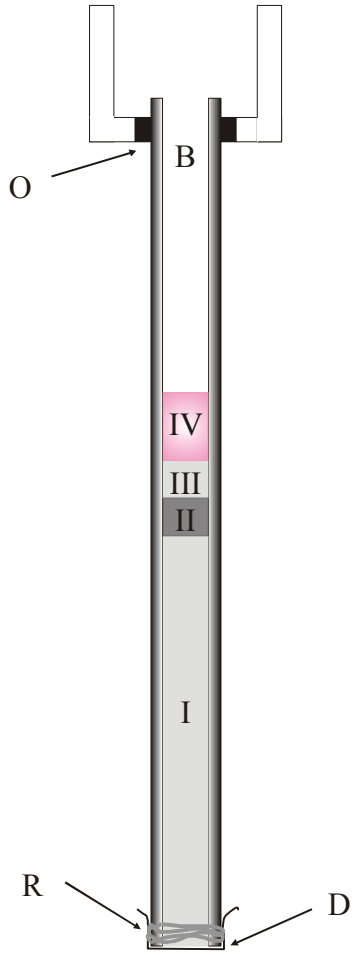
- Koncentráló gél (II jelű gél)

  A teljes monomerkoncentráció (T) és a keresztkötő koncentrációja (C) azonos volt a szeparáló gélnél használtakkal, vagyis T3 C3. A gélhez akrilamidon kívül 2-morfolino-etilakrilamid monomert (*Acrylamido buffer pK 6.2*) használtunk, a két monomer mólaránya 10:1 volt. A polimerizációhoz használt körülmények megegyeztek a szeparáló gélnél használtakkal. A TEMED és APS hozzáadása után a monomeroldatot azonnal, óvatosan a szeparáló gél felszínére rétegeztük. A zóna hossza ~5 mm volt.

- Védő gélréteg (III jelű gél)

  A réteg T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél, amelyet a szeparáló géllel azonos módon készítettünk. A polimerizáció megkezdődése előtt a monomeroldatot óvatosan a koncentráló gél felszínére rétegeztük. A zóna hossza ~5 mm volt.

Az így egymásra rétegzett monomeroldatok együtt polimerizálódtak, nem alakult ki a különböző összetételű zónák között fizikai határvonal [Rezeli *et al.*, 2008].

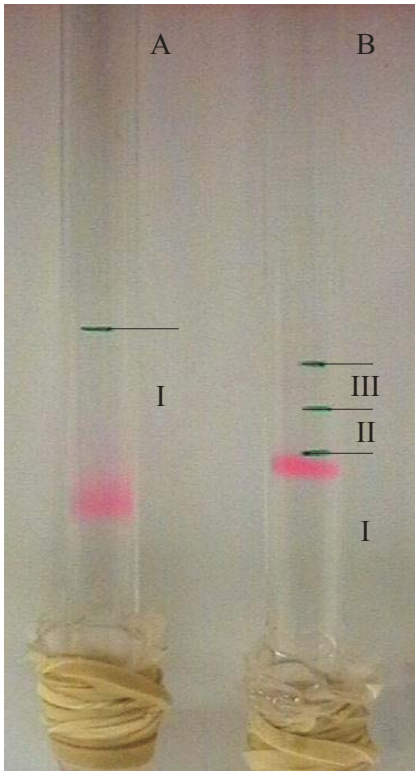


6. ábra
Koncentrálásra és elválasztásra használt gélrendszer.

I: szeparáló gél (hossz: ~50 mm, i.d.: 5 mm); **II**: koncentráló gél (hossz: ~5 mm); **III**: védő gélréteg (hossz: ~5 mm); **IV**: minta; **B**: puffer; **O**: O-gyűrű; **D**: dialízis membrán; **R**: gumi gyűrű

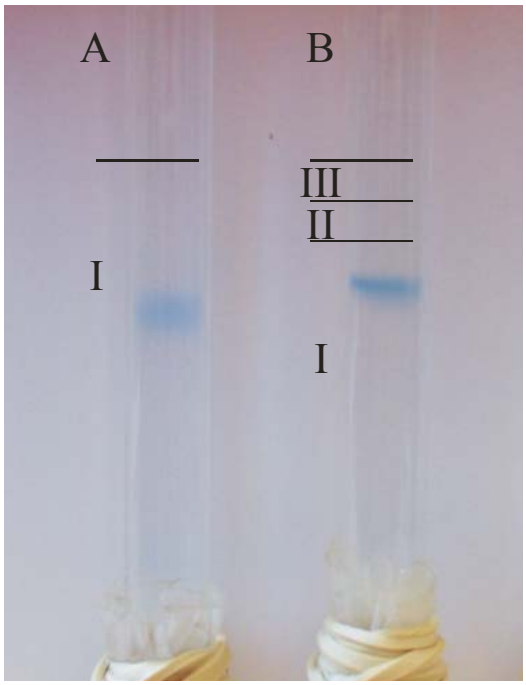
A koncentráló módszer lényege, hogy a negatív töltésű minta a feszültségkülönbség hatására vándorolni kezd a gélben egészen addig, amíg el nem éri az alacsony pH-n (pH 5.4) pozitív töltésű koncentráló gélt (II jelű gél az 6. ábrán). Itt az elektrosztatikus kölcsönhatásnak köszönhetően adszorbeálódik és ezáltal koncentrálódik. A dúsításhoz használt puffert (20 mM nátrium-foszfát puffer, pH 5.4) magasabb pH-jú pufferre (20 mM nátrium-foszfát puffer, pH 7.7) cserélve a koncentráló gél „elengedi” a megkötött fehérjét (mivel ezen a pH-n a gél elveszti töltését) és a koncentrált, éles zóna tovább vándorol a semleges poliakrilamid gélben az anód felé.

A módszer bemutatásához színes fehérjéket választottunk, így szabad szemmel is látható a különbség a koncentrálás nélküli és a koncentrált zónák között. A 7. ábrán fikoeritrinnel, a 8. ábrán pedig brómfenolkékkel megfestett albuminnal végzett kísérlet eredménye látható. Mindkét képen jól látható, hogy a fehérje zóna a koncentrálást követően (B jelű csövek) sokkal keskenyebb és élesebb volt, mint a kontrol csőben (A jelű csövek) koncentrálás nélkül vándorló zóna.



7. ábra
Fikoeritrin elektroforézise poliakrilamid gélben koncentrálás nélkül (A) és on-line mintakoncentrálást követően (B)

A: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél;
B: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél (I réteg), 5 mm vastagságú, pozitívan töltött, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (II réteg), és 5 mm vastagságú, semleges, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (III réteg) fedve
Minta: 150 µl 2.5 % szacharózt tartalmazó fikoeritrin oldat; Körülmények: *Előfuttatás*: 25 V/2 mA, 30 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4; *Koncentrálás*: 25 V/2 mA, 15 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4. *Elválasztás*: 50 V/4 mA, 45 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 7.7.



8. ábra
Brómfenolkékkel festett szérum albumin elektroforézise poliakrilamid gélben koncentrálás nélkül (A) és on-line mintakoncentrálást követően (B)

A: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél;
B: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél (I réteg), 5 mm vastagságú, pozitívan töltött, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (II réteg), és 5 mm vastagságú, semleges, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (III réteg) fedve
Minta: 100 µl 2.5 % szacharózt tartalmazó brómfenolkékkel festett albumin oldat;
Körülmények: *Előfuttatás*: 25 V/2 mA, 30 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4; *Koncentrálás*: 25 V/2 mA, 15 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4. *Elválasztás*: 50 V/4 mA, 15 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 7.7.

5.2 Megújítható enzimreaktor szelektív poliakrilamid gélgranulákból

β-galaktozidáz szelektív felismerésére és megkötésére képes poliakrilamid gélt készítettünk molekuláris lenyomatkészítési technikával. A gél által megkötött fehérjét közvetett módon, az enzimaktivitás ellenőrzésével mutattuk ki.

A gél szintéziséhez, mely β-galaktozidáz jelenlétében történt, akrilamidot és *N,N'*-metilén-bisz-akrilamidot használtunk. A kész polimert 0.1-0.3 mm átmérőjű granulákká aprítottunk fel. Az így kapott ún. mesterséges gél antitestekből eltávolítottuk a polimerizáció során templátként használt fehérjét, majd enzimmel

inkubáltuk a granulákat (a β-galaktozidáz feleslegét mosással távolítottuk el). Az így előkészített gélgranulákhoz *o*-nitrofenil-β-D galaktopiranozid szubsztrátot adtunk. Aktív enzim jelenlétében a szubsztrátból sárga színű *o*-nitrofenol keletkezik. A 9. ábra bizonyítja, hogy a szelektív gélgranulák képesek felismerni és megkötni azt az enzimet, amely jelen volt a polimerizációnál; valamint, hogy az így megkötött enzim megőrzi aktivitását, vagyis képes a megfelelő szubsztrátmolekula átalakítására.

