

OTKA Témapályázat zárójelentés

Új homogén folyadékkromatográfiás és elektrokromatográfiás töltetek kifejlesztése

Élettelen természettudományok

OTKA T046799

Dr. Kilár Ferenc

Pécsi Tudományegyetem,
Természettudományi Kar
Analitikai Kémia Tanszék
egyetemi tanár, DSc

2004-2006

2250 eFt*

* az eredetileg megítélt összeg egyszer csökkent az OTKA Bizottság döntése
következtében

A KUTATÁSI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

Dr. Kilár Ferenc

Célunk újfajta, ideális elválasztási tulajdonságokat biztosító homogén töltetek, valamint szelektív gélek előállítására volt, amelyeket kapilláris folyadékkromatográfiára és elektrokromatográfiára egyaránt könnyen lehet használni.

Az utóbbi években egyre népszerűbbé váltak azok a folyadékkromatográfiás töltetek, amelyeket az oszlopban történő egyszerű, „in situ” polimerizációval lehet előállítani. Az ún. „monolit” töltetek az ömlesztett szilika kapillárisok falához kovalensen köthetők (nincs szükség fritekre) és közvetlen, a kapillárison keresztüli, detektálásra is lehetőség nyújtanak. A töltetek összekapcsolt polimerláncok térbeli alakulata, de ezek a láncok lokálisan feltekeredettek, így kisméretű (0,1-0,5 μm) részecskéket hoznak létre. Kromatográfiás tulajdonságaik felülmúlják a hagyományos módon, szilikagyöngyökkel töltött oszlopokét. Az elektrokromatográfia adta előnyöket (az elektroendozmotikus áramlással továbbított folyadék oszlop dugószerű vándorlási profilja ill. a drága nagynyomású pumpák kiváltása) jól ki lehet használni. A töltetek fizikai tulajdonságaiból adódóan az Eddy diffúzió kicsi és az állófázis részecskéinek kis méretéből következően csökkent az ellenállás a tömegátadással szemben.

A továbbfejlesztett „monolit” töltetnek tekinthető homogén gélek szintézise kromatográfiás oszlopokban a fenti „in situ” elven szintén megoldható. A gélek homogenitása a kromatográfiás tulajdonságok további javulását eredményezi, azonban a gélek ellenállnak a hidrodinamikai nyomásnak, rajtuk folyadékot átpumpálni nem lehet. Így hagyományos folyadékkromatográfiás töltetként nem alkalmazhatók, csak elektrokromatográfiás mérésekre alkalmasak. A 90-es évek közepéig senki sem gondolt

arra, hogy géleket elektrokratográfiás töltésként alkalmazzon. Ráadásul általánosan elfogadott nézet volt, hogy a poliakrilamid alapú gélek pórusai olyan kicsik, hogy mérhető elektroendozmotikus áramlást nem tesznek lehetővé. Ezt teljesen megcáfolták japán kutatók munkái és saját eredményeink is. A gélek legvonzóbb elválasztási tulajdonságait (nagy felbontás és diffúziót gátló hatás) megtartva egyszerűen előállítható, egyúttal nagy mechanikai stabilitású gélek kifejlesztésével foglalkoztunk. A metilén-bisz-akrilamiddal keresztkötött poliakrilamid gélek gyenge fizikai tulajdonságait az elválasztásokhoz szükséges ligandok, keresztkötők egyszerű kémiai előállításával oldhatjuk meg. A gélek legvonzóbb elválasztási tulajdonságait (nagy felbontás és diffúziót gátló hatás) megtartva egyszerűen előállítható, egyúttal nagy mechanikai stabilitású gélek kifejlesztésével foglalkoztunk.

A szelektív kémiai rendszerek egyik nagy feladata, hogy makromolekulákat és akár sejteket preparatív módon felismerjen és elválasszon a befoglaló mátrixtól. Az ún. imprinting technika azonban csak kismolekulákra adott eddig lehetőséget. Munkánk során a szelektív gélek kifejlesztésével, tesztelésével, és kromatográfiás, valamint elektroforetikus elválasztások alapját biztosító töltetek kialakításával foglalkoztunk. Ezen gélek viszont már makromolekulák, különböző fehérjék és ennél nagyon biológiai rendszerek, pl. vírusok vagy baktériumok szelektív felismerésére, és megkötésére alkalmasak.

Az ez idáig megvizsgált alkalmazási területeken biológiai makromolekulák, elsősorban fehérjék, különféle módszerekkel történő gyors, nagyfelbontású analízisét kívántuk megoldani. A géleknek ez a felhasználási területe, az ún. mesterséges antitestekként való alkalmazásuk. Ha adott fehérje, vírus vagy sejt jelenlétében polimerizálunk géleket, akkor azok kialakuló térbeli szerkezete alkalmazkodik az adott makromolekula vagy részecske formájához. Ha megfelelő módszerekkel eltávolítjuk az „antigén”

molekulákat ill. részecskéket, akkor a gél felületén térbeli lenyomat képződik és gyenge kölcsönhatású kötőhelyek is kialakulnak, amik rendkívül nagy szelektivitással „ismerik” fel az adott „antigént”.

A projekt során elvégzett munka során kimutattuk, hogy ezek a szelektív gélek nagy érzékenységgel képesek felismerni ugyanazon fehérje különböző konformációs állapotait (ld. transzferrines közlemény), de a különböző fajtáktól származó, szerkezetileg hasonló fehérjék szelektív megkötésére is alkalmasak (hemoglobinokat leíró közlemény megjelenés alatt). A munka egyik fontos eredménye, hogy sikeresen bebizonyítottuk, hogy ezek a homogén gélek alkalmasak vírusok szelektív megkötésére olyan mértékben, hogy két vírus (vad és mutáns forma) közötti, mindösszesen három aminosav-maradék különbséget is képesek felismerni (ld. Semliki Forest Vírusról szóló közlemény). S végül bebizonyítottuk, hogy a szelektív gélek képesek sejteket (ld. baktériumokról szóló közlemény) is szelektíven megkötni.

A munka másik része ezen szelektív gélek újfajta, különböző elválasztási tulajdonságokat biztosító homogén töltetek és "continuous bed" ("folytonos ágy") formájú kromatográfiás fázisok előállítására volt. Kidolgoztuk ezen szelektív gélek alkalmazásának lehetőségeit "continuous bed"-típusú elválasztó kapilláris oszlopokra. A vizsgált modell-fehérje a hemoglobin volt (ld. monolit töltetről szóló közlemény).

A vázolt alapkutatói terveken kívül valamennyi módszert és eredményt alkalmazott kutatásokban is fel kívánjuk használni. A kifejlesztett monolit töltetek egyik alkalmazási területe a miniaturizált rendszerekben való alkalmazás, amely lehetővé teszi az ultraibolya, látható és fluoreszcens detektálást egyaránt. Speciális elválasztás-technikai problémák megoldásában kívánunk közreműködni más kutatócsoportokkal.

Pécs, 2007. február 25.

Dr. Kilár Ferenc