9.ábra
Immobilizált β-galaktozidáz enzim aktivitásának ellenőrzése

A: β-galaktozidáz jelenlétében polimerizált poliakrilamid gél granulák elektroforetikus tisztítás után
B: β-galaktozidáz jelenlétében polimerizált poliakrilamid gél granulák elektroforetikus tisztítás után, enzimmel inkubálva
Mindkét, granulákat tartalmazó csőhöz *o*-nitrofenil-β-D galaktopiranozid szubsztrátot adtunk, a sárga szín jelzi a megkötött, aktív enzim jelenlétét.

A szelektív poliakrilamid gélgranulákat Pasteur-pipettába töltöttük, így készítettünk kisnyomású rendszerben használható, regenerálható mini-enzimreaktort. Az elhasználódott enzim eltávolítását követően, ami történhet elektroforetikus úton, vagy proteázok alkalmazásával, aktív enzimmel inkubálva megújítható a reaktor.

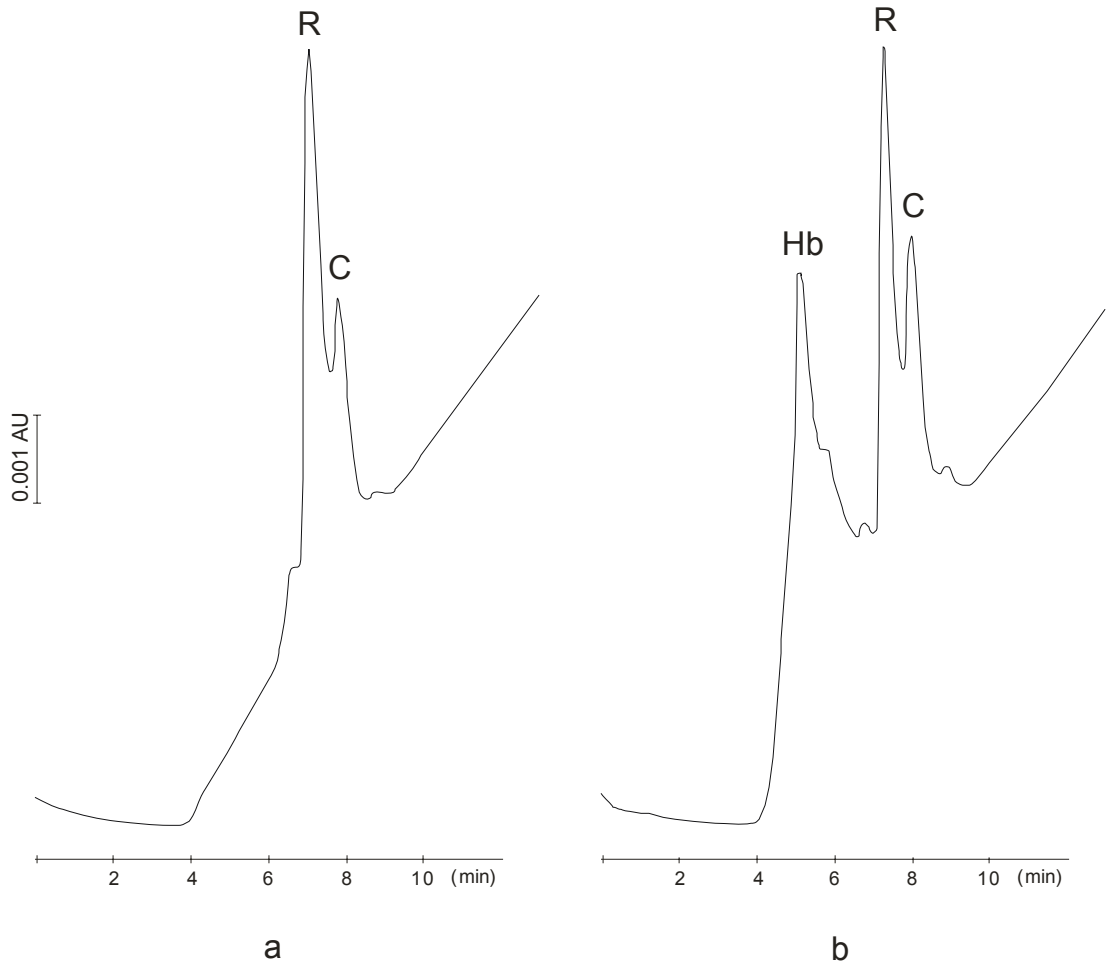
5.3 Hemoglobint szelektíven felismerő/megkötő monolit oszlop

Molekuláris lenyomatkészítési technikával hemoglobin felismerésére és megkötésére képes monolit töltetet állítottunk elő. A monolit szelektivitásának ellenőrzését indirekt módon, ioncserélő kromatográfia alkalmazásával végeztük.

Metakrilamid és piperazin-diakrilamid, ammónium-szulfát jelenlétében történő polimerizációjával kétféle monolit oszlopot készítettünk. Az egyik esetben a mononomeroldat hemoglobint is tartalmazott (szelektív oszlop), a másik esetben a polimerképződés templát nélkül ment végbe (kontrol oszlop). A templátként használt fehérje eltávolítása után, mely a 4.2.2 fejezetben leírtak szerint történt (a kontrol oszlopot azonos módon kezeltük), ellenőriztük az oszlop szelektivitását. Azonos térfogatú (20 µl) és összetételű fehérjekeveréket (hemoglobin (*4.35 mg/ml*), citokróm c (*1.43 mg/ml*), ribonukleáz A (*1.43 mg/ml*)) injektáltunk mind a szelektív, mind a kontrol oszlopra; majd 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 6.8) eluáltuk és 1 mL-es frakciókat gyűjtöttünk. Az egyes oszlopokról származó frakciók összetételét kationcserélő kromatográfiával határoztuk meg. A 10a. ábrán a hemoglobin-szelektív oszlopról származó frakció ioncserélő kromatogramja látható, ezt összehasonlítva a 10b. ábrán látható kromatogrammal (kontrol oszlopról származó frakció ioncserélő kromatogramja) egyértelműen megállapítható, hogy a hemoglobin jelenlétében polimerizált töltet képes felismerni és megkötni a hemoglobint, míg a másik két fehérjét (citokróm *c*, ribonukleáz A) nem. A kontrol oszlopnak ezzel szemben nincs szelektív tulajdonsága, hiszen mindhárom injektált fehérje csúcsa megjelent a kromatogramon, tehát nem adszorbeálódtak az oszlopon.

Egymást követő mintainjektálással (a megkötődött hemoglobin eltávolítása nélkül) vizsgáltuk a szelektív monolit oszlop kapacitását. A 11. ábrán az egymást követő injektálások után gyűjtött frakciók ioncserélő kromatogramjai láthatók. A második injektálással telítődtek az oszlop hemoglobin kötőhelyei, ezt támasztja alá az, hogy a két másik fehérjecsúcs mellett (citokróm *c*, ribonukleáz A) egy kisméretű hemoglobin csúcs is megjelent a kromatogramon (11b. ábra). Az ezt követő injektálások után kapott hemoglobin csúcsok területe már közel azonos volt (11c. ábra), vagyis a hemoglobin áthaladt az oszlopon anélkül, hogy megkötődött volna. Az oszlop kötőkapacitását a kromatogramok alapján, a hemoglobin csúcsok

területeinek arányából számítottuk ki. Az oszlop számított kapacitása 60-65 µg hemoglobin/mL monolit.



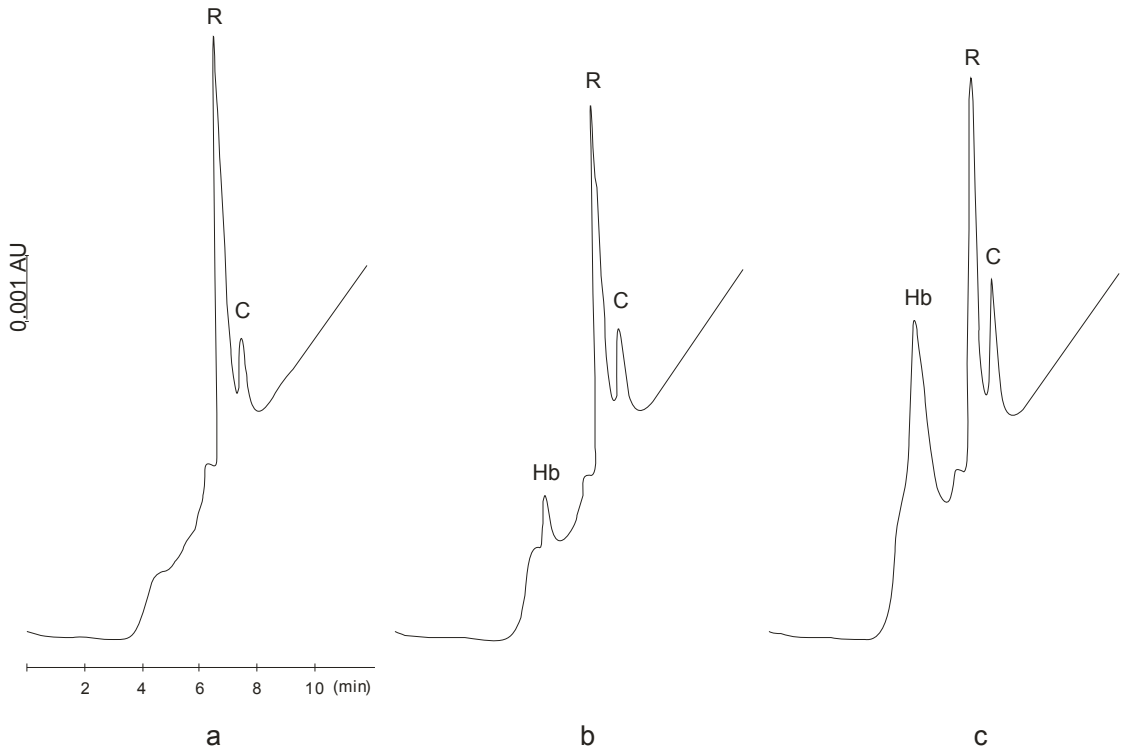
10. ábra
Monolit oszlopokról származó frakciók kationcserélő kromatogramjai

a. hemoglobin-szelektív oszlopról származó frakció kromatogramja;
b. kontrol oszlopról származó frakció kromatogramja.

A hemoglobin-szelektív és a kontrol oszlopra injektált minta: 20 µl fehérjekeverék (hemoglobin 4.35 mg/ml, citokróm *c* 1.43 mg/ml, ribonukleáz A 1.43 mg/ml)

Minta: 50 µl a monolit oszlopról származó fehérjét tartalmazó frakcióból
Körülmények: 10 perces grádienselúció, 0-100 % B puffer (0.5 M NaCl-t tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát puffer, pH 6.8) az A pufferben (10 mM nátrium-foszfát puffer, pH 6.8). Áramlási sebesség: 0.5 mL/perc. Detektálás: 220 nm

C: citokróm *c*; R: ribonukleáz A; Hb: hemoglobin



11. ábra
Hemoglobin-szelektív monolitról származó frakciók kationcserélő kromatogramjai

a. hemoglobin-szelektív oszlopról származó frakció kromatogramja;
b,c. szelektív oszlopról származó frakciók kromatogramja (egymást követő injektálások után).

A hemoglobin-szelektív oszlopra injektált minta: 20 µl fehérjekeverék (hemoglobin 4.35 mg/ml, citokróm *c* 1.43 mg/ml, ribonukleáz A 1.43 mg/ml)

Minta: 50 µl a monolit oszlopról származó fehérjét tartalmazó frakcióból
Körülmények: 10 perces grádienselúció, 0-100 % B puffer (0.5 M NaCl-t tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát puffer, pH 6.8) az A pufferben (10 mM nátrium-foszfát puffer, pH 6.8). Áramlási sebesség: 0.5 mL/perc. Detektálás: 220 nm

C: citokróm *c*; R: ribonukleáz A; Hb: hemoglobin

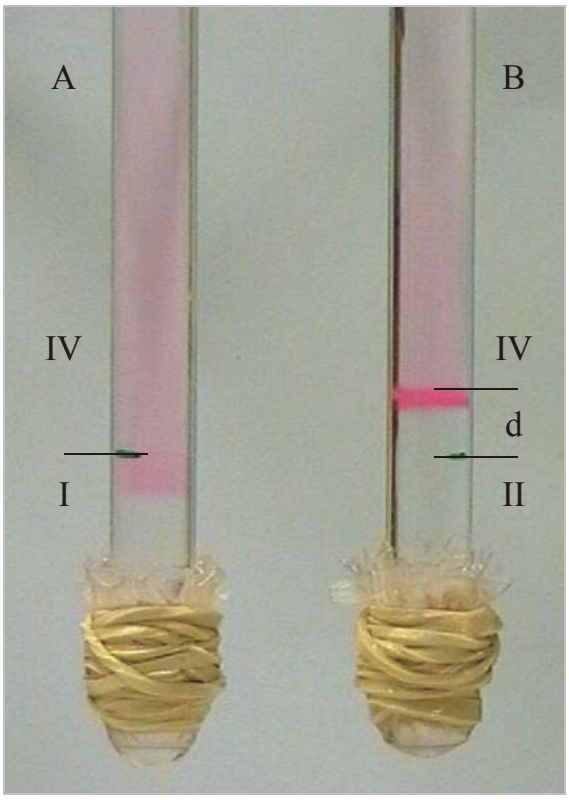
6 Eredmények megvitatása

6.1 Mintakoncentrálás protonálható csoportot tartalmazó poliakrilamid gélben

Olyan koncentráló módszert dolgoztunk ki, amelynek a lényege a fehérjék megkötése elektrosztatikus kölcsönhatás révén. Az eljárást savas karakterű fehérjék poliakrilamid gél elektroforézisében alkalmaztuk. A koncentráláshoz használt gél bázikus csoportokat tartalmazott, ezáltal gyenge anioncserélőként működött. A monomerként használt gyenge bázist (2-morfolino-etilakrilamid) úgy kellett megválasztanunk, hogy a pK értéke magasabb legyen, mint a mintafehérjék (fikoeritrin, albumin) izoelektromos pontja. Az alkalmazott puffer pH-jának megfelelő megválasztásával, ill. változtatásával értük el a mintafehérjék koncentrálását és ezt követően az elválasztásukat.

A módszer elve a következőképpen foglalható össze:

A koncentráló lépés alacsony pH-n történik, ekkor a gél bázikus csoportjainak döntő többsége protonált formában van jelen, míg a fehérjék nettó töltése negatív. Az anód felé vándorló fehérjék a koncentráló gélbe jutva lelassulnak és megkötődnek az erős elektrosztatikus vonzóerő következtében. Ez a jelenség látható a 12. ábrán. Míg a semleges poliakrilamid gélben (A cső) vándorol a fikoeritrin zóna, addig a pozitívan töltött csoportokat tartalmazó gél (B cső) megköti a fikoeritrint. A pH emelkedésével a pozitívan töltött, gyengén bázikus csoportok aránya csökken. A monomer pK értékénél egy egységgel magasabb pH-n már nagyon kicsi a protonált csoportok aránya, tehát magas pH-n megtörténik a fehérjemolekulák deszorpciója, és a koncentrált zóna tovább vándorolhat a semleges poliakrilamid gélben az anód felé.



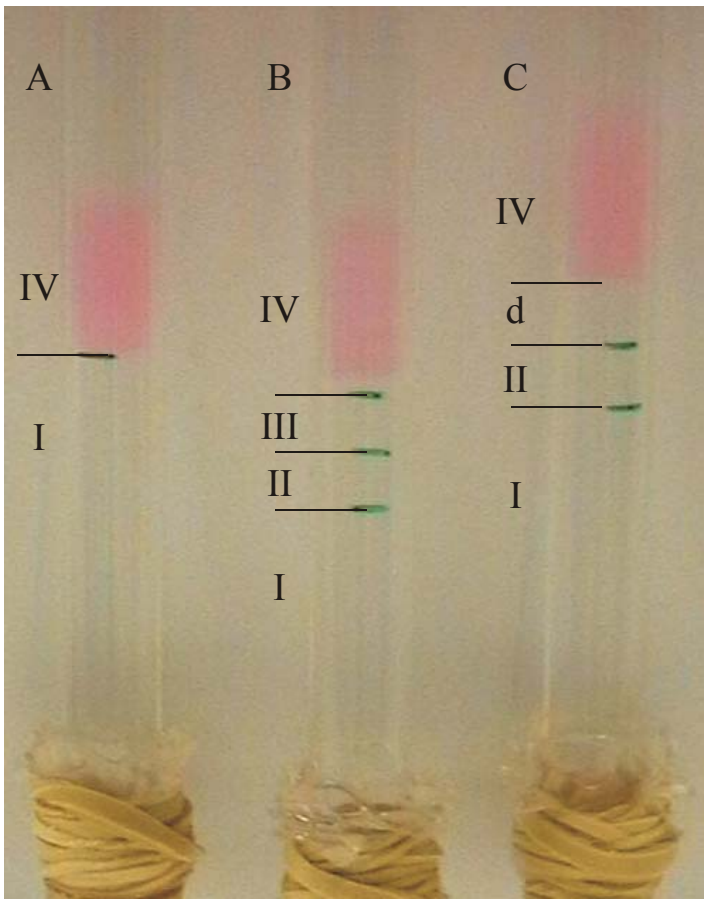
12.ábra
Fikoeritrin elektroforézise poliakrilamid gélben (A) és pozitív csoportokat tartalmazó poliakrilamid gélben (B)

A: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél; **B**: T3 C3 összetételű pozitívan töltött poliakrilamid gél, Minta: 500 µl 2.5 % szacharózt tartalmazó fikoeritrin oldat; Körülmények: *Előfuttatás*: 25 V/2 mA, 30 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4; *Koncentrálás*: 25 V/2 mA, 5 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4

A semleges poliakrilamid gél önmagában is rendelkezik koncentráló hatással. A molekulaszűrő tulajdonságának köszönhetően a fehérjék sebessége kisebb a gélben, mint pufferben [Hjertén, 1963]. Ez a hatás annál jelentősebb, minél nagyobb a gél monomer koncentrációja (T%) ill. a fehérjék mérete. Mivel célunk egy új koncentráló módszer bemutatása volt, az egyéb koncentráló hatásokat megpróbáltuk kiküszöbölni, illetve minimalizálni. Kísérleteinkhez ezért nagy pórusméretű, T3 C3 összetételű géleket használtunk.

A töltéssel rendelkező, alacsony monomer koncentrációjú poliakrilamid gélek hátránya, hogy a puffer ionerősségének változtatására jelentős térfogatváltozással reagálnak, kitágulnak vagy összehúzódnak. A töltéssel rendelkező gélben kialakuló elektroozmotikus áramlás fokozza a gél tágulását, ami olyan mértékű is lehet, hogy a gél széttöredezik. A 12. és a 13. ábrán d-vel jelöltük a koncentráló

gél térfogatváltozását az előfuttatás (ill. a koncentrálási lépés) során. Ennek a tágulásnak és az esetleges széttöredezésnek a megakadályozására egy vékony (néhány mm-es), semleges poliakrilamidból álló védő gélréteget alkalmaztunk (III jelű gél a 6. ábrán), amelyet a koncentráló gél fölé rétegeztünk. Az egyes monomeroldatokat, még a polimerizáció teljes lejátszódása előtt rétegeztük egymásra, így a különböző összetételű rétegek kémiailag kapcsolódtak egymáshoz, fizikailag teljesen egységes gélt kialakítva. Az eljárás hatékonyságát jól mutatja a 13. ábra. Az ilyen védőréteggel ellátott csövekben az előfuttatás és a koncentráló lépés alatt a gél tágulása minimális volt.



13. ábra
Különböző felépítésű gélek térfogatváltozása az előfuttatás során

A: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél; **B**: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél (I réteg), 5 mm vastagságú, pozitívan töltött, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (II réteg), és 5 mm vastagságú, semleges, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (III réteg) fedve; **C**: T3 C3 összetételű semleges poliakrilamid gél (I réteg), 5 mm vastagságú, pozitívan töltött, T3 C3 összetételű poliakrilamid géllel (II réteg)fedve; **d**: a gél tágulása
Minta: 150 µl 2.5 % szacharózt tartalmazó fikoeritrin oldat; Körülmények: *Előfuttatás*: 25 V/2 mA, 30 min; Puffer: 0.02 M nátrium-foszfát puffer, pH 5.4

Koncentráló eljárásunk bemutatásához alacsony monomerkoncentrációjú, nagy pórusméretű géleket használtunk, a gyakorlatban azonban előnyösebb lehet a kisebb pórusméretű gélek alkalmazása. A magasabb monomerkoncentrációval rendelkező poliakrilamid gélek mechanikailag ellenállóbbak, jelentősebb koncentráló hatással rendelkeznek, mint a nagy pórusméretű gélek és molekulaszűrő tulajdonságaiknak köszönhetően a fehérjék elválasztása is hatékonyabb (nagyobb felbontás) ezekben a gélekben.

Módszerünk kromatográfiás analógját Hjertén és munkacsoportja dolgozta ki [Kochegarova *et al.*]. Monolit töltetük szintéziséhez gyengén savas, ill. bázikus tulajdonságú akrilamid-származékokat (*Acrylamido buffer*) használtak fel. A kromatográfiás oszlop, csakúgy, mint az általunk készített elektroforetikus gélrendszer, képes volt híg fehérjeminták koncentrálására és elválasztására a koncentrálás és az eluálás során alkalmazott puffer pH-jának megváltoztatásával. A technika előnye, hogy mindkét rendszer közvetlenül kapcsolható tömegspektrométerhez (kis ionerősségű, illékony pufferek használatakor). A puffer ionerősségének növelésével történő fehérjedeszorpció, mely az ioncserélő mechanizmuson alapuló koncentráló módszerek esetén általánosan elterjedt, kedvezőtlenül hat az elektroforetikus elválasztásra a Joule-hő képződés miatt. Bemutatott módszerünknek, melyben a deszorpció pH változtatással történik, nincs ilyen hátrányos hatása.

Az általunk kísérletesen igazolt módszer savas karakterű fehérjék koncentrálására alkalmas, de ugyanezen elv alapján a bázikus fehérjék dúsítása is megvalósítható. Ebben az esetben a koncentráló gélnek gyengén savas csoportokat kell tartalmaznia, melyek magas pH-n deprotonálódnak és így elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki a pozitív töltésű fehérjemolekulákkal, megkötik azokat. Alacsonyabb pH-n viszont csökken a gél negatív töltésű csoportjainak az aránya, így az „elengedi” a fehérjéket, és a koncentrálódott fehérjezóna tovább vándorolhat a katód irányába.

A különböző pK értékű, gyengén savas vagy bázikus csoportot tartalmazó akrilamid-származékok (melyeket immobilizát pH gradiens kialakítására fejlesztettek ki [Bjellqvist *et al.,* 1982]) nagy száma lehetővé teszi a módszer széleskörű alkalmazását a megfelelő pufferrendszer alkalmazása mellett.

6.2 Szelektív polimerek molekuláris lenyomatkészítéssel

Mesterséges polimer antitesteket készítettünk különböző fehérjék ellen molekuláris lenyomatkészítéssel, melynek technikáját elsőként Hjertén és csoportja alkalmazta [Liao *et al*., 1996c]. A szintézis lényege, hogy a lenyomatkészítés során a polimerhez funkcionális monomerek helyett, melyek töltésüknél fogva részt vehetnek nem specifikus kölcsönhatások kialakításában és ezáltal csökkenthetik a polimer szelektivitását, semleges monomereket, például akrilamidot és keresztkötőként bisz-akrilamidot használunk. A semleges, hidrofil poliakrilamid gél nem specifikus kölcsönhatásai fehérjékkel elhanyagolhatóak. A szelektív felismerés (1) az antigén és a lenyomat közti pontos illeszkedésen, valamint (2) az antigén és a polimer között kialakuló kötések számán és típusán alapul. A módszer univerzális, hiszen eredetileg fehérjékre fejlesztették ki, de később minimális változtatásokkal (pl. a templát eltávolításának módja) baktériumokra [Bacskay *et* al., 2006] és vírusokra [Takátsy *et* al., 2006b] is sikeresen alkalmazták. Fontos hangsúlyozni azt is, hogy a legtöbb lenyomatkészítési technikával ellentétben esetünkben a polimer szintézise vizes közegben történik, ami fehérjék használatakor különösen fontos és előnyös.

A korábbi publikációk két lehetséges alkalmazási területét mutatták be az ilyen technikával készített mesterséges antitesteknek. Egy vagy több kiválasztott komponens eltávolítása egy komplex keverékből [Liao *et al*., 1996c; Hjertén *et al*., 1997], illetve az „antigén/gél antitest”-komplex elektroforetikus analízisével extrém kis konformációs különbségek kimutatása [Takátsy *et* al., 2006a; 2006b; Bacskay *et* al., 2006].

Munkánk során a szelektív polimereket további két új területen alkalmaztuk.

1. Megmutattuk, hogy a mesterséges poliakrilamid gél antitestek felhasználhatók enzimreaktorok készítéséhez.
2. A szelektív gél technikát a monolit készítéssel ötvözve, egy lépésben készítettünk fehérjét szelektíven felismerő és megkötő kromatográfiás oszlopot.

6.2.1 Megújítható enzimreaktor szelektív poliakrilamid gélgranulákból

Mesterséges, poliakrilamid gél antitesteket készítettünk akrilamid és bisz-akrilamid felhasználásával, melyhez templátként β-galaktozidáz enzimet

használtunk. Korábbi eredmények alapján tudtuk, hogy szelektív poliakrilamid gélek esetén a templátmolekula (enzim) és a gél között gyenge másodrendű kötések, elsősorban hidrogén-kötés, dipól-dipól kölcsönhatás és apoláris kölcsönhatás alakulnak ki [Hjertén *et al*., 1997, Tong *et al*., 2001]. Az „antigén/gél antitest" komplexek korábbi elektroforetikus vizsgálatai azt mutatták, hogy a kialakult komplexek stabilak, vagyis a szelektív gél erősen köti a megfelelő templát molekulát [Takátsy *et* al., 2006a; 2006b; 2007; Bacskay *et* al., 2006]. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a kötések száma elég nagy ahhoz, hogy a kapcsolódás az enzim és a lenyomata között a gélben stabil legyen, ugyanakkor az enzim megőrizze működőképességét. A β-galaktozidáz enzimmel inkubált gélgranulákhoz színtelen, *o*-nitrofenil-β-D galaktopiranozid szubsztrátot adva, azonnal megjelent a sárga színű *o*-nitrofenol termék, ami bizonyítja az aktív enzim jelenlétét a gélgranulákban, ill. azok felszínén (9. ábra).

A szelektív poliakrilamid gélgranulákat oszloptöltetként használva enzimreaktort készíthetünk. Esetünkben a 0.1-0.3 mm átmérőjű granulákkal megtöltött Pasteur-pipetta töltötte be az enzimreaktor szerepét, ennek segítségével vizsgáltuk a szelektív gél alkalmazhatóságát áramlásos rendszerben. Kísérleteink azt mutatták, hogy az immobilizált enzim jól működik oszlopos rendszerben is, ugyanakkor a lágy, poliakrilamid gélgranulák nem bizonyultak ideális oszloptöltetnek. A T6 C5 összetételű poliakrilamid gél nem elég merev, az ilyen gélgranulákkal töltött oszlop ellenállása nagy, ezért csak alacsony áramlási sebességet érhettünk el. Nagyobb nyomás alkalmazásakor pedig deformálódnak a gélgranulák, és ez negatívan befolyásolhatja azok szelektív tulajdonságait. Az oszlop (reaktor) kromatográfiás tulajdonságai (áramlási sebesség, ellenállás, stb.) javíthatók. Ennek egyik módja, ha agaróz gyöngyök pórusaiban hozzuk létre a szelektív poliakrilamid gélt [Tong *et al*., 2001] és ezt használjuk oszloptöltetként. Az agaróz gél nagy pórusmérettel rendelkezik, rigid, biokompatibilis, nem-specifikus kölcsönhatásai fehérjékkel elhanyagolhatóak, tehát amellett, hogy javítja az oszlop áramlási tulajdonságait, nem befolyásolja a szelektivitását. A másik lehetőség az enzimreaktor kromatográfiás tulajdonságainak javítására és egyúttal a szintézis egyszerűsítésére szelektív monolit alkalmazása gélgranulák helyett. A monolitok a töltetes oszlopokkal szemben egy lépésben, az oszlopban készíthetők el, kémiailag és mechanikailag egyaránt stabilak és kis ellenállásuk

miatt alacsony nyomás alkalmazásával is nagy áramlási sebességet érhetünk el használatukkal.

Mivel az enzim reverzibilis kötésekkel kapcsolódik a polimerhez, az enzimreaktor regenerálható, melynek első lépése, az enzim eltávolítása a gélből. Különböző módszereket alkalmaztunk a megkötött enzim eltávolítására, ezek között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. Az SDS tartalmú pufferrel történő mosás, illetve a proteázok (tripszin, pepszin) használata egyszerűbb, mint az elektroforetikus módszer, mert ezekben az esetekben nincs szükség a reaktor (Pasteur pipetta) újratöltésére, azaz a töltet az oszlopban regenerálható. A fehérje eltávolítása után a granulákat a megfelelő enzim oldatával inkubálva, azok szelektíven felismerik és megkötik azt, vagyis regenerálódnak. A szelektív gél-alapú enzimreaktorok előnye más regenerálható reaktorokkal szemben, hogy akár tisztítatlan enzimet is használhatunk a regeneráláshoz, ugyanis a nagy szelektivitásuknak köszönhetően, a gélszemcsék csak azt az enzimet kötik meg, amely jelen volt a polimerizációnál, más fehérjéket, enzimeket nem.

Kísérleteinkben β-galaktozidáz enzimet használtunk, de várhatóan molekuláris lenyomatkészítési technikánkkal más enzimek felismerésére és megkötésére alkalmas poliakrilamid gél antitestek is készíthetők. Amennyiben sikerül kiküszöbölni a lágy poliakrilamid gél előnytelen kromatográfiás tulajdonságait az imprinting technikával készített mesterséges antitestek jól használhatók megújítható enzimreaktorok tölteteként.

6.2.2 Hemoglobint szelektíven felismerő/megkötő monolit oszlop

A szelektív monolit készítéséhez semleges monomereket, metakrilamidot és piperazin-diakrilamidot használtunk fel. A polimerizáció vizes közegben, gyökös mechanizmusú láncreakció során ment végbe ammónium-szulfát, mint porogén és hemoglobin, mint templát jelenlétében (a kontrol esetén hemoglobin nélkül). A kis koncentrációban jelenlévő só fokozza a hidrofób kölcsönhatást, ezáltal előidézi a növekvő polimerláncok aggregációját. Az aggregátumok között kialakuló csatornák teszik lehetővé, a folyadéktranszportot a polimeren keresztül, vagyis a monolit kromatográfiás alkalmazását.

A poliakrilamid géleken nyomáskülönbség segítségével nem lehet folyadékot keresztüláramoltatni, ezért van szükség a szelektív poliakrilamid gélek

kromatográfiás alkalmazása előtt a gél aprítására (granulálás). Az ilyen, gélgranulákkal töltött oszlopok csak kisnyomású rendszerekben használhatók. Ezzel szemben szelektív monolitunkat *in situ*, egy lépésben az oszlopban készítettük és magasnyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) rendszerben használtuk.

A templátként használt hemoglobin eltávolítására többféle módszert próbáltunk ki: (1) proteázok használatát (tripszin, pepszin), (2) polimer-tartalmú (polietilén glikol) pufferrel történő mosást és (3) SDS tartalmú savas pufferrel történő mosást. A legjobb eredményt a 4.2.2 fejezetben leírt módszerrel kaptuk (mosás 5 % (w/v) SDS-t tartalmazó 10 %-os (v/v) ecetsav oldattal). Meg kell jegyezni azonban, hogy az SDS teljes eltávolítása a folyamat egyik kritikus pontja, mert az oszlopon maradó SDS a fehérjékhez kötődve megváltoztatja azok szerkezetét és felületi töltését, ezáltal gátolja a szelektív kölcsönhatás kialakulását.

Szelektív monolitunk nem tartalmazott speciális ligandumot, amely lehetővé tette volna a mintakomponensek elválasztását; ezért azok a fehérjék, amelyek nem alakítottak ki szelektív kölcsönhatást a monolittal, egyszerre eluálódtak az oszlopról. A monolit oszlop szelektivitásának ellenőrzéséhez meg kellett határoznunk a gyűjtött frakciók fehérje összetételét, ami kationcserélő kromatográfiás módszerrel, gradienselúcióval történt. A kationcserélő kromatográfiás vizsgálatokhoz a kontrol és a szelektív oszlopról származó frakciókból azonos térfogatú mintát használtunk fel. A 10. ábra két kromatogramjának összehasonlításából egyértelműen látszik, hogy a citokróm *c* és a ribonukleáz A csúcsok mindkét kromatogram esetében közel azonos nagyságúak, a hemoglobin csúcs viszont eltűnt a szelektív oszlopról származó frakcióból. Vagyis a hemoglobin jelenlétében polimerizált monolit képes volt a hemoglobin szelektív megkötésére, míg a kontrol oszlop nem mutatott szelektív tulajdonságot.

Szelektív monolitunk kötőkapacitása kicsi (~60-65 µg/mL Hb). A polimer kapacitását a polimerizáció körülményeinek változtatásával (templát mennyisége, monomerek, iniciátor, katalizátor koncentrációja, puffer pH-ja, ionerőssége stb.) befolyásolhatjuk [Tong *et al.*, 2001]. A maximális kapacitás eléréséhez szükséges paraméterek azonban templáttól, azaz a célfehérjétől függően változnak, így ezeket minden fehérjére külön kell optimalizálni.

A monolit oszlop készítéséhez hemoglobint használtunk templátként, mert olcsó, könnyen hozzáférhető és mivel színes, szabad szemmel is nyomon követhető. Az imprinting technika alkalmazásával várhatóan más fehérjék, mint pl transzferrin, mioglobin szelektív felismerésére és megkötésére alkalmas monolit is készíthető. A monolitok előnyei, hogy bármilyen átmérőjű oszlopban (kapilláris, chip) *in situ* polimerizáltathatók, kovalensen köthetők az oszlop falához, kicsi az ellenállásuk és a felbontás független az áramlási sebességtől. Az általunk készített szelektív monolit töltetet más tulajdonságú monolitokkal (pl. ioncserélő, fordított fázisú töltet) kombinálva komplex elválasztások válnak lehetővé.

7 Összefoglalás

Elektroforetikus és kromatográfiás elválasztási rendszerekben használható, akrilamid-alapú polimereket készítettem. Az általam alkalmazott/kidolgozott technikák alapja a polimerek és a mintaként használt fehérjék között kialakuló kölcsönhatás. Ez a kölcsönhatás lehet szelektív vagy nem szelektív.

Poláris (vagy apoláris) ligandumokat tartalmazó polimerek erős elektrosztatikus (vagy hidrofób) kölcsönhatásokat képesek kialakítani a fehérjék hasonló tulajdonságú csoportjaival. Az így kialakult kötések nem szelektívek, azaz egy adott polimer, amely ilyen típusú ligandumokat tartalmaz több, különböző szerkezetű fehérje megkötésére is alkalmas.

- Gyengén bázikus csoportokat tartalmazó poliakrilamid gélt készítettem 2-morfolino-etilakrilamid monomer felhasználásával. Alacsony pH-n ezek a csoportok nagyrészt protonált formában vannak jelen, tehát erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthatnak ki negatív töltésű fehérjemolekulákkal. A pH emelésével a protonáltság, és ezáltal a kölcsönhatás erőssége is csökken, ill. megszűnik. Tehát a megfelelő pufferrendszer alkalmazása mellett a gél felhasználható híg fehérjeminták koncentrálására, amit poliakrilamid gél elektroforézis rendszerben kísérletekkel igazoltam.

Polimer és fehérje között szelektív kölcsönhatások is kialakíthatók, molekuláris lenyomatkészítési technikával (molecular imprinting). A fehérje és lenyomata között a pontos illeszkedésnek és a kialakuló gyenge, másodrendű kötéseknek köszönhetően szelektív kölcsönhatás/felismerés jön létre.

- β-galaktozidáz enzim szelektív felismerésére és megkötésére képes poliakrilamid gél granulákat használtam fel enzimreaktor készítéséhez. Az így elkészített reaktor az elhasználódott enzim eltávolítását követően, friss enzimmel inkubálva regenerálható volt. A mesterséges gél antitestek nagy szelektivitásának köszönhetően az oszlop regenerálásához nem szükséges tisztított enzim, mert a gél csak a polimerizációnál jelenlevő enzimet ismeri fel, ill. köti meg egy keverékből.

- Szelektív gél technikával hemoglobin felismerésére képes monolit töltetet készítettem metakrilamid és piperazin-diakrilamid felhasználásával. A semleges polimert *in situ,* kromatográfiás oszlopban készítettem, amelyet közvetlenül használhattam kromatográfiás célokra. (A poliakrilamid gélekkel szemben, monolitok esetén nincs szükség granulálásra.)

Munkám elsősorban arra irányult, hogy új összetételű polimereket készítsek, illetve a már ismert, speciális tulajdonságú polimerek alkalmazási területét bővítsem. Arra törekedtem, hogy a polimerek alkalmazási lehetőségeit a legegyszerűbb eszközök segítségével mutassam be. A dolgozatban ismertetett kísérletek egy-egy jelenséget hivatottak bemutatni, a módszerek optimalizálása, speciális körülményekre történő adaptálása egy további lépés.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka a Pécsi Tudományegyetem Kémia Doktori Iskolájának keretein belül, részben az Uppsalai Egyetem Biokémiai Intézetében készült, Prof. Stellan Hjertén vezetésével. Elsőként az Ő áldozatos munkáját szeretném megköszönni, amivel folyamatosan figyelemmel kísérte és segítette munkámat.

Köszönöm Prof. Kilár Ferencnek témavezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra, hogy Uppsalába mehessek, és hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Köszönettel tartozom Végvári Ákosnak a hosszú és tartalmas beszélgetésekért és a barátságáért.

Köszönet az Analitikai és Környezeti Kémia Tanszék és a Bioanalitika Intézet munkatársainak, különösen Poór Viktóriának, Páger Csillának, Bui Annamáriának, Dergez Tímeának és Bacskay Ivettnek támogatásukért és a jó hangulatért.

Végül köszönettel tartozom a családomnak és a barátaimnak, akik hittek bennem, mellettem álltak és támogattak.

Irodalomjegyzék

Armenta JM, Gu B, Humble PH, Thulin CD, Lee ML, (2005) Design and evaluation of a coupled monolithic preconcentrator-capillary zone electrophoresis system for the extraction of immunglobulin G from human serum. *J. Chromatogr. A* 1097: 171-178

Baba Y, Matsuura T, Wakamoto K, Morita Y, Nishitsu Y, Tsuhako M, (1992) Preparation of polyacrylamide-gel filled capillaries for ultrahigh resolution of polynucleotides by capillary gel-electrophoresis *Anal. Chem.* 62: 1221-1225

Bacskay I, Takátsy A, Végvári Á, Elfwing A, Ballagi-Pordány A, Kilár F, Hjertén S, (2006) Universal method for synthesis of artificial gel antibodies by the imprinting approach combined with a unique electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses and cells (Bacteria). III. Gel Antibodies against Cells (Bacteria). *Electrophoresis* 27: 4682-4687

Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W, (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6: 317-330

Bode HJ, (1976) SDS-Polyethyleneglycol electrophoresis: A possible alternative to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *FEBS Letters* 65: 56-58

Bodor R, Madajová V, Kaniansky D, Masár M, Jöhnck M, Stanislawski B, (2001) Isotachophoresis and isotachophoresis-zone electrophoresis separations of inorganic anions present in water samples on a planar chip with column-coupling separation channels and conductivity detection. *J. Chromatogr. A* 916: 155-165

Bossi A, Piletsky SA, Piletska EV, Righetti PG, Turner APF, (2001) Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition. *Anal. Chem.* 73: 5281-5286

Bossi A, Bonini F, Turner APF, Piletsky SA, (2007) Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. *Biosens. Bioelectron.* 22: 1131-1137

Caldwell KD, Axén R, Porath J, (1975) Utilization of hydrophobic interaction for formation of an enzyme reactor bed. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 613-616

Cohen AS, Paulus A, Karger BL, (1987) High-performance capillary electrophoresis using open tubes and gels. *Chromatographia* 24: 15-24

Dankova M, Kaniansky D, Fanali S, Ivanyi F, (1999) Capillary zone electrophoresis separations of enantiomers present in complex ionic

matrices with on-line isotachophoresis sample pretreatment. *J. Chromatogr. A* 838: 31-43

Davis BJ, Ornstein L, (1959) A new high resolution electrophoresis method. The Society of the Study of Blood, *N.Y. Acad. of Med.*

Enlund AM, Ericson C, Hjertén S, Westerlund D, (2001) Capillary electrochromatography of hydrophobic amines on continuous beds. *Electrophoresis* 22: 511-517

Ericson C, Liao J-L, Nakazato K, Hjertén S, (1997) Preparation of continuous beds for electrochromatography and reversed-phase liquid chromatography of low-molecular-mass compounds. *J. Chromatogr. A* 767: 33-41

Ericson C, Hjertén S, (1999) Reversed-phase electrochromatography of proteins on modified continuous beds using normal-flow and counterflow gradients. Theoretical and practical considerations. *Anal. Chem.* 71: 1621-1627

Girelli AM, Mattei E, (2005) Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr. B* 819: 3-16

Glad M, Norrlöw O, Sellergren B, Sieghbahn N, Mosbach K, (1985) Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. *J. Chromatogr.* 347: 11-23

Gusev I, Huang X, Horváth Cs, (1999) Capillary column with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 855: 273-290

Haglund H, Tiselius A, (1950) Zone electrophoresis in a glass powder column. *Acta Chem. Scand.* 4: 957-962

Hennion MC, Pichon V, (2003) Immono-based sample preparation for trace analysis. *J. Chromatogr. A* 1000: 29-52

Hjertén S, (1961) Agarose is an anticonvection agent in zone electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 53: 514-517

Hjertén S, (1962) “Molecular-sieve” chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. *Arch. Biochem. Biophys.* Suppl. 1: 147-151

Hjertén S, (1963) “Molecular-sieve” electrophoresis on cross-linked polyacrylamide gels. *J. Chromatogr.* 11: 66-70

Hjertén S, Kunquan Y, Ogunlesi M, (1981) Immobilization of enzymes on columns of brushite. *J. Chromatogr.* 215: 25-30

Hjertén S, (1983) High-performance electrophoresis: The electrophoretical counterpart of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 270: 1-6

Hjertén S, Liao J-L, Zhang R, (1989) High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *J. Chromatogr.* 473: 273-275

Hjertén S, (1990) Zone broadening in electrophoresis with special reference to high-performance electrophoresis in capillaries: An interplay between theory and practice. *Electrophoresis* 11: 665-690

Hjertén S, Mohammad J, Nakazato K, (1993) Improvement in flow properties and pH stability of compressed, continuous polymer beds for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 646: 121-128

Hjertén S, Srichaiyo T, Palm A, (1994) UV-transparent, replaceable agarose gels for molecular-sieve (capillary) electrophoresis of proteins and nucleic acids. *Biomed. Chromatogr.* 8: 73-78

Hjertén S, Liao J-L, Nakazato K, Wang Y, Zamaratskaia G, Zhang, H-X, (1997) Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins. *Chromatographia* 44: 227-234

Hjertén S, Liao J-L, (1998) US Patent 5 814, 223

Hjertén S, Mohabbati S, Westerlund D, (2004) Influence of ignored and well-known zone distorsions on the separation performance of proteins in capillary free zone electrophoresis with special reference to analysis in polyacrylamide-coated fused silica capillaries in various buffers. I. Theoretical studies. *J. Chromatogr. A* 1053: 181-199

Hjertén M, Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, (2008) Renewable enzyme reactors based on beds of artificial antibodies. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 1188-1191

Hoegger D, Freitag R, (2001) Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 914: 211-222

Josić D, Buchacher A, (2001) Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 153-174

Jungbauer A, Hahn R, (2004) Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *J. Sep. Sci.* 27: 767-778

Kempe M, Mosbach K, (1994) Direct resolution of naxopren on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 664: 276-279

Kempe M, Mosbach K, (1995) Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. *J. Chromatogr. A* 691: 317-323

Kempe M, (1996) Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC. *Anal. Chem.* 68: 1948-1953

von Klobusitzky D, König P, (1939) *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol. Naunyn-Schmiedeberg* 192: 271-

Knox JH, (1994) Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems. *J. Chromatogr. A* 680: 3-13

Kochegarova O, Végvári Á, Hjertén S, Concentration and purification of proteins by chromatography on continuous beds, designed for mobile phases compatible with mass spectrometry and other analysis techniques requiring low ionic strengths. (*manuscript*)

Kohlrausch F, (1897) Über Concentrations – Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen. *Ann. D. Phys. U. Chem.* 62: 209-239

Kriz D, Ramström O, Mosbach K, (1997) Molecular imprinting-based biomimetic sensors could provide an alternative to often unstable biosensors for industry, medicine, and environmental analysis. *Anal. Chem.* 69: A345-A349

Laemmli UK, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Legido-Quigley C, Marlin ND, Melin V, Manz A, Smith NW, (2003) Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science. *Electrophoresis* 24: 917-944

Liao J-L, Zhang R, Hjertén S, (1991) Continuous beds for standard and micro high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 586: 21-26

Liao J-L, Chen N, Ericson C, Hjertén S, (1996a) Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and sulfonate groups for capillary electrochromatography. *Anal. Chem.* 68: 3468-3472

Liao J-L, Li Y-M, Hjertén S, (1996b) Continuous beds for microchromatography: Reversed-phase chromatography. *Anal. Biochem.* 234: 27-30

Liao J-L, Wang Y, Hjertén S, (1996c) A novel support with artificially created recognition for the selective removal of proteins and for affinity chromatography. *Chromatographia* 42: 259-262

Longsworth LG, (1959) *Electrophoresis. Theory, Methods and Applications.* (ed. M. Bier), Academic Press, Inc., New York

Lux JA, Yin H-F, Schromburg G, (1990) A simple method for the production of gel-filled capillaries for capillary gel electrophoresis. *J. High Resol. Chromatogr.* 13: 436-437

Margolis J, Kenrick KG, (1967) *Nature* 214: 1056-

Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Tehnology* 40: 1451-1463

Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N, (1996) Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* 68: 3498-3501

Mohammad J, Hjertén S, (1994) Continuous beds. Their applicability for immobilization of proteins. *Biomed. Chromatogr.* 8: 165-169

Mosbach K, Ramström O, (1996) The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/Technology* 14: 163-170

Nicholls IA, Ramström O, Moschbach K, (1995) Insights into the role of the hydrogen bond and hydrophobic effect on recognition in molecularly imprinted polymer synthetic peptide receptor mimics. *J. Chromatogr. A* 691: 349-353

Norrlöw O, Månsson M-O, Mosbach K, (1987) Improved chromatography: prearranged distances between boronate groups by the molecular imprinting approach. *J. Chromatogr.* 396: 374-377

Oefner PJ, Huber CG, (2002) A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J. Chromatogr. B* 782: 27-55

O'Farrell PH, (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021

Ornstein L, (1964) *Ann. NY Acad. Sci.* 121: 321-349

Palm A, Novotny MV, (1997) Macroporous polyacrylamide/poly(ethylene glycol) matrixes as stationary phases in capillary electrochromatography. *Anal. Chem.* 69: 4499-4507

Pichon V, (2007) Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A* 1152: 41-53

Ping G, Zhang W, Zhang L, Schmitt-Kopplin P, Zhang Y, Kettrup A, (2003a) Rapid separation of nucleosides by capillary electrochromatography with a methacrylate-based monolithic stationary phase. *Chromatographia* 57: 629-633

Ping G, Zhang W, Zhang L, Zhang L, Schmitt-Kopplin P, Kettrup A, Zhang Y, (2003b) Abnormal phenomenon of the dependence of the retention factors for uncharged species on applied voltage in capillary electrochromatography. *Chromatographia* 57: 777-781

Quaglia M, Sellergren B, De Lorenzi E, (2004) Approaches to imprinted stationary phases for affinity capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 1044: 53-66

Rachkov A, Minoura N, (2000) Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach. *J Chromatogr. A* 889: 111-118

Rachkov A, Minoura N, (2001) Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitop approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1544:255-266

Raymond S, Weintraub LS, (1959) Acrylamide gel as a separation medium for zone electrophoresis. *Science* 130: 711-

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, (2006) Monolithic beds of artificial gel antibodies. *J. Chromatogr. A* 1109: 100-102

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, (2008) A new approach for on-line enrichment and electrophoresis of dilute protein solutions. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 1098-1103

Rick J, Chou TC, (2005) Imprinting unique motifs formed from protein-protein associations. *Anal. Chim. Acta* 542: 26-31

Righetti PG, Gelfi C, (1997) Recent advances in capillary electrophoresis of DNA fragments and PCR products in poly(N-substituted acrylamydes). *Anal. Biochem.* 244: 195-207

Righetti PG, (2005) Electrophoresis: The march of pennies, the march of dimes. *J. Chromatogr. A* 1079: 24-40

Saavedra L, Barbas L, (2007) Chromatography-based on- and in-line pre-concentration methods in capillary electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 289-297

Sázelová P, Kašička V, Koval D, Kilár F, Knopp D, Peltre G, (2003) Analysis of water extracts from airborne dust samples by capillary isotachophoresis. *J. Chromatogr. A* 990: 303-309

Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S, (1997) Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting. *Anal. Chem.* 69: 1179-1183

Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S, (1998) Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 817: 5-13

Sellergren B, (1994) Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polimer. *Anal. Chem.* 66: 1578-1582

Sellergren B, (1997) Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials. *Trends Anal. Chem.* 16: 310-320

Shapiro AI, Vinuela E, Maizel JV, (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 815-

Shiomi T, Matsui M, Mizukami F, Sakaguchi K, (2005) A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. *Biomaterials* 26: 5564-5571

Smithies O, (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-

Svec F, Fréchet JMJ, (1992) Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Anal. Chem.* 64: 820-822

Svec F, Peters EC, Sýkora D, Fréchet JMJ, (2000) Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. *J. Chromatogr. A* 887: 3-29

Svec F, (2006) Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 841: 52-64

Svensson H, (1961) Isoelectric fractionation, Analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chem. Scand.* 15: 325-341

Takátsy A, Kilár A, Kilár F, Hjertén S, (2006a) Universal method for synthesis of artificial gel antibodies by the imprinting approach combined with a unique electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses and cells (Bacteria). Ia. Gel Antibodies against Proteins (Transferrins). *J. Sep. Sci.* 29: 2802-2809

Takátsy A, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, (2007) Universal method for synthesis of artificial gel antibodies by the imprinting approach combined with a unique electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses and cells (Bacteria). Ib. Gel Antibodies against Proteins (Hemoglobins). *Electrophoresis* 28: 2345-2350

Takátsy A, Sedzik J, Kilár F, Hjertén S, (2006b) Universal method for synthesis of artificial gel antibodies by the imprinting approach combined with a unique

electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses and cells (Bacteria). II. Gel Antibodies against virus (Semliki Forest Virus). *J. Sep. Sci.* 29: 2810-2815

Tiselius A, (1937) Electrophoreis in theory and practice. *Trans. Faraday Soc.* 33: 524-535

Tong D, Hetényi C, Bikádi Z, Gao JP, Hjertén S, (2001) Some studies of the chromatographic properties of gels ('Artificial Antibodies/Receptors') for selective adsorption of proteins. *Chromatographia* 54: 7-14

Végvári Á, Guttman A, (2006) Theoretical and nomenclatural considerations of capillary electrochromatography with monolithic stationary phases. *Electrophoresis* 27: 716-725

Venton DL, Gudipati E, (1995) Influence of protein on polysiloxane polymer formation: evidence for induction of complementary protein-polymer interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1250: 126-136

Volkmann A, Brüggemann O, (2006) Catalysis of an ester hydrolysis applying molecularly impinted polymer shells based on an immobilised chiral template. *Reactive Functional Polymers* 66: 1725-1733

Wang QC, Svec F, Fréchet JMJ, (1993) Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography. *Anal. Chem.* 65: 2243-2248

Wulff G, Sarhan A, (1972) Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 11: 341

Wulff G, Haarer J, (1991) Enzyme–analog built polymers. The preparation of defined chiral cavities for the racemic-resolution of free sugars. *Makromol. Chem.* 192: 1329-1338

Wulff G, (1995) Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates-A way towards artificial antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34: 1812-1832

Zeng C-M, Liao J-L, Nakazato K, Hjertén S, (1996) Hydrophobic-interaction chromatography of proteins on continuous beds derivatized with isopropyl groups. *J. Chromatogr. A* 753: 227-234

Zhang S, Huang X, Zhang J, Horváth Cs, (2000) Capillary electrochromatography of proteins and peptides with cationic acrylic monolith. *J. Chromatogr. A* 887: 465-477

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, (2006) Monolithic beds of artificial gel antibodies. *J. Chromatogr. A* 1109: 100-102. **IF-2006: 3.554**

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, (2008) A new approach for on-line enrichment and electrophoresis of dilute protein solutions. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 1098-1103. **IF-2006: 1.403**

Hjertén M, **Rezeli M**, Kilár F, Hjertén S, (2008) Renewable enzyme reactors based on beds of artificial gel antibodies. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 1188-1191. **IF-2006: 1.403**

Az értekezés alapjául szolgáló előadás és poszter absztraktok

Idézhető absztrakt:

Hjertén S, Ghasemzadeh N, Hjertén MC, Végvári A, Bacskay I, Kilár A, **Rezeli M**, Takátsy A, Kilár F, Ballagi A, Elfwing A, Cheng H, Sedzik J, Aastrup T, Anderson H, (2005) Universal method for synthesis of highly selective artificial gel antibodies against proteins, viruses and cells; some techniques to study the selectivity and applications. *FEBS Journal* 272: 399-399.

Konferencia kiadványban megjelent absztraktok:

Ghasemzadeh N, Kilár A, **Rezeli M**, Takátsy A, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, Novel approaches in the synthesis of artificial antibodies and in the detection of the antigens (proteins, viruses and cells). 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2005, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, L-12

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, Mesterséges antitestek - Fehérjefelismerés monolit tölteteken. XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2006, Csíkszereda, Románia, Doktorandusz plénum, 102. old.

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, Monolithic beds of artificial gel antibodies. 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2005, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, P-52

Rezeli M, Takátsy A, Bacskay I, Ghasemzadeh N, Végvári Á, Sedzik J, Ballagi-Pordány A, Kilár F, Hjertén S, Artificial antibodies-selective gels for macromolecules and bioparticles. 15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, 2006, Paris, France, Program and book of abstracts, P-37

Egyéb közlemények

Rezeli M, Világhy B, Kilár F, Kanyó K, Török B, Török A, (2002) Significant differences in capillary electrophoretic patterns of follicular fluids and sera from women pre-treated for in vitro fertilization. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53: 151-156. **IF-2002: 1.383**

Surowiec I, Pawelec K, **Rezeli M**, Kilár F, Trojanowicz M, (2008) Capillary electrophoretic determination of main components of natural dyes with MS detection. *J. Sep.Sci.* (elfogadva) **IF-2006: 2.535**

Farkas V, **Rezeli M**, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, A new approach to determine the variance of reversible adsorption of an analyte onto the capillary wall in CE with electroosmotic flow and the loss caused by irreversible adsorption. *(kézirat)*

Egyéb előadás és poszter absztraktok

Rezeli M, Szignifikáns különbségek szérum és follikulus folyadék fehérjeprofiljában hormonkezelésen átesett nők esetén. XXVI. OTDK Kémiai és Vegyipari szekció, 2003 Budapest

Farkas V, **Rezeli M**, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, Novel approaches for quantitative determination of the reversible and irreversible adsorption of analytes onto the channel wall in capillary and microchip electrophoresis with electroosmotic flow. 22nd International Symposium on MicroScale Bioseparations & Methods for Systems Biology, 2008, Berlin, Germany, Abstracts Book, pp. 72

Rezeli M, Világhy B, Kilár F, Török B, Török A, Significant differences in the electrophoretic patterns of follicular fluids and sera from women pre-treated for in vitro fertilization. HPCE 2002, 15th International Symposium on Microscale Technique, 2002, Stockholm, Sweden, Abstracts, P-41

Kőnigné Péter A, **Rezeli M**, Kilár F, Detection of ˝Quorum sensing˝ molecules by CE and CE-MS. 7th International symposium and Summer School on Bioanalysis, 2007, Pécs, Hungary, P-3

Dergez T, Kőnig A, **Rezeli M**, Poór V, Kilár F, Detection of ˝Quorum sensing˝ molecules by GC-MS and CE-MS. 7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2007, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, pp. 92

Páger Cs, **Rezeli M**, Kilár F, Végvári Á, Capillary isoelectric focusing of dyes in uncoated capillary with UV and MS detections. 7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2007, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, pp. 151

Páger Cs, **Rezeli M**, Végvári Á, Kilár F, CIEF-MS analysis of different dye substances in uncoated capillary. 22nd International Symposium on MicroScale Bioseparations & Methods for Systems Biology, 2008, Berlin, Germany, Abstracts Book, pp. 